



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA MILENY SANTOS

**FARELO DE SOJA E FARELO DE MILHO COMO
SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE
POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

LETÍCIA MILENY SANTOS

**FARELO DE SOJA E FARELO DE MILHO COMO
SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE AMILASE E ROTEASE
POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende

Co-orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237f Santos, Letícia Mileny.
Farelo de soja e farelo de milho como substratos na produção de amilase e protease por
Bacillus amyloliquefaciens MO.04b / Letícia Mileny Santos. – Londrina, 2015.
113 f. : il.

Orientador: Maria Inês Rezende.
Coorientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 3. Amilase –
Teses. 4. Resíduos agrícolas – Teses. 5. *Bacillus amyloliquefaciens* – Teses. 6. Fermentação
em estado sólido – Teses. I. Rezende, Maria Inês. II. Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. III.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

LETÍCIA MILENY SANTOS

**FARELO DE SOJA E FARELO DE MILHO COMO SUBSTRATOS NA
PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE
POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Abril de 2015.

A minha mãe com todo o amor que há nesse mundo...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade da realização desta dissertação e conclusão do Mestrado em Biotecnologia;

À Profa Maria Inês Rezende, pela orientação, amizade, carinho e dedicação em todos os momentos;

À Profa Mara Lúcia Luiz Ribeiro, pela co-orientação e todos conhecimentos compartilhados;

Aos meus pais Odair e Rosângela, pelo amor, apoio, confiança e companherismo nesses anos de mestrado, obrigada pelas valorosas lições de vida, pela presença constante e pela eterna confiança em minhas escolhas;

Aos funcionários do Depto de Bioquímica e Biotecnologia em especial para o Nelson, pela ajuda e toda paciência dedicada a mim quando precisei;

Aos meus amigos e colegas de laboratório, por toda a ajuda concedida durante as aulas do mestrado e a realização dos experimentos, em especial para o Leonardo, pelo companherismo, amizade, risadas, brigas e frustrações compartilhadas tornando meus dias mais divertidos.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena sua vaidade para o amanhã.”

Leonardo da Vinci

SANTOS, Letícia Mileny. **Farelo de soja e farelo de milho como substratos na produção de amilases e proteases por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.** 2014. 113 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

RESUMO

As enzimas microbianas amilase e protease são de grande importância biotecnológica e aplicáveis em diferentes setores industriais. Uma vez que resíduos gerados na agroindústria podem constituir problema ambiental, uma estratégia para seu aproveitamento é a fermentação em estado sólido (FES), processo potencial para produção de biomoléculas de interesse econômico, como enzimas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em farelo de soja (FS) e farelo de milho (FM). O inóculo de *B. amyloliquefaciens* foi desenvolvido em meio de sais minerais (MSM) acrescido de glu 0,2 % por 24 h e 37 °C e seu volume foi avaliado entre 100, 200, 300, 400 e 500 µL. As FES foram realizadas a partir de 1,5 g de FS e FM umedecidos com: água; MSM; MSM + glu 1 %; MSM + Extrato de levedura (YE) 1 % ou MSM + glu 1 %+ YE 1 %. A curva de crescimento em até 48 h foi desenvolvida tendo como resposta a atividade amilolítica e proteolítica, realizou-se ainda FES com misturas dos resíduos e a inserção do bagaço de cana-de-açúcar (BC) e a casca de arroz (CA) como agentes de estruturação. A atividade foi determinada pelas metodologias descritas por Miller (amilase) e Hartree (protease). A produção da enzima mais ativa foi otimizada através do delineamento de misturas simplex-centróide e parcialmente caracterizada nas condições ótimas. O melhor tempo para a obtenção do inóculo foi 18 h com $6,6 \times 10^7$ UFC/mL e a solução MSM + glu 1 %+ YE 1 % foi selecionada. As atividades nos extratos: FS 146,08 U/mL para protease e 75,63 U/mL para amilase e em FM 63,41 U/mL para protease e 0,752 U/mL para a amilase; ressaltando que essas atividades foram determinadas em extratos sem diálise (ESD). O melhor tempo de cultivo foi 36 h em ambos os substratos para a produção de amilase 1,36 U/mL em FS e 0,27 U/mL em FM e 9 h em FS para protease 11,7 U/mL, atividades essas determinadas em extratos dialisados (ED), e em FM não foi produzida protease. O agente de estruturação BC melhorou a atividade da amilase 3,62 U/mL e a CA melhorou a produção de protease 11,17 U/mL em FS. A condição ótima de produção de proteases, 20,32 U/mL, foi no substrato FS com casca de arroz como agente estruturante. A temperatura ótima 25 °C e o pH ótimo 3,0, além de estável por 90 min. a 70 °C mantendo 70 % de sua atividade original. Os resultados obtidos sugerem que esta protease apresenta propriedades interessantes para futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. *Bacillus amyloliquefaciens*. Amilase. Protease. Farelo de soja e farelo de milho.

SANTOS, Letícia Mileny. **Soybean meal and corn meal as substrates in the production of amylase and protease by *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.** 2014. 113 p. Dissertation (Master's degree in Biotecnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

ABSTRACT

The microbial enzymes amylase and protease are of great biotechnological importance and applicable in different industrial sectors. Since waste generated in agribusiness may constitute environmental problem, a strategy for exploitation is the solid-state fermentation (SSF), potential process for the production of biomolecules of economic interest, such as enzymes. The objective of this study was evaluate the production of amylase and protease by *B. amyloliquefaciens* MO.04b in soybean meal and corn meal. The inoculum of *B. amyloliquefaciens* was developed in mineriais salts medium (MSM) plus 0.2% glu 37 ° C for 24 h and its volume was estimated at between 100, 200, 300, 400, and 500 µL. The SSF were made from 1.5 g of soybean meal and corn meal moistened with: water; MSM; MSM + 1% glu; MSM + yeast extract (YE) or 1% MSM + 1% glu + 1% YE. The growth curve within 48 h has been developed in response to amylytic and proteolytic activity was also held-FES with mixtures of waste and the insertion of the cane bagasse (BC) and rice husk (CA) as bulking agents. The activity was determined by the methods described by Miller (amylase) and Hartree (protease). The production of the active enzyme was optimized through design of simplex-centroid mixtures and partially characterized in optimal conditions. The best time to obtain the 18 h inoculum was 6.6×10^7 CFU/mL and MSM + 1% glu + YE solution 1% was selected. The activity in the extracts soybean meal 146.08 U/mL for protease and 4.28 U/mL for amylase and corn meal 63.41 U/mL for protease and 0.752 U/mL for amylase; noting that these activities were determined in extracts without dialysis (ESD). The best culture time was 36 h in both substrates for the production of amylase 1.36 U/mL in soybean meal and 0.27 U/mL in corn meal for 9 h for protease in soybean meal to 11.7 U/mL, these activities determined in dialyzed extract (ED) and corn meal protease was not produced). The bulking agent BC improved amylase activity 3.62 U/mL, and the improved AC protease production 11.17 U/mL in soybean meal. The optimal condition for the production of proteases, 20.32 U/mL, was in soybean meal substrate with rice husk as bulking agent. The optimum temperature 25 ° C and the optimum pH 3.0, and stable for 90 min. to 70 ° C while maintaining 70% of its original activity. The results suggest that this protease has interesting properties for future biotechnological applications.

Key words: Solid-state fermentation. *Bacillus amyloliquefaciens*. Amylase. Protease. Soybean meal. Corn meal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da organização dos resíduos de glucose nos polímeros (a) amilose e (b) amilopectina	20
Figura 2 -	Classificação das enzimas amilolíticas	21
Figura 3 -	Esquema geral da hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas	22
Figura 4 -	Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease	26
Figura 5 -	Sítio de ação das exopeptidases e endopeptidases	27
Figura 6 -	Processo industrial de produção enzimática	32
Figura 7 -	Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes segmentos.....	33
Figura 8 -	Venda de enzimas por segmento e por área geográfica da Novozymes	33
Figura 9 -	Representação dos bastonetes do gênero Bacillus	39
Figura 10 -	Eletromicrografias de B. amyloliquefaciens MO.04b cultivado nos substratos farelo de soja e farelo de milho	40
Figura 11 -	Substratos farelo de soja, farelo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar utilizados na FES.....	42
Figura 12 -	Diálise dos ELC em papel celofane imersos em água destilada.....	45
Figura 13 -	Delineamento experimental simplex centroide para 3 componentes.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Exemplos de substratos e suas aplicações na fermentação em estado sólido (FES), onde (a) são lignocelulósicos, (b) lignocelulósicos provenientes de frutas e (c) sintéticos 19
Tabela 2 –	Microrganismos utilizados na produção de α -amilases25
Tabela 3 –	Proteases de origem vegetal e animal29
Tabela 4 –	Principais aplicações das amilases e proteases utilizadas em terapias37
Tabela 5 –	Composição centesimal dos resíduos agroindustriais.....43
Tabela 6 –	Codificação do delineamento experimental simplex centroide49
Tabela 7 –	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)2252

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
° C	Graus Celsius
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
CA	Casca de arroz
ELC	Extrato Livre de Células
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Farelo de soja
Fsub	Fermentação submersa
FM	Farelo de milho
L	Litro
MSM	Meio de sais minerais
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MO	Microrganismo
nm	Nanômetros
p	Peso
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPM	Rotações por minuto
V	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	16
3.2	AMILASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E AÇÃO CATALÍTICA.....	19
3.2.1	Produção de Amilases.....	23
3.2.1.1	Produção de amilases por fermentação em estado sólido	24
3.3	PROTEASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E AÇÃO CATALÍTICA.....	26
3.3.1	Produção de Proteases	28
3.3.1.1	Produção de proteases por fermentação em estado sólido.....	30
3.4	PRODUÇÃO INDUSTRIAL E APLICAÇÃO DE AMILASES E PROTEASES	30
3.4.1	Processo Industrial	30
3.4.2	Aplicações Industriais.....	34
3.4.2.1	Indústria de alimentos	34
3.4.2.2	Indústria de papel e celulose	35
3.4.2.3	Indústria têxtil	35
3.4.2.4	Indústria farmacêutica	36
3.4.2.5	Indústria de detergentes.....	37
3.4.2.6	Alimentação animal	38
3.5	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO.04B	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	MICROORGANISMO	42
4.2	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	42
4.3	MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES	43

4.3.1	Meio de Manutenção (Dyg's).....	43
4.3.2	Meio de Sais Minerais (MSM).....	43
4.4	PREPARO DO INÓCULO	43
4.5	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	44
4.5.1	Preparo dos Cultivos em FES	44
4.5.2	Interrupção dos Cultivos e Obtenção do ELC.....	44
4.5.3	Diálise dos Extratos Livres de Células	44
4.6	ENSAIOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE	45
4.6.1	Curva de Crescimento do <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b em Fermentação Submersa para a Padronização do Tempo de Inoculo.....	45
4.6.2	Padronização da Fermentação em Estado Sólido nos substratos Farelo de Soja (FS) e Farelo de Milho (FM).....	45
4.6.2.1	Determinação do volume do inoculo	45
4.6.2.2	Determinação da composição da solução umedecedora	46
4.6.2.3	Cinética de produção de amilase e protease.....	46
4.6.2.4	Adição do bagaço de cana-de-açúcar à mistura dos substratos FS e FM	46
4.6.3	Utilização dos Substratos Bagaço de Cana-de-Açúcar ou Casca de Arroz como Agente de Estruturação na Produção de Amilase e Protease em Farelo de Soja	46
4.7	Determinações Analíticas	47
4.7.1	Determinação da Atividade Enzimática	47
4.7.1.1	Determinação da atividade amilolítica	47
4.7.1.2	Determinação da atividade proteolítica	47
4.7.2	Determinação do pH (Inicial e Final)	48
4.7.3	Determinação das Proteínas Totais Solúveis	48
4.7.3.1	Metodologia de Hartree	48
4.8	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE	49
4.9	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA PROTEASE	51
4.9.1	Determinação da Temperatura e pH Ótimo para a Atividade Proteolítica.....	51

4.9.1.1	Determinação da temperatura ótima	51
4.9.1.2	Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica	51
4.9.1.3	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação da temperatura e do pH ótimos da protease.....	51
4.9.2	Estabilidade Térmica	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
	APÊNDICES	54
APÊNDICE A –	Artigo 1. Utilização de farelo de soja, farelo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz na produção de amilase e protease por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b.....	55
APÊNDICE B –	Artigo 2. Aplicação do delineamento simplex centroide na produção de protease ácida de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b em farelo de soja	77
	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXOS	106
ANEXO A –	Normas para a submissão de artigo para a revista Brazilian Journal of Microbiology.....	107
ANEXO B –	Algumas Determinações Analíticas	113

1.INTRODUÇÃO

Amilases e proteases apresentam grande importância na biotecnologia com um amplo campo de aplicações. Essas enzimas são produzidas no metabolismo dos microrganismos, e movimentam grande parte do mercado mundial. Embora enzimas de origem microbiana industriais sejam produzidas principalmente por fermentação submersa, a fermentação em estado sólido (FES) é uma opção viável para a produção de enzimas.

A geração de resíduos é inerente a qualquer setor produtivo, no Brasil os setores agroindustriais acumulam grandes quantidades de resíduos. Estes representam problemas ambientais, perdas de valores nutricionais e biomassa, além da dificuldade de disposição final sendo possíveis poluentes.

A busca por tecnologias sustentáveis com o aumento da conscientização ecológica criou o desafio de se equilibrar crescimento econômico, produção de bens e serviços e sustentabilidade ambiental. Assim, a recuperação, o reaproveitamento e a bioconservação de resíduos são cada vez mais necessários para as cadeias agroindustriais.

Os subprodutos e resíduos agrícolas podem ser utilizados para a síntese de produtos úteis através de sua biotransformação e também na composição de rações animais. Neste contexto, a FES é uma estratégia biotecnológica para o aproveitamento desses resíduos que são mais baratos e possuem uma rica composição nutricional. É descrita como um processo realizado por microrganismos, sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, na ausência de água livre, o que possibilita a produção de diversos metabólitos entre eles as enzimas.

O gênero *Bacillus* é um dos mais utilizados na produção de enzimas industriais, e *Bacillus amyloliquefaciens* é uma das espécies mais empregadas na produção de α -amilase e proteases por fermentação submersa. Trabalhos vêm relatando a produção de enzimas por *Bacillus* em fermentação submersa, mas pouco se encontra em fermentação em estado sólido.

Sendo assim, este trabalho teve a finalidade de estudar produção de amilase e protease pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b por FES em dois subprodutos da agroindústria, farelo de soja e farelo de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de protease e amilase por *Bacillus amyloliqueciens* MO-04b nos substratos farelo de soja e farelo de milho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros de cultivo para a produção das enzimas amilase e protease como: tempo de crescimento, padronização do inóculo e seleção da solução umedecedora;
- Avaliar a inserção de casca de arroz e/ou bagaço de cana-de-açúcar como agente de estruturação na FES;
- Otimizar a produção da enzima de maior atividade produzida sob condição de fermentação em estado sólido através do delineamento estatístico de misturas simplex-centróide;
- Caracterizar a enzima presente no extrato bruto com relação aos parâmetros pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O Brasil é um país de grande importância dentro do cenário agrícola mundial sendo um dos grandes produtores de soja e milho no mundo. Segundo a EMBRAPA (2014), a produção de soja no Brasil atingiu 85,656 milhões de toneladas na safra de 2013/2014, sendo que a produção mundial foi de 288,873 milhões de toneladas. O milho obteve uma produção próxima 82 milhões de toneladas tendo o Brasil como o terceiro maior produtor deste grão. Após serem processados, esses grãos fornecem subprodutos bastante nutritivos, o farelo de soja e o farelo de milho, que podem ser utilizados para obtenção de diferentes produtos.

Atualmente, tanto o farelo de soja, como o farelo de milho, vêm sendo empregados na fabricação de rações, para suínos, pets e aves. Os farelos chegam a compor até 80 % das rações (WASDE, 2015; ABOISSA, 2014).

Segundo o IBGE (2014) o Brasil produziu na safra de 2013/2014, 12,2 milhões de toneladas de arroz, estando entre os 10 principais produtores do mundo. A casca do arroz, gerada no beneficiamento do grão, corresponde a aproximadamente 20 % do total do arroz. Esse resíduo agrícola é um material abrasivo, de baixo valor nutritivo e reduzida densidade, o que ocasiona dificuldade de armazenamento e eliminação constituindo problema ambiental (DELLA; HOTZA, 2006).

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar no mundo, a produção em 2013 atingiu aproximadamente 652,02 milhões de toneladas, gerando quase 200 milhões de toneladas em bagaço (CONAB, 2013). A quantidade produzida de bagaço depende da quantidade de fibra da cana-de-açúcar processada, apresentando em média 46 % de fibra e 50% umidade, resultando aproximadamente 280 Kg/tonelada de cana beneficiada. Desta vasta quantidade de bagaço originado apenas parte é utilizado para geração de energia (PARANHOS, 1987).

Devido a sua rica composição nutricional, baixo custo e abundância estes substratos e/ou resíduos podem ser utilizados em processos biotecnológicos, entre eles a FES. O farelo de soja e o farelo de milho fornecem aos microrganismos fonte de energia que favorecem seu desenvolvimento, a casca de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar podem ser utilizados como agentes estruturantes facilitando o crescimento microbiano (PINTO et al., 2005, BATHAM; GUPTA; TIWARI, 2013).

Fermentação em estado sólido (FES) é geralmente definida como o crescimento de microrganismos, sobre ou dentro de partículas em matriz sólida na ausência de água livre. A quantidade de água disponível é suficiente para garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, mas não excede a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (WANG; YANG, 2007; PANDEY, 2003), a água necessária para o crescimento microbiano encontra-se adsorvida ou complexada no interior da matriz sólida (SOCCOL; CABRERO; ROUSSOS; RAIMBAULT, 1992).

Os sólidos utilizados nesse tipo de fermentação são geralmente de natureza granular ou fibrosa possibilitando assim a retenção de água por higroscopia ou capilaridade, sendo que a quantidade de água retida varia consideravelmente de acordo com o material utilizado (SOCCOL; CABRERO; ROUSSOS; RAIMBAULT, 1992). A matéria orgânica e o carbono presentes nestes sólidos são utilizados como fonte de energia pelos microrganismos o que possibilita seu crescimento, a síntese de biomassa celular e de produtos metabólitos (MITCHELL; LOSANE, 1992)

Segundo Pinto et al. (2005) a FES apresenta as seguintes características:

- A fase sólida é utilizada como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, e também serve como suporte para o crescimento das células microbianas;
- O crescimento dos microrganismos ocorre em condições mais próximas ao habitat natural;
- Os substratos não se encontram totalmente disponíveis ao microrganismo devido à alta heterogeneidade do meio.

Tradicionalmente os produtos biotecnológicos microbianos são obtidos por meio de fermentação submersa (FSub) devido a facilidade de controlar diferentes parâmetros fermentativos, como temperatura, pH, aeração e umidade, nesse tipo de fermentação a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido. Na FSub os substratos sólidos estão dissolvidos ou submersos no líquido, diferente da FES onde o substrato sólido úmido se apresenta de forma insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido. (MURTH; KARANTH; RAO, 1993; ROCHA, 2010).

A principal diferença entre a FES e a FSub é a capacidade de mistura dos sistemas, as FSub são reações de misturas perfeitas que em teoria apresentam a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos ao mesmo tempo em cada parte do reator. Já na FES os sistemas se encontram com alta viscosidade, onde a homogeneidade seria alcançada com excessiva agitação o qual acarretaria a ruptura celular (GERVAIS; MOLIN, 2003; PALMA, 2003).

Na FES o parâmetro fermentativo de maior influência é a água, devido ao seu elevado grau de interação com as substâncias que compõe a fase sólida (GERVAIS; MOLIN, 2003). A água está relacionada a dois parâmetros: umidade, que se refere à porcentagem de água na massa total do meio; e a atividade de água (A_w), que está relacionada com a quantidade de moléculas de água disponíveis na vizinhança imediata das partículas do substrato, e é este parâmetro que afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2005).

Como qualquer processo a fermentação em estado sólido possui suas potencialidades e particularidades, algumas das principais vantagens são: a utilização de meios de culturas baratos (subprodutos e resíduos agrícolas), obtenção de produtos concentrados, menor quantidade de solvente utilizado durante a extração, redução de custo com esterilização e operação para agitação, menor risco de contaminação durante o processo devido ao baixo teor de umidade entre outras. A dificuldade de se controlar alguns parâmetros fermentativos como temperatura e a limitação de microrganismos que podem crescer em níveis reduzidos de umidade são algumas das desvantagens da FES (PANDEY, 2003)

Uma das vantagens citadas é a possibilidade de se utilizar meios de cultura relativamente baratos como os subprodutos e resíduos agroindustriais que são compostos de materiais de origem vegetal como farelos, cascas e tortas de soja, milho, arroz, trigo e outros cereais, necessitando de poucos nutrientes adicionais ao meio. Atualmente as vantagens da fermentação em estado sólido em relação à fermentação submersa, possibilitam a produção de enzimas, biossurfactantes, alimentos fermentados, aromas, biopesticidas, ácidos orgânicos além de serem utilizados para a biorremediação e biodegradação de compostos (PANDEY, SOCCOL; MICHELL, 2000). A Tabela 1 apresenta exemplos de substratos e sua utilização na FES.

Tabela 1- Exemplos de substratos e suas aplicações na fermentação em estado sólido

Substratos	Aplicações	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Produção de protease	OLIVEIRA et al., 2012
Farelo de trigo	Produção de α -amilase	MARTINS; KALIL; COSTA, 2008
Casca de arroz	Biorremediação de óleos	SANTANA, 2012
Farelo de cacau Casca de mandioca	Produção de amilases	GANGADHARAN et al., 2006
Polpa cítrica Casca de café	Produção de ácido giberélico	RODRIGUES, 2010
Torta de soja	Produção de lipase	MENONCIN, 2007
Farinha de soja	Produção de lipopeptídeos	ZHU et al., 2012
Farelo de soja	Suplementação enzimática de rações	GARCIA et al., 2000

Fonte: Próprio autor

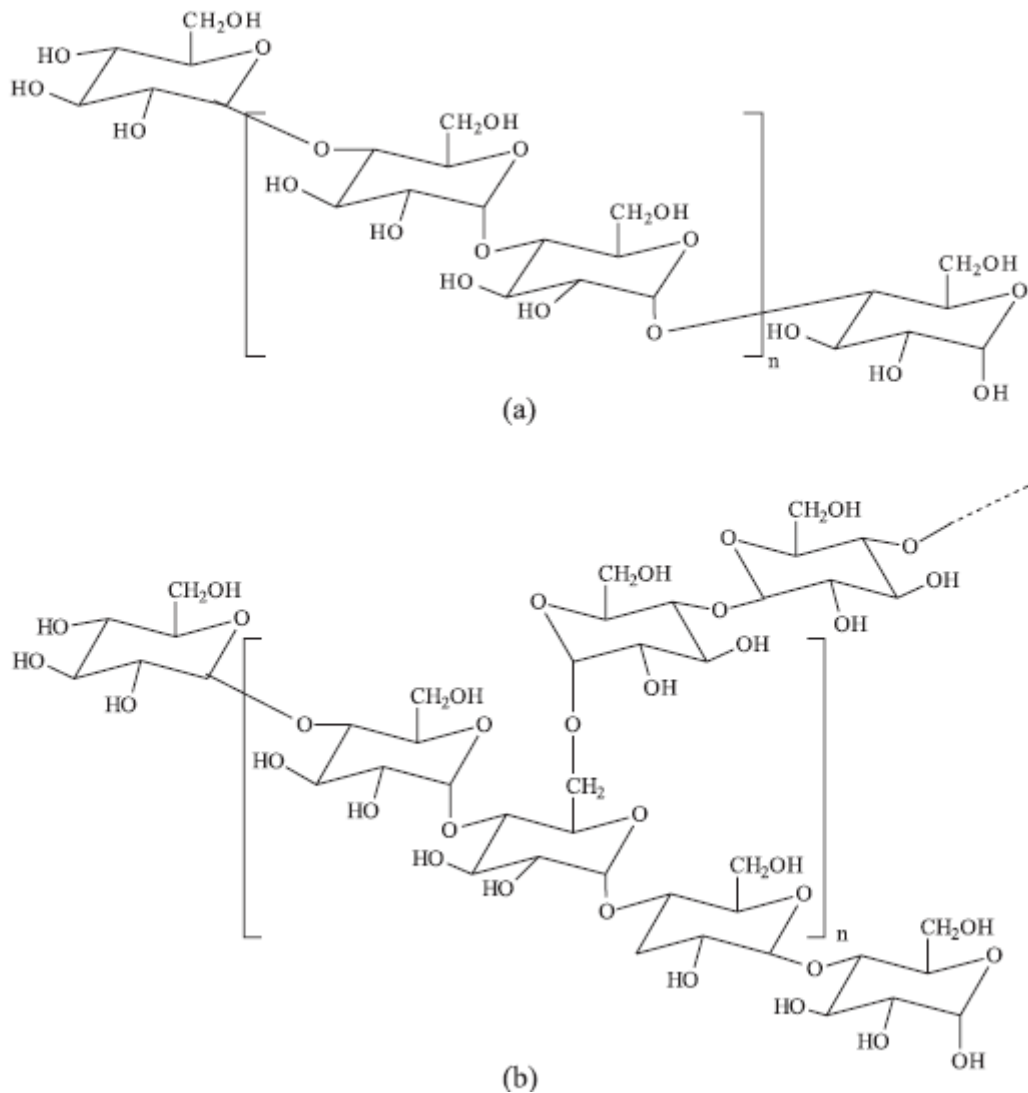
Quando ajustada à produção de enzimas a fermentação em estado sólido é uma tecnologia útil, uma vez que este processo pode ser realizado *in situ* (CAMMAROTA; FREIRE, 2006), obtendo-se extratos concentrados de enzimas, o que facilita o processo de purificação (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002). Além disso, alguns metabólitos não obtidos por fermentação submersa podem ser induzidos pela FES (MOO-YOUNG et al 1983).

3.2. AMILASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E AÇÃO CATALÍTICA

As amilases são hidrolases que atuam na despolimerização do amido, o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, através do rompimento das ligações glucosídicas presentes na molécula do amido. O amido é composto por

resíduos de glucose, ligados entre si por ligações O-glucosídicas. Esses resíduos se organizam na forma de dois polímeros (Figura 1): amilose e amilopectina (GUPTA et al., 2003).

Figura 1- Representação da organização dos resíduos de glucose nos polímeros (a) amilose e (b) amilopectina



Fonte: CORREDINE et al., 2005

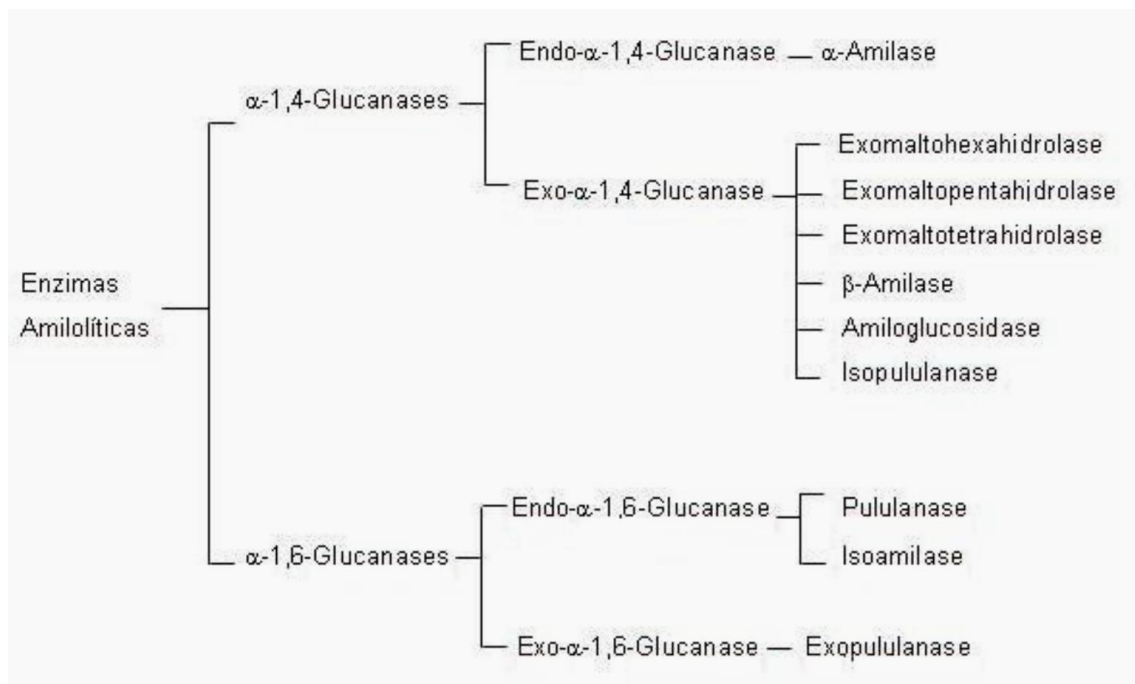
As enzimas envolvidas na despolicimerização do amido são divididas em duas categorias principais: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases realizam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido, o que ocasiona a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários tamanhos, enquanto que as exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-

reduzidas da cadeia resultando em fragmentos reduzidos da molécula de amido (GUPTA et al., 2003).

As principais classificações das amilases são: as α -amilases (endoamilases); β -amilases e α -glucosidases (exoamilases), isoamilases e as pululanases (enzimas de desramificação); e, por fim, as transferases, que têm como exemplos as amilomaltases e as ciclodextrina glicosil transferases (PANDEY, et al., 2000).

A Figura 2 apresenta um esquema realizado por Costa (1996) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

Figura 2 - Classificação das enzimas amilolíticas



Fonte: COSTA, 1996.

As α -amilases clivam as ligações glucosídicas α -1,4 presentes na parte interna da amilose ou da amilopectina, ou seja, promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores. As α -amilases possuem como produto de reação oligossacarídeos de diferentes tamanhos e dextrinas limite, que apresentam a porção ramificada da cadeia de amilopectina (PANDEY; WEBB; SOCCOL; LARROCHE, 2005; GUPTA et al., 2003).

Os primeiros produtos da hidrólise do amido pelas α -amilases são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose, sendo que elas atacam de

forma não seletiva e simultaneamente em vários pontos da cadeia, por isso são classificadas como endoamilases (PANDEY; WEBB; SOCCOL; LARROCHE, 2005).

As β -amilases têm capacidade de clivar as ligações glucosídicas α -1,4 externas da amilose, amilopectina e polissacarídeos relacionados a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, produzindo somente maltose ou glucose (PANDEY et al., 2000; GUPTA et al., 2003).

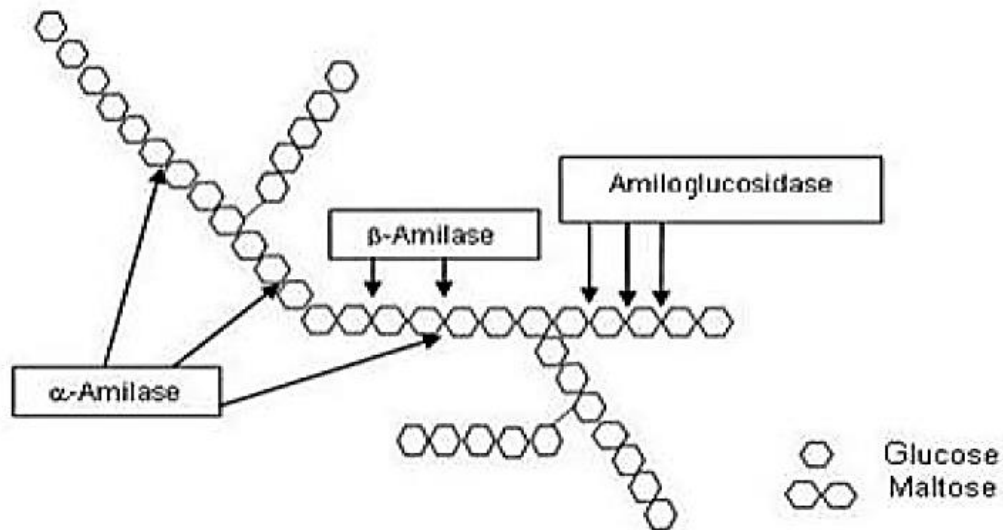
As α -glucosidases clivam tanto as ligações glucosídicas α -1,4, quanto as ligações α -1,6 desde que possuam ligação α -1,4 adjacente, liberando unidades de α -D-glucose (PANDEY; WEBB; SOCCOL; LARROCHE, 2005).

A α -glucosidase também chamada de amiloglucosidase é uma enzima induzida, dessa forma, é necessário a presença de amido ou maltose no meio para que ocorra uma alta produção, contudo como a indução é não típica, o microrganismo é capaz de sintetizá-la tendo como fonte de carbono a glucose no meio de cultivo (PANDEY; WEBB; SOCCOL; LARROCHE, 2005; PANDEY et al., 2000).

As enzimas desramificadoras hidrolisam ligações α -1,6 sendo que as isoamilases hidrolisam apenas amilopectina resultando em polissacarídeos lineares de cadeia longa. Já as pululanases estão divididas em dois grupos: as que hidrolisam apenas ligações α -1,6 representadas pelas pululanases do tipo I; e as pululanases do tipo II, que hidrolisam ligações tanto do tipo α -1,4 quanto α -1,6 sendo os produtos de hidrólise a maltose e a maltotriose (PANDEY et al., 2000).

As transferases constituem o quarto grupo de enzimas. Quebram ligações glucosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glucosídico com a formação de uma nova ligação glucosídica (VAN DER MAAREI et al., 2002). A Figura 3 representa um esquema geral da hidrólise do amido por enzimas amilolíticas.

Figura 3 - Esquema geral da hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas



Fonte: VAN DER MAAREI et al., 2002.

As propriedades físicas das amilases podem variar dependendo da fonte e da classificação. Amilases de origem fúngica costumam ter valores de pH ótimos de atuação na faixa de 5-6 e temperatura ótima dentre 55-70 ° C, onde a atividade das α -amilases são favorecidas pela presença do íon Ca^{2+} que irá atuar como um cofator (BRUCHMANN, 1980), enquanto que as amilases de origem bacteriana possuem pH ótimo na faixa de 4-6 e temperatura entre 40-70, nesse caso a atividade das α -amilases são favorecidas pela presença do íon Cl^- (REED, 1975).

Vários trabalhos relatam as propriedades físicas de diferentes amilases, como a da β -amilase que possui estabilidade na faixa de temperatura de 30-50 ° C e pH de 4-6, a α -amilase produzida pela bactéria *Bacillus stearothermophilus* utilizada comercialmente com pH de 4-6 e temperatura de 25-75 ° C e a amiloglucosidase com pH em torno de 4,5-5 e temperatura na faixa de 50-60 ° C (SOCCOL et al., 2005).

3.2.1. Produção de Amilases

As amilases podem ser de origem animal, sendo encontradas em órgãos como o pâncreas e as glândulas salivares, assim como, no plasma e na urina humana, de origem vegetal, obtidas de vegetais superiores como o sorgo malteado, soja, milho e algumas raízes, ou de origem microbiana (HARGER, 1982).

As amilases microbianas podem ser obtidas por bactérias e fungos filamentosos; são produzidas por fermentação submersa e também por fermentação em estado sólido, sendo que as condições de cultivo variam de acordo com o microrganismo e processo empregado para a produção (SOUZA et al., 2010).

Dentre as bactérias destaca-se o gênero *Bacillus*, e as espécies produtoras mais conhecidas são *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. stearothermophilus*. Entre os fungos filamentosos destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* como produtores (SOUZA et al., 2010).

O amido e as substâncias amiláceas são os substratos mais adequados para a obtenção de uma alta produtividade de amilases. As fontes de carbono atuam na regulação da biossíntese, sendo um importante fator utilizado na indução e repressão da enzima (CHERRY; HUSSAIN; ANWAR 2004).

Gancedo (1992) relata que a indução e a repressão catabólica são os principais fatores de controle da síntese de amilase nos microrganismos. O emprego de glucose e outras fontes de carbono facilmente metabolizáveis reprime a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono.

3.2.1.1. Produção de amilase por fermentação em estado sólido

A FES vem se mostrando promissora na produção de enzimas principalmente as de origem fúngica devido ao crescimento microbiano se assemelhar as condições do seu habitat natural o que estimula a produção (ROCHA, 2010).

De acordo com Pandey (1991) diferentes microrganismos podem crescer em substratos sólidos, entretanto, os fungos filamentosos são os microrganismos que melhor se adaptam a estes substratos, tendo um menor número de relatos da utilização de bactérias em FES. Este mesmo autor relata a utilização da FES em escala laboratorial para diferentes propósitos, como a produção de alimentos fermentados tipo koji, micotoxinas, penicilina e enzimas entre elas as amilases. O uso da FES e as suas vantagens para a produção de α -amilases vem sendo discutida (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2000; SILVA, 2012).

A seleção do microrganismo é um importante critério na realização da FES para a produção de enzimas, as α -amilases podem ser produzidas por diferentes tipos de microrganismos como mostrado na Tabela 2 (PANDEY, 1991).

Tabela 2 - Microrganismos utilizados na produção de α -amilases

<i>Bacillus acidocaldrius</i>	<i>Thermonos poraviridis</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Pseudomonas saccharophilus</i>
<i>B. caldolyticus</i>	<i>Aspergillus awamori</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>A. batatae</i>
<i>B. mesentericus</i>	<i>A. candidus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>A. niger</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>A. oryzae</i>
Outros <i>Bacillus spp.</i>	<i>A. terricola</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>A. usmii</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Mucor meihei</i>
<i>Thermoactinomyces vulgaricus</i>	<i>M. pusillus</i>
<i>Thermonos poracurvata</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>T. vulgaricus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Rhizopus javanicus</i>

Fonte: Adaptada de PANDEY, 1991

Alguns trabalhos vêm descrevendo a produção de enzimas por FES, Gangadharan e colaboradores (2006) relataram a produção de α -amilases por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando diferentes resíduos agrícolas suplementado com uma pequena quantidade de solução de sais. Verificaram que o farelo de trigo é um bom substrato para a produção de α -amilases e quando misturado a torta de amendoim aumenta a produtividade da enzima; observaram também que os parâmetros temperatura, pH, fonte de nitrogênio e o solvente utilizado na extração enzimática afetam diretamente na produção por FES.

Rocha (2010) avaliou a aplicação da FES para a produção de diversas enzimas (amilases, celulasas, pectinases, invertases e proteases) por *Aspegillus niger*, utilizando como substrato misturas de farelos e casca arroz e também casca de maracujá. Obteve-se uma maior produção de invertase seguido pela amilase ($14,56 \pm 2,42$ U/g) sendo a casca de maracujá o melhor substrato para a produção dessas enzimas. Foi avaliada também a influência da temperatura no crescimento microbiano, assim como, na produção de enzimas, sendo que a temperatura influencia na produção das amilases.

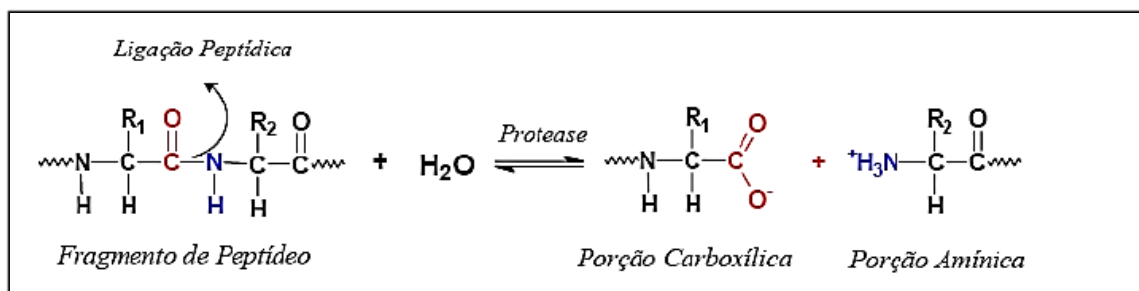
Oliveira e colaboradores (2011) comparam a produção de α -amilases de *Penicillium sp.* por FES e FS. Ambas as fermentações foram conduzidas por 96 h. retirando-se alíquotas a cada 24 h. visando obter picos de produção. Estes autores relatam que a máxima produção da enzima (1.600 U) foi observada na FES tendo como substrato farelo de trigo e a produção obtida no estado sólido foi mais que o dobro do que a obtida por FS.

Spier (2005) utilizou a fécula de mandioca como substrato na produção de α -amilase e amiloglicosidase por fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, tendo ainda o bagaço de cana-de-açúcar como suporte na fermentação em estado sólido. Através de delineamentos experimentais aplicados a superfície de resposta este autor determinou as melhores condições de cultivo para a máxima produção da enzima, e verificou que as proporções de substrato/suporte influenciavam nessa produção, assim como, os parâmetros temperatura, umidade inicial e fonte de nitrogênio.

3.3. PROTEASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E AÇÃO CATALÍTICA

As proteases são enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases, que catalisam a clivagem, por hidrólise, das ligações peptídicas nas proteínas (Figura 4). As enzimas proteolíticas são responsáveis por conduzir modificações altamente específicas e seletivas em proteínas; podem ser de natureza intra ou extracelular, são moléculas de baixo peso molecular, compactas e esféricas (RAO et al., 1998; PILLAI; MANDGE; ARCHANA, 2011).

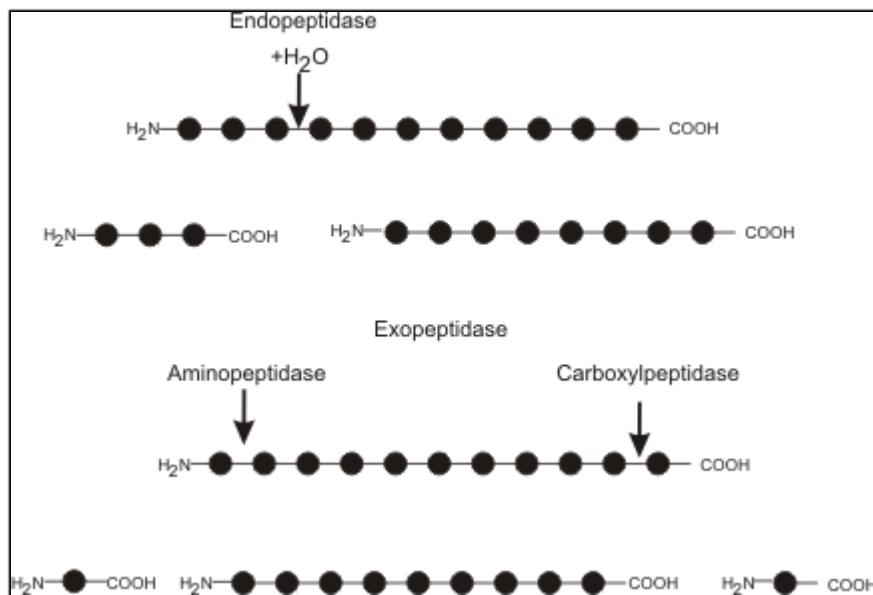
Figura 4 - Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por protease



Fonte: SILVA, 2011

Dependendo do seu sítio de ação, as proteases se subdividem em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases são as responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas próximas aos terminais carbóxi ou amino do substrato. Diferente das exopeptidases, as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes destes terminais (Figura 5) (RAO et al., 1998).

Figura 5 - Sítio de ação das exopeptidases e endopeptidases



Devido a sua ampla diversidade de ação e estrutura as proteases podem ser classificadas com base em três critérios principais: (i) tipo de reação catalisada; (ii) natureza química do sítio catalítico; e (iii) relações evolutivas de estrutura (BARETT, 1994). Essas enzimas ainda são classificadas em seis famílias de acordo com a massa molecular, com suas propriedades elétricas e com sua especificidade ao substrato pela União Internacional de Bioquímica (IUB), sendo elas: serina protease-I; serina protease-II; cisteína protease; aspartil protease; metalo protease-I e metalo protease-II (BEYNON, 1996).

As serina proteases são endopeptidases que hidrolisam ligações peptídicas distantes das extremidades C e N-terminal, o mecanismo de ação está baseado em um ataque nucleofílico das ligações peptídicas por uma serina (Ser) que está presente em seu sítio ativo, entre as mais conhecidas estão a tripsina e a quimiotripsina (RAO et al., 1998).

As cisteína proteases dependem da presença dos resíduos de cisteína e histidina formando uma dupla ligação no sítio catalítico, o mecanismo de ação se assemelha muito ao das serina proteases. Ocorre primeiro a ligação não covalente do sítio ativo da enzima ao grupo carbonila do substrato específico, seguido da acilação da enzima, ou seja, a acil-enzima sofre hidrólise, clivando a ligação peptídica e liberando novamente a enzima (BARETT, 1994; RAO et al., 1998).

As aspartil proteases são endopeptidases que possuem como característica comum a presença de resíduos de aspartato em seu sítio ativo, e grande especificidade por resíduos de aminoácidos volumosos. Os resíduos de aspartato presente no sítio ativo interagem com a molécula de água (nucleófilo), e posteriormente irão agir no substrato específico, clivando a ligação peptídica (RAO, et al., 1998).

As metaloproteases são o grupo de proteases mais diversos, essas moléculas necessitam da presença da ligação de íon de metal divalente, normalmente o zinco em seu sítio ativo. Devido a presença do íon metálico essas enzimas são inibidas pela presença de agentes quelantes.

As propriedades físico-químicas das proteases variam consideravelmente com a fonte e a classificação. Diferentes proteases podem ter sua atividade máxima em diferentes faixas de pH podendo ser ácidas, neutras ou alcalinas. As serino proteases são ativas em pHs neutros a alcalinos, com um valor ótimo entre 7 e 11; as cisteíno proteases são ativas em pHs neutro enquanto que as metalo proteases podem ser ácida, neutras e a alcalinas; já as aspartil proteases são proteases ácidas com um pH ótimo de atuação que varia entre 3 e 4 (RAO et al., 1998).

3.3.1. Produção de Proteases

As proteases ocorrem naturalmente em todos os organismos seja em animais, microrganismos e vegetais. Elas representam cerca de 2 % do genoma humano participando de diversos processos fisiológicos importantes entre eles a síntese de todas as proteínas. Também podem ser extraídas de diversas plantas, como por exemplo a papaína extraída do mamão (RAO et al., 1998).

Nos microrganismos podem ser produzidas ou obtidas de fungos, bactérias, protozoários e leveduras. Há um interesse crescente pelas proteases de

origem microbiana, devido a impossibilidade das proteases de vegetais e animais satisfazerem a demanda mundial de enzimas.

As proteases de origem vegetal requerem um processo de obtenção mais demorado devido à dependência de disponibilização de área para cultivo, sendo as condições climáticas também um fator de demora na obtenção. Da mesma forma, as proteases de origem animal possuem um processo dispendioso devido à dependência da disponibilidade do animal para o abate (RAO et al., 1998).

Na Tabela 3 são descritas as principais proteases de origem vegetal e animal assim como sua fonte.

Tabela 3 - Proteases de origem vegetal e animal

<i>Proteases vegetais</i>	<i>Origem</i>
Papaína	Látex, folhas e talos de mamoeiro (<i>Caricapapaya</i>).
Bromelina	Frutos e talos do abacaxi (<i>Ananascomorus</i>).
Queratinases vegetais	Grupos de vegetais.
<i>Proteases animais</i>	<i>Origem</i>
Tripsina e Quimiotripsina Pepsina e Renina (Quimiosina)	São obtidas de estômagos de suínos (pepsina) e bezerros em período de amamentação (renina).

Fonte: Adaptada de RAO et al., 1998

Devido à facilidade de obtenção e cultivo, as proteases microbianas possuem vantagens em relação às outras fontes de proteases existentes. Dentre os microrganismos, os fungos e as bactérias constituem excelente fonte. Isso ocorre devido à facilidade de manipulação genética e a vasta diversidade bioquímica permitindo que o rendimento de enzimas por fermentação seja maior quando há uma otimização nas condições de cultivo (NEURATH, 1989; SAID; PIETRO, 2002).

O conhecimento das características físico-químicas das enzimas microbianas é importante para a otimização de métodos de produção. A produção de proteases pode ser influenciada por diferentes temperaturas, concentração do substrato e o pH do meio (ZAMOST, 1991).

Bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas para a produção de proteases extracelulares neutras e alcalinas, ativas em faixas de pH que variam de 5 a 8 (neutras) e 10 (alcalinas) (ASHGER et al., 2007; WANG et al., 2007). Dentre os

fungos o *Aspergillus oryzae* relatado como produtor de proteases, tendo a capacidade de produzir os três tipos de protease, neutras, ácidas ou alcalinas (RAO et al., 1998).

São relatados como produtores de proteases os microrganismos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleu*, *Aspergillus niger*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Fusarium graminearum*, *Penecillium griseofufulvin*, *Scedosporium apiosermum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* (ELLAIHAH et al., 2002)

3.3.1.1 Produção de protease por fermentação em estado sólido

A FES tem ganhado crescente interesse dos pesquisadores, devido a sua importância na evolução da biomassa visando a conservação de energia e sua aplicação para a produção de metabólitos secundários com vantagens como a conservação do meio ambiente, neste contexto, a produção de proteases por FES vêm sendo explorada (PANDEY; SOCCOL; MICHELL, 2000).

Prakasham e colaboradores (2006) investigaram a produção de proteases alcalinas por FES utilizando uma cepa de *Bacillus sp* variando concentrações de maltose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. Considerando que para espécies do gênero *Bacillus*, a produção de proteases está fortemente influenciada por fatores físicos (pH, tempo de incubação e temperatura) e componentes do meio, os dados obtidos mostram que os mesmos fatores influenciam quando a fermentação é realizada em estado sólido.

Outros autores relatam a produção de proteases por FES, utilizando diferentes resíduos e microrganismos, como, farelo de trigo e *Rhizopus oryzae* (AIKAT; BHATTACHARYYA, 2000), casa de arroz e *Rhizopus sp* (SUMANTHA et al., 2006), farelo de trigo e *Gliocladium verticilloides* (SILVA; ALMEIDA; CORTES; MARTINS, 2009). Oliveira e colaboradores (2012) ainda comparam a produção de proteases entre três bioprocessos (Fsub, FES com suporte natural e FES com suporte sintético), entre eles a FES com suporte natural resultou na maior produção em menor tempo de fermentação (2035 U totais em 48 h.).

3.4. PRODUÇÃO INDUSTRIAL E APLICAÇÃO DE AMILASES E PROTEASES

3.4.1. Processo Industrial

A produção de enzimas como as amilases e proteases em escala industrial é realizada principalmente por processo submerso, devido à facilidade de controle dos parâmetros fermentativos do meio de cultivo nos biorreatores (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011). A produção comercial de uma enzima envolve as etapas de produção, separação, recuperação e purificação da enzima.

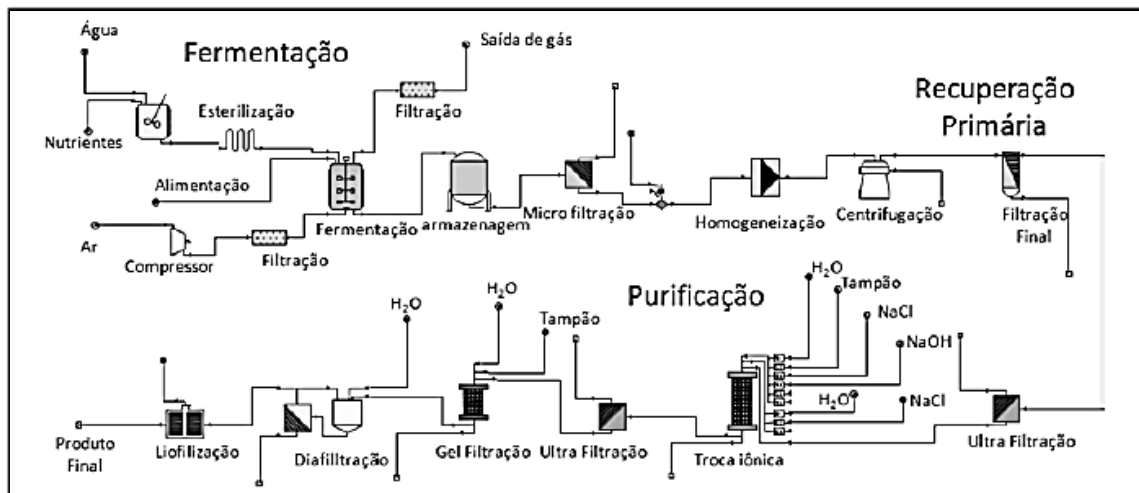
A produção inicia-se com a escolha e obtenção do agente biológico adequado (microrganismo) que produza as enzimas requeridas. Isso pode ser realizado através de isolamento de recursos naturais, compra em coleções de cultura, obtenção de mutantes e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética (MONTEIRO; SILVA, 2009; WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Após a escolha do microrganismo, o mesmo é cultivado em fermentadores para a produção de quantidades industriais do biocatalizador, sendo fundamental a otimização do meio de cultivo (pH, temperatura, aeração e agitação). O processo fermentativo industrial é dividido em duas etapas principais chamadas de upstream (pré-tratamento da matéria prima), que consiste nas etapas de pré-fermentação, e downstream (obtenção do produto), que são as etapas que ocorrem após a fermentação (MONTEIRO; SILVA, 2009; NOVOZYMES, 2014).

As fermentações nas indústrias são realizadas no interior de fermentadores, que são operados em sua grande maioria de modo descontínuo e agitados mecanicamente, podendo também possuir agitadores e dispositivos de aeração para introdução de ar estéril. Esses fermentadores possuem uma capacidade de aproximadamente de 10.000 a 100.000 litros. A temperatura nos fermentadores é controlada via serpentina interna ou encamisamento do biorreator, e o tempo do processo em batelada dura em média de 30 a 150 horas. Após o processo fermentativo o biorreator é resfriado a uma temperatura próxima a 5 ° C, garantindo desta forma a estabilidade do produto além de retardar o desenvolvimento microbiano. O pH então é ajustado para o valor ótimo da enzima alvo, e o meio de cultura segue para a segunda etapa do processo (downstream) (MONTEIRO; SILVA, 2009; WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

O downstream inicia-se com a recuperação do produto. Essa etapa consiste na separação e purificação do produto, realizada através da remoção do material insolúvel (filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação), isolamento primário (extração por solventes, precipitação e ultracentrifugação), purificação (cromatografia, adsorção ou precipitação fracionada) e isolamento do produto final (centrifugação seguida de secagem, liofilização ou secagem por spray drying). A Figura 6 traz um resumo de todas as etapas utilizadas na produção e purificação de enzimas industriais (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Figura 6 - Processo industrial de produção enzimática



Fonte: MONTEIRO; SILVA, 2009.

O mercado mundial de enzimas vem crescendo a cada ano devido a um aumento na produção industrial, e desenvolvimento de novas tecnologias e campos para a aplicação das enzimas. A demanda enzimática necessária para abastecer o mercado já ultrapassa a faixa de bilhões de dólares devido a sua vasta aplicabilidade. Em 2012 a venda de enzimas da Novozymes, uma das empresas dominantes do mercado, chegou a aproximadamente 2,2 bilhões de dólares (NOVOZYMES, 2014).

De acordo com Pandey, Webb, Socool e Larroche (2005) a comercialização das enzimas amilolíticas em 2005 iria ultrapassar a faixa dos 225 milhões de dólares, Politzer e Bom (2006) fizeram uma estimativa de que até 2014 o mercado movimentaria mais de 400 milhões de dólares.

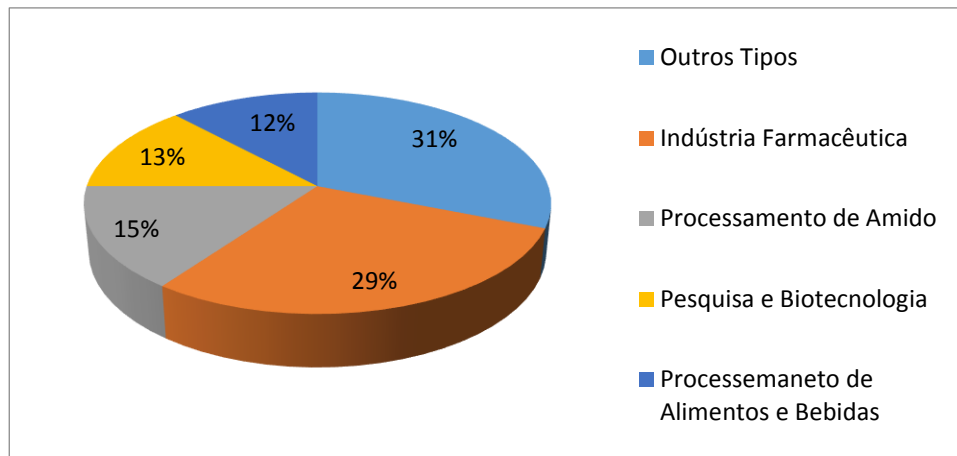
Considerando o aumento significativo do consumo de enzimas há a necessidade da inserção de novas tecnologias enzimáticas no Brasil, já que este

importa grandes quantidades desse produto. No período de 1998 a 2005 o Brasil importou 25.982.968 Kg de enzimas que corresponderam a US\$ 226.100.738,00 e exportou somente 18.441.529 com um rendimento de US\$ 81.123.311,00 refletindo o atraso tecnológico brasileiro (POLITZER; BOM, 2006).

O Brasil possui uma quantidade variada de matérias-primas renováveis, passíveis de serem transformadas via tecnologia enzimática em produtos úteis e com valor agregado (POLITZER; BOM, 2006).

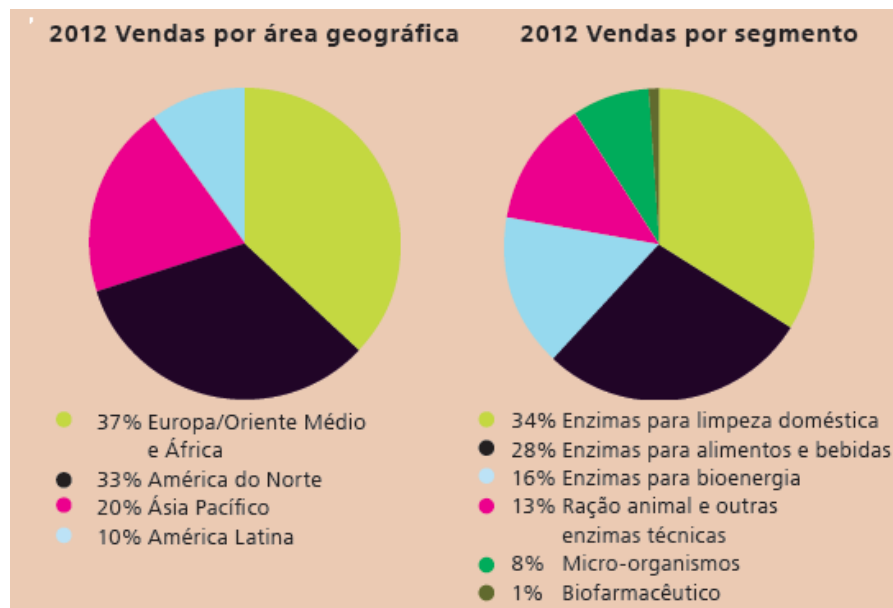
O mercado de enzimas está dividido em dois segmentos principais: indústrias (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, para diagnóstico, para química quiral e para pesquisa) (MONTEIRO; SILVA, 2009). A Figura 7 mostra uma projeção do mercado enzimático e a Figura 8 representa a venda de enzimas por segmento de uma das maiores representantes do ramo.

Figura 7 - Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes segmentos



Fonte: MONTEIRO, SILVA, 2009.

Figura 8 - Venda de enzimas por segmento e por área geográfica da Novozymes



Fonte: NOVOZYMES, 2012

Neste contexto as enzimas proteases e amilases são uma das mais utilizadas pelas indústrias. As amilases representam cerca de 25 % do mercado mundial de enzimas e encontram aplicações em diferentes seguimentos industriais tais como: indústria de panificação, de bebidas alcoólicas, papel e celulose, têxtil, de detergentes e produtos de limpezas, alimentação infantil e alimentação animal. Já as proteases constituem um dos grupos de enzimas extracelulares comerciais mais importantes, presentes em média em 60 % do mercado e em diversos setores industriais.

3.4.2. Aplicações Industriais

3.4.2.1. Indústria de alimentos

As enzimas são utilizadas nas indústrias alimentícias no processamento de alimentos, e sua aplicação nesse seguimento é de grande interesse devido a diversos fatores, tais como, especificidade de ação, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão, fácil controle da reação, adequação às matérias-primas utilizadas, inocuidade e pequena toxicidade (CANILHA; SILVA; CARVALHO; MANCILHA, 2006). Em grande escala as hidrolases são as mais utilizadas na indústria

alimentícia, sendo as amilases e proteases as mais aplicadas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As amilases e proteases são aplicadas na panificação, onde as enzimas têm a função de promover a decomposição do amido. As α -amilases decompõem o amido a maltose, o que caracteriza a maciez e textura da massa, já as proteases são utilizadas para alterar a elasticidade e a textura do glúten em biscoitos e crackers, o que permite a manutenção da forma e tamanho durante o processamento, melhorando também a cor e o sabor do pão (MOTTA, 2011).

As amilases são utilizadas em maior grau na hidrólise do amido diminuindo a viscosidade, sendo as responsáveis pela conversão do amido em dextrose ou xaropes ricos em açúcares simples onde são aplicados em bebidas carbonatadas como os refrigerantes, e também na indústria de sucos de frutas evitando a gelatinização e turvação durante o processamento. Além disso são utilizadas na fabricação de outras bebidas como as cervejas e destilados (CANILHA; SILVA; CARVALHO; MANCILHA, 2006).

As proteases são aplicadas nas indústrias de laticínios, onde a quimosina promove a coagulação do leite para a produção de queijos. Além dos laticínios, as proteases estão presentes nas bebidas destiladas e cervejas, onde são responsáveis pela quebra das proteínas (MONTEIRO; SILVA, 2009; MOTTA, 2011).

Outra aplicação encontrada para as proteases é no processamento de alimentos que requerem a degradação de proteínas em determinadas etapas, como por exemplo, na produção de “papinhas” para bebês, e também no amaciamento de carnes, digerindo proteínas fibrosas presentes nos músculos (MOTTA, 2011).

3.4.2.2. Indústria de papel e celulose

Sendo o papel um produto constituído basicamente por fibras de celulose, para sua obtenção há a necessidade de reduzir a madeira a fragmentos bem pequenos e transformá-los em polpa, que é realizado em sua grande maioria por tratamento químico.

As amilases podem ser aplicadas na produção de papel e celulose no processo de produção de amido modificado, com o intuito de melhorar a impressão e a resistência do papel (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A cobertura do papel com amido é feita para proteger o papel contra danos mecânicos durante a sua produção. Essa cobertura tem também função importante na melhoria da qualidade final do papel: aumenta a resistência do papel e melhora a sua apagabilidade. As α -amilases são utilizadas para diminuir a viscosidade natural da solução de amido utilizada, mantendo a viscosidade constante, de acordo com o tipo de papel desejado (GUPTA et al., 2003).

3.4.2.3. Indústria têxtil

As enzimas são utilizadas na indústria têxtil para alterar as propriedades das fibras têxteis tendo como vantagem em relação aos reagentes químicos, não implicarem qualquer efeito nocivo ao meio ambiente. No processo têxtil as enzimas são utilizadas para a remoção de impurezas não celulósicas através de um procedimento denominado de biopreparação, biopurga ou purga enzimática (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As proteases são aplicadas nesse segmento industrial com o intuito de impedir o encolhimento e melhorar a qualidade de tingimento e do brilho. Estas mesmas enzimas possuem aplicação no processamento da seda, facilitando o manuseio e aumentando a qualidade da fibra, como também na indústria do couro promovendo a degradação seletiva de compostos proteolíticos presentes em peles e pelos, sem destruir o colágeno, e removendo proteínas não fibrosas, como albuminas e globulinas, que são indesejáveis ao processo (GUPTA, BEG, 2002; MOTTA, 2011).

As α -amilases são utilizadas na indústria têxtil no acabamento dos tecidos ou roupas que contém uma camada de amido, já que durante o processo de tecelagem os fios são protegidos com uma camada de amido que tem função de proteger os fios. A remoção é realizada de forma seletiva para que as fibras dos tecidos não sejam danificadas. As amilases também são utilizadas no processo de desengomagem (PY-DANIEL, 2010).

3.4.2.4. Indústria farmacêutica

Na indústria biotecnológica as enzimas são os produtos microbianos mais explorados depois dos antibióticos, sendo que a indústria farmacêutica

representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. Podendo encontrar aplicações tanto no desenvolvimento de novos produtos e na produção de medicamentos, como também em diagnóstico clínico e terapia. Além de serem empregadas no mercado de cosmético que se encontra em alta expansão (MONTEIRO; SILVA, 2009; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

As enzimas apresentam uma diversidade de aplicações que vai desde auxiliar na digestão, debridamento e cicatrização de feridas até terapia anticâncer. A Tabela 4 resume as principais aplicações das amilases e proteases quando utilizadas em terapia (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Tabela 4 - Principais aplicações das amilases e proteases utilizadas em terapias

Enzimas	EC	Fonte	Aplicação
Papaina	E.C. 3.4.22.2	Látex de Caricapapaya	Auxiliar na digestão de proteínas em pacientes com dispepsia crônica e gastrite. Pode ser utilizada também como nematicida.
Quimiotripsina	E.C. 3.4.21.1	Pâncreas de bovinos	Auxiliar de digestão/protease
Tripsina	E.C. 3.4.21.4	Pâncreas de bovino	Auxiliar de digestão; debridamento de úlceras
Bromelina	E.C. 3.4.22.32	Caule de ananás comosus	Empregada em processos inflamatórios de origem traumática, cirúrgico infecciosa, vascular e reumática. Pode também ser usada como auxiliar tratamento de queimaduras de grau elevado.
α - Amilase	E.C. 3.2.1.1	Pâncreas Suíno	Usada no tratamento da deficiência de secreção do suco pancreático e nas inflamações crônicas do pâncreas, entre outros benefícios.

Fonte: Adaptado de MONTEIRO; SILVA, 2009.

Em indústrias de cosméticos as proteases são aplicadas em peeling, estrias, depiladores progressivos, controle de oleosidade e seborreia (MONTEIRO; SILVA, 2009).

3.4.2.5. Indústria de detergentes

Atualmente, as enzimas consistem um dos ingredientes empregados na constituição dos detergentes. As vantagens da aplicação de enzimas em detergentes são: proporcionam condições mais suaves de uso do que em detergentes que não contêm enzimas e enzimas são 100% biodegradáveis e não são tóxicas ao meio ambiente. As amilases e proteases são largamente empregadas nas indústrias de detergentes desempenhando diversas funções (GUPTA et al., 2003).

As proteases são utilizadas na limpeza de roupas, lentes de contato e dentaduras, devido a sua capacidade de remover compostos proteicos presentes em restos de comida, sangue, entre outros (NOVOZYMES, 2014). Elas são amplamente aplicadas nas indústrias de detergentes, pois possuem atividade e estabilidade em altos pHs e temperaturas, e compatibilidade com quelantes e oxidantes, o que facilita o seu emprego nos detergentes (BHUNIA; BASAK; DEY, 2012).

Já as amilases são utilizadas para garantir estabilidade perante os oxidantes presentes nas formulações dos detergentes e potencializar seu desempenho (BHUNIA; BASAK; DEY, 2012; NOVOZYMES, 2014).

3.4.2.6. Alimentação animal

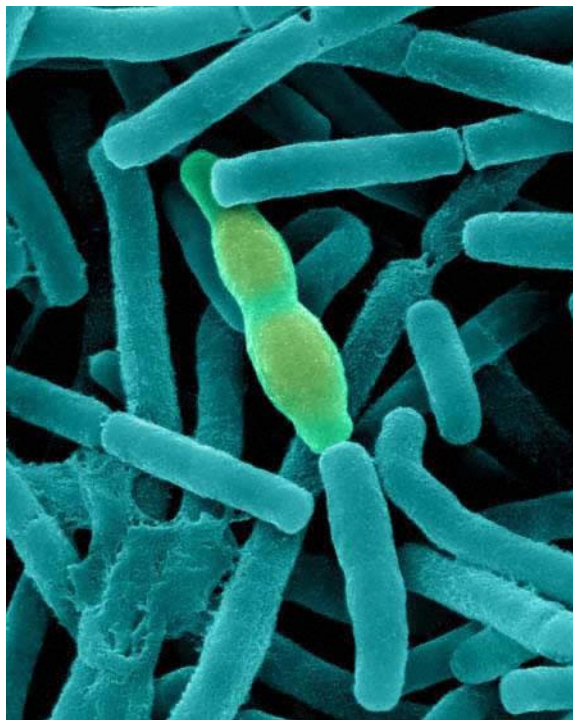
As proteases são empregadas em rações animais para aumentar o valor nutritivo e aumentar a digestibilidade. As amilases aumentam a digestibilidade das reações no sistema digestivo dos animais, diminuindo a quantidade de estrume e gases liberados ao meio ambiente. Amilases auxiliam também na alimentação de animais após o desmame por facilitar a digestão da ração por sistemas digestivos imaturos (NOVOZYMES, 2014).

Encontra-se no mercado (empresa Enzyme Development Corporation) combinações enzimáticas para a comercialização, dentre essas as amilases fúngicas, para auxiliar na alimentação animal com diferentes substratos.

3.5. *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* MO.04B

Bactérias do gênero *Bacillus* (Figura 9) são gram-positivos formadores de esporos (endósporos), sendo aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. Este gênero tem como característica uma intensa atividade metabólica devido a produção de enzimas que degradam muitos substratos orgânicos (MARTINS; MARTINS; BARBOSA, 2013).

Figura 9 - Representação dos bastonetes do gênero *Bacillus*

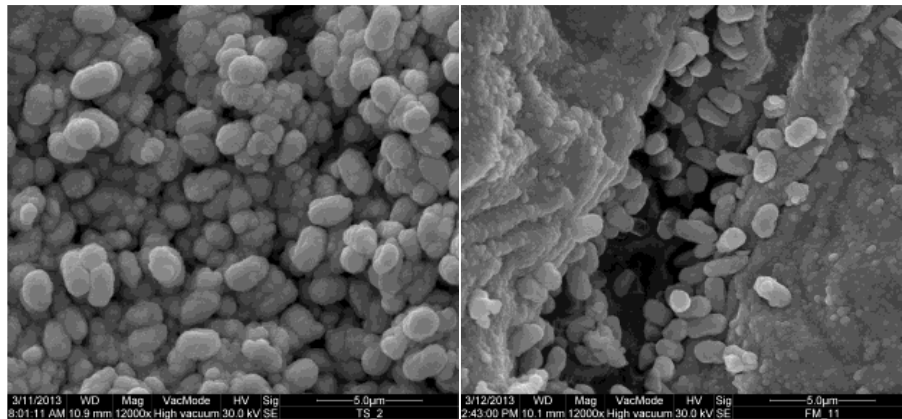


Espécies de *Bacillus* podem ser encontradas em diferentes habitats, sendo poucas espécies patogênicas aos vertebrados e invertebrados (HOLT et al., 1994).

O gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas, sendo que as enzimas produzidas pela espécie *B. amyloliquefaciens* e por *B. licheniformis* representam aproximadamente 50 % das enzimas bacterianas comerciais. Esta produção se deve às condições de cultivo (temperatura e pH) destes dois microrganismos, o que facilita o crescimento, além de serem espécies não patogênicas (GOMES, 2012).

Bacillus amyloliquefaciens (Figura 10) é uma bactéria gam-positivo, de tamanhos variados entre 0,7 a 3,0 μm , são bastonetes móveis por flagelos peritricos e esporogênicos e com temperatura ótima de crescimento que varia de 30 a 40 ° C (WELKER; CAMPBELL, 1967; PRIEST et al., 1987).

Figura 10 - Eletromicrografias de *B. amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos substratos farelo de soja e farelo de milho



Fonte: MASSI, 2014.

Originalmente isolada de solos foi primeiramente citada por Fukomoto (1943) e classificada devido a sua habilidade de secretar grandes quantidades de amilases (MILNER; MARTIN; SMITH, 1997). Devido a sua semelhança com a espécie *Bacillus subtilis*, já foi considerada como uma subespécie desta. Atualmente sabe-se que essas duas espécies são fenotipicamente semelhantes e metabolicamente diferentes possuindo menos de 25 % de homologia entre seus DNAs (PRIEST et al., 1987).

B. amyloliquefaciens possui altos níveis de produção de enzimas extracelulares, é uma das espécies mais utilizadas para a produção de α -amilase e proteases. Além destas enzimas, o *B. amyloliquefaciens* é capaz de produzir diversas outras enzimas como: xilanase, galactanase, serina protease, isoamilase, mananase, metal protease, fosfatase alcalina, ribonuclease (ABATE et al., 1999; SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005).

Além de sua utilização para a produção de enzimas, esse tipo de bactéria apresenta também características atrativas para o controle biológico de doenças em plantas (BETTIOL; KIMATI, 1990; KREBS; JUNGE; OCKHARDT, 1993; SHARMA; GOMES, 1999). O gênero ainda é reconhecido comercialmente como

produtor de antibióticos, compostos químicos, inseticidas, biossurfactantes e enzimas. Trabalhos publicados destacam as espécies de *Bacillus* como as dominantes no mercado de biossurfactantes (SCHALLMEY et al., 2004; CALVO et al., 2004).

A cepa *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b foi originalmente isolado de solo contaminado com petróleo por Granzotto (2010). Pedro (2012) avaliou a capacidade dessa cepa desenvolver-se sob condição de FES nos substratos farelo de soja e milho, casca de arroz e bagaço de cana, e padronizou as melhores proporções entre substrato e solução umedecedora para que a fermentação fosse eficiente. Santos (2012) observou que esta mesma bactéria quando cultivada em condições de FES produz enzimas extracelulares, entre elas, as amilases e proteases.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus amyloliquefacieans* MO.04b, cepa originalmente isolada de solo contaminado com petróleo proveniente das proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. André Luís Martinez de Oliveira do Depto de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. Esta cepa foi mantida em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado de Dyg's, sob refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ com repiques trimestrais.

4.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais utilizados na FES foram: bagaço de cana-de-açúcar (obtido de garapeiro na cidade de Sertanópolis/PR) lavado até toda extração do açúcar, casca de arroz (cedida pela beneficiadora Máquina de Arroz Yara-Londrina/PR), farelo de soja (cedida pela Granosul Agroindustrial-Cambé/PR) e farelo de milho obtido de beneficiadoras locais. Estes resíduos (Figura 11) foram utilizados nas fermentações da forma como foram obtidos sem nenhum tipo de processamento prévio. A tabela 5 traz a composição centesimal dos resíduos utilizados.

Figura 11 - Substratos farelo de soja (a), farelo de milho (b), casca de arroz (c) e bagaço de cana-de-açúcar (d) utilizados na FES



Fonte: Próprio Autor

Tabela 5- Composição centesimal dos resíduos agroindustriais.

	Umidade	Cinzas	Lípídeos	Proteínas	Carboidratos
Farelo de soja	24 %	4 %	5 %	47 %	14 %
Bagaço de cana	22 %	2 %	7 %	2 %	61 %
Casca de arroz	22 %	14 %	12 %	2 %	39 %

4.3 MEIOS DE CULTIVO

4.3.1 Meio de Manutenção (Dyg's)

- Extrato de levedura (0,4 g)
- Fosfato monoácido de potássio (0,1 g)
- Glucose (0,4 g)
- Peptona (0,3 g)
- Sulfato de magnésio (0,1 g)
- Ágar (2 %)
- Água destilada (q.s.p. 200 mL)

4.3.2 Meio de Sais Minerais (MSM)

O meio de sais minerais foi preparado segundo Camilios Neto (2010) com a seguinte composição:

- KH_2PO_4 (3,0 g)
- K_2HPO_4 (7,0 g)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g)
- Água destilada (q.s.p 1000 mL)

4.4. PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 50 mL contendo 9 mL de solução de sais acrescido de 1 mL de glucose 2 % como fonte de carbono. A bactéria foi transferida da cultura estoque assepticamente com auxílio de alça de platina para este meio. Os frascos foram então incubados por 24 horas a 37 ± 2 ° C e 180 rpm em Shaker orbital. Após este período 200 µL da suspensão de células obtida foi utilizada como inóculo.

4.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

4.5.1. Preparo dos Cultivos

A fermentação em estado sólido foi realizada em Erlenmeyers de 50 e 125 mL, contendo de 1,5 a 3,75 g, respectivamente, de substrato seco umedecido inicialmente com MSM de modo a obter uma umidade inicial de aproximadamente 80 %. Os substratos já umedecidos foram esterilizados duas vezes em autoclave por 20 min., a 121 ° C. Os frascos foram então inoculados com 200 µL de suspensão de células do inóculo e mantidos por 24 horas, à temperatura de 37 ± 2 °C em estufa bacteriológica. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e um controle, onde o microrganismo não foi inoculado.

4.5.2. Interrupção dos Cultivos e Obtenção do Extrato Livre de Células (ELC)

Ao final da fermentação foram adicionados 10 mL de água destilada aos frascos de Erlenmeyers. O conteúdo dos frascos foi homogeneizado em Shaker orbital durante 30 minutos a 180 rpm. Posteriormente o material foi centrifugado a 9000 rpm e 4 ± 2 °C por 15 min., para a obtenção do ELC que foi congelado e utilizado para determinações analíticas.

4.5.3. Diálise dos Extratos Livres de Células

Os ELC obtidos foram transferidos para saquinhos confeccionados com papel celofane comum previamente umedecidos com água destilada. Os

saquinhos contendo de 2 a 5 mL de amostra foram imersos água destilada (Figura 12) em um Béquer de 2000 mL, que foi mantido sob agitação por 24 horas realizando-se três trocas da água neste período.

Figura 12 - Diálise dos extratos livres de células em papel celofane em água destilada



Fonte: Próprio Autor

4.6 ENSAIOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE

4.6.1. Curva de Crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em Fermentação Submersa para a Padronização do Tempo de Inóculo

Os cultivos foram preparados em Erlenmeyers de 50 mL com 10 mL de MSM contendo 0,2 % (p/v) de glucose como fonte de carbono, a bactéria foi transferida para este meio a partir da cultura estoque assepticamente com auxílio de alça de platina. Os frascos foram incubados a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e 180 rpm em Shaker orbital, nos seguintes períodos de tempo: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas. Decorrido estes períodos, foram realizadas diluições seriadas dos cultivos (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000), sendo em seguida 200 μL dessas diluições plaqueadas em meio sólido de Dyg's e incubadas por 24 horas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$. As unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram então contadas.

4.6.2. Padronização da Fermentação em Estado Sólido nos Substratos Farelo de Soja (FS) e Farelo de Milho (FM)

4.6.2.1. Determinação do volume de inóculo

Para avaliar o melhor volume de inóculo utilizado para a fermentação em estado sólido, foram realizadas FES com os seguintes volumes de suspensão de células: 100, 200, 300, 400 e 500 μL . As fermentações foram interrompidas de acordo com o item 4.5.2 e a resposta desta análise foi a atividade enzimática.

4.6.2.2. Determinação da composição da solução umedecedora

Diferentes soluções umedecedoras para hidratar os substratos sólidos e disponibilizar alguns substratos solúveis foram utilizadas para a realização da fermentação em estado sólido, sendo elas: água; meio de sais minerais (MSM); MSM + glucose 1 % (m/v); MSM + YE 1 % (m/v); MSM + glucose 1 % + YE 1 % (m/v). As fermentações foram interrompidas após 24 horas e a resposta deste teste foi a atividade enzimática.

4.6.2.3. Cinética de produção de amilase e protease

Os substratos FS e FM foram umedecidos com MSM + glu 1 % + YE 1 % para a realização das FES, 200 μL de suspensão de células foi inoculado a estes resíduos e as fermentações foram interrompidas em diferentes tempos. Os ELC foram dialisados e determinada a atividade da amilase e da protease. Os tempos avaliados foram: 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24, 30, 36 e 48 horas.

4.6.2.4. Adição do bagaço de cana-de-açúcar à mistura dos substratos FS e FM

Farelo de soja, farelo de milho e bagaço de cana-de-açúcar foram misturados em três diferentes proporções (1:1:1, 1:1:2, 1:1:3), sendo que a quantidade de farelo de soja e de farelo de milho manteve-se constante variando somente a proporção do bagaço de cana. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers

de 125 mL contendo 3,75 g da mistura desses resíduos, umedecidos com 25 mL MSM + glu 1 % + YE 1 %, inoculados com 200 μ L de suspensão de células e mantidos em BOD à 37 ± 2 ° C por 36 horas para a produção de amilase e 9 horas para a produção de protease. As fermentações foram interrompidas, os ELC dialisados e as atividades enzimáticas determinadas.

4.6.3. Utilização dos Substratos Bagaço de Cana-de-Açúcar ou Casca de Arroz como Agente de Estruturação na Produção de Amilase e Protease em Farelo de Soja

Dois resíduos agroindustriais foram empregados como agente de estruturação na fermentação em estado sólido de modo a facilitar a aeração do meio, os resíduos utilizados foram a casca de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar. Para a realização do experimento cultivou-se o microrganismo no substrato farelo de soja + casca de arroz (proporção 1:1) e em farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar (proporção 1:1), umedecidos com MSM + glu 1 % + YE 1 % e cultivado por 36 horas para a produção de amilase e 9 horas para a produção de protease. As fermentações foram interrompidas, os extratos livres de células dialisado e as atividades enzimáticas determinadas.

4.7. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.7.1. Determinação da Atividade Enzimática

4.7.1.1. Determinação da atividade amilolítica

Nos tubos reacionais foram colocados 0,5 mL de amido 1 % acrescido de 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados em banho termostaticado por 10 min a 40 ° C. Em seguida 0,25 mL desta mistura foi transferida para tubos de ensaios contendo 0,25 mL de DNS. A mistura reativa foi fervida por 10 min. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de água destilada para a realização das leituras a 540 nm (os testes foram realizados em duplicata). Para a obtenção do branco adicionou-se em tubo de ensaio 0,125 mL de extrato enzimático, 0,250 mL de DNS e 0,125 mL de amido 1 % necessariamente nesta ordem, que foi incubado nas mesmas condições

que os tubos reacionais. As leituras de absorvância foram feitas a 540 nm de acordo com MILLER (1959) com algumas adaptações. A unidade enzimática foi definida como a quantidade em μg de açúcares redutores liberados por mL e por minuto nas condições da reação.

4.7.1.2. Determinação da atividade proteolítica

Alíquotas de 500 μL de ELC foram incubadas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ por 1 hora com 250 μL do tampão glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 e 250 μL de soro albumina bovina 5 mg/mL. A reação foi interrompida com a adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. A concentração de tirosina solúvel do sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree (1972), utilizando a equação obtida da curva de calibração construída com soro albumina bovina e absorvância em 650 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) foi definida como a quantidade de μmoles de tirosina solúvel liberada por mL do extrato enzimático por minuto, nas condições da reação.

4.7.2. Determinação do pH (Inicial e Final)

O pH foi determinado por potenciometria utilizando-se um pHmêtro MARCONI (modelo PA 200).

4.7.3. Determinação das Proteínas Totais Solúveis

4.7.3.1. Metodologia de Hartree

O método de Hartree é baseada em duas etapas onde a primeira consiste na reação da proteína com o reativo cupro-alcálico formando um complexo, e a segunda é a etapa de redução dos sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin Ciocalteu pela tirosina presente nas proteínas. Como padrão foi utilizado uma solução de soro albumina bovina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o preparo da curva de calibração.

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE

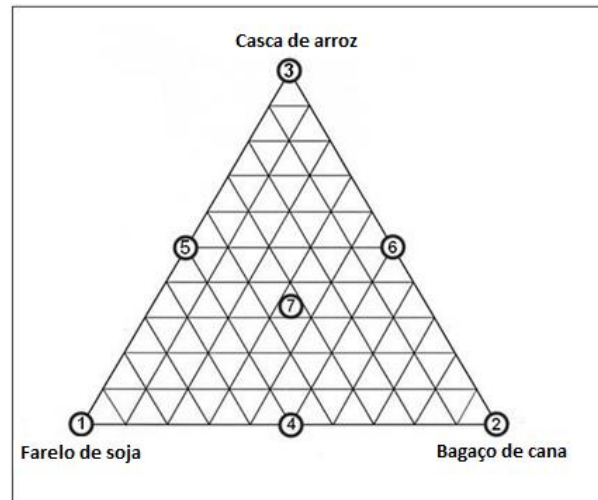
Foi utilizado um planejamento de misturas do tipo simplex-centróide (Figura 13) composto de 7 ensaios com duas repetições no ponto central. O desenho foi implementado utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StaSoft Inc. Tulsa, OK, USA), os fatores definidos como variáveis independentes foram farelo de soja (X_1), bagaço de cana-de-açúcar (X_2) e casca de arroz (X_3). O peso de cada substrato variou de 0 a 3,75 g (Tabela 6).

Tabela 6 – Codificação do delineamento experimental simplex centroide

Ensaio	Mistura			
	Codificada ($x_1; x_2; x_3$)*	X_1 *	X_2 *	X_3 *
1	(1; 0; 0)	3,75	0	0
2	(0; 1; 0)	0	3,75	0
3	(0; 0; 1)	0	0	3,75
4	($\frac{1}{2}; \frac{1}{2}; 0$)	1,875	1,875	0
5	($\frac{1}{2}; 0; \frac{1}{2}$)	1,875	0	1,875
6	(0; $\frac{1}{2}; \frac{1}{2}$)	0	1,875	1,875
7	($\frac{1}{3}; \frac{1}{3}; \frac{1}{3}$)	1,25	1,25	1,25
8	($\frac{1}{3}; \frac{1}{3}; \frac{1}{3}$)	1,25	1,25	1,25
9	($\frac{1}{3}; \frac{1}{3}; \frac{1}{3}$)	1,25	1,25	1,25

* X_1 – Farelo de soja; X_2 – Bagaço de cana-de-açúcar; X_3 – Casca de arroz

Figura 13: Delineamento experimental simplex centroide para 3 componentes



O planejamento foi testado quanto à significância dos modelos matemáticos e dentre os modelos significativos foi escolhido o que apresentava maior adequação aos dados. Foi determinada a equação completa do modelo ajustado por análise de regressão, considerou-se apenas os dados que influenciaram significativamente. O modelo quadrático para uma mistura com três componentes é dado pela equação:

$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

4.9 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA PROTEASE

4.9.1 Determinação da Temperatura e pH Ótimo para a Atividade Proteolítica

4.9.1.1 Determinação da temperatura ótima

Foi utilizada a metodologia de atividade proteolítica já descrita no item 4.7.1.2, variando-se apenas as temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas foram: 25, 35, 50, 65 e 75 ° C.

4.9.1.2 Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica

O ensaio para o pH ótimo da atividade proteolítica foi realizado da mesma forma descrita no item 4.7.1.2, substituindo-se apenas o tampão glicina-NaOH pH 9,5 pelo tampão fosfato nos pHs 3, 4, 5,5, 7 e 8.

4.9.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação da temperatura e do pH ótimos da protease

A temperatura e o pH ótimo também foram determinados utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 7).

A temperatura foi variada de 25 a 75 ° C e o pH de 3 a 8 e a atividade proteolítica determinada.

Tabela 7: Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2

Experimentos	Codificado (real)		Descodificado	
	pH	T (° C)	pH	T (° C)
	X ₁ (X1)	X ₂ (X2)	X1	X2
1	-1	-1	4,0	35
2	-1	+1	4,0	65
3	+1	-1	7,0	35
4	+1	+1	7,0	65
5	-1,41	0	3,0	50
6	+1,41	0	8,0	50
7	0	-1,41	5,5	25
8	0	+1,41	5,5	75
9	0	0	5,5	50
10	0	0	5,5	50
11	0	0	5,5	50

4.9.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da protease foi avaliada incubando-se o extrato enzimático por 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 ou 120 minutos nas temperaturas de 30, 50 e 70 ° C. Após este período de pré-incubação, foi realizado o ensaio enzimático empregando o substrato soro albumina bovina e utilizando as condições ótimas de temperatura e pH estabelecidas para a enzima. A atividade residual da enzima neste teste foi expressa como porcentagem da atividade enzimática apresentada no tempo zero (controle).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de dois artigos, intitulados “**Utilização de farelo de soja, farelo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz na produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**”, que está apresentado no Apêndice A; “**Aplicação do delineamento simplex-centróide na produção de protease ácida de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em farelo de soja**”, que está apresentado no Apêndice B.

Os artigos foram elaborados segundo normas da Revista Brazilian Journal of Microbiology, as quais estão apresentadas no Anexo A.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo 1. “Utilização de farelo de soja, farelo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz na produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b”

Título:

“Utilização de farelo de soja, farelo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz na produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.”

"Use of by-product and agricultural waste in the production of amylase and protease by *Bacillus amyloliquefaciens* MO. 04b."

Autores:

Letícia Mileny Santos¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹ e Maria Inês Rezende¹.

Afiliação:

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondência do autor:

Maria Inês Rezende¹

E-mail: mirezende@uel.br Tel: +55 43 3371 - 4812 – Fax: + 55 43 3371 - 4216

RESUMO

1
2
3 Farelo de soja e farelo de milho foram utilizados como substratos para a produção de
4 amilases e proteases pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, a fermentação em estado
5 sólido (FES) foi padronizada referente ao inóculo através da contagem das UFC/mL em
6 meio Dygs, melhor solução umedecedora dos substratos agrícolas para a produção das
7 enzimas, melhor tempo de fermentação e seleção de resíduo agroindustrial como agente
8 de estruturação na FES. A maior proliferação celular do inóculo em meio líquido ocorreu
9 com 18 horas de fermentação ($6,6 \times 10^7$ UFC/mL), a melhor solução umedecedora para
10 a produção das enzimas na maioria dos cultivos foi a que continha meio de sais minerais
11 + glucose 1 % + YE 1 %, o melhor tempo de fermentação em relação a produção das
12 enzimas foi de 9 horas para a produção de protease em farelo soja (11,742 U/mL) e 36
13 horas para a produção de amilase em farelo de milho (0,27 U/mL) e farelo de soja (1,36
14 U/mL), dentre os resíduos agrícolas testados como agentes de estruturação na FES em
15 conjunto com o farelo de soja, a casca de arroz favoreceu a produção de protease (11,179
16 U/mL) e o bagaço de cana-de-açúcar a produção de amilase (3,621 U/mL). Os resultados
17 sugerem que o farelo de soja é um ótimo substrato para a produção das enzimas e que
18 nas condições propostas as amilases e as proteases não são obtidas em conjunto pelo
19 *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, a produção de protease é mais expressiva que a de
20 amilase.

21

22 **Palavras-chave:** Subprodutos agroindustriais, *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b,
23 amilases, proteases e fermentação em estado sólido

24 1 INTRODUÇÃO

25

26 O Brasil é um país de grande importância no cenário agrícola mundial
27 sendo um dos grandes produtores de soja e milho no mundo. Segundo a Embrapa (2014)
28 a produção de soja no Brasil atingiu 85,656 milhões de toneladas na safra de 2013/2014
29 sendo que a produção mundial foi de 288,873 milhões de toneladas. O milho obteve uma
30 produção próxima 82 milhões de toneladas tendo o Brasil como o terceiro maior produtor
31 deste grão. Após serem processados esses grãos fornecem subprodutos bastante
32 nutritivos, o farelo de soja e o farelo de milho, que podem ser utilizados para obtenção de
33 diferentes produtos (Pandey, 2003).

34 A fermentação em estado sólido (FES) é uma estratégia tecnológica para
35 o aproveitamento desses subprodutos de baixo custo e rica composição nutricional
36 (Pandey, 2003). Ela é descrita como um processo realizado por microrganismos, sobre
37 ou dentro das partículas do substrato, em baixo teor de umidade, a água presente neste
38 sistema é suficiente para garantir o crescimento dos microrganismos, mas não encontra-
39 se de forma livre possibilitando a produção de diversos metabólitos de interesse entre
40 eles as enzimas (Pandey *et al.*, 2000; Soccol; Vandenberghe, 2000).

41 Amilases e proteases apresentam grande importância na biotecnologia
42 com um amplo campo de aplicações, dominando grande parte do mercado industrial
43 mundial aproximadamente 80 % (Gupta *et al.*, 2003; Monteiro; Silva, 2009; Prakashan *et*
44 *al.*, 2006). Essas enzimas são produzidas no metabolismo dos microrganismos, e um dos
45 gêneros mais empregados na produção industrial é o *Bacillus*. A espécie
46 *amyloliquefaciens* é a mais utilizada na produção de α -amilases e proteases por
47 fermentação submersa (Abate *et al.*, 1999; Gomes, 2012), contudo, quase não há relatos

48 de sua produção por FES (Gangadharan *et al.*, 2006; Akcan; Uyar, 2012; Prakashan *et*
49 *al.*, 2006; Silva, 2012).

50 O Brasil também destaca-se como produtor de arroz e cana de açúcar,
51 anualmente há um acúmulo de grandes quantidades de casca de arroz e bagaço de cana-
52 de-açúcar, estes resíduos são menos ricos em proteínas, porém, podem ser empregados
53 na FES, desempenhando um papel importante como agentes de estruturação,
54 proporcionando condições mais favoráveis para o crescimento microbiano em baixo teor
55 de umidade (Batham *et al.*, 2013).

56 Sendo assim, este trabalho teve a finalidade de estudar a produção de
57 amilase e protease pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b por FES em dois subprodutos
58 da agroindústria, o farelo de soja e o farelo de milho, assim como, avaliar a inserção da
59 casca de arroz e do bagaço de cana-de-açúcar como agentes de estruturação na
60 fermentação em estado.

61 2 MATERIAIS E MÉTODOS

62

63 2.1 MICRORGANISMO

64

65 O microrganismo utilizado foi o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, cepa
66 originalmente isolada por Granzotto e colaboradores (2012) de solo contaminado com
67 petróleo proveniente das proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR).

68

69 2.2 PREPARO DO INÓCULO

70

71 O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 50 mL contendo 9 mL de
72 meio de sais minerais segundo Camilios-Neto (2010) acrescido de 1 mL de glucose 2 %
73 (m/v), incubados por 24 horas a 37 ± 2 ° C e 180 rpm em Shaker orbital. Após este período
74 200 µL da suspensão de células obtida foi utilizada como inóculo (aproximadamente $6,6$
75 $\times 10^7$ UFC/mL) (Papi, 2013).

76

77 2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: PREPARO E INTERRUPÇÃO

78

79 Para a realização da fermentação em estado sólido utilizou-se como
80 substrato farelo de soja (FS) e o farelo de milho (FM), os cultivos foram realizados em
81 Erlenmeyers de 50 mL com 1,5 g dos substratos. Os substratos foram inicialmente
82 umedecidos com uma solução contendo meio de sais minerais (Camilios-Neto, 2010) e
83 esterilizados em autoclave. Os frascos foram inoculados com 200 µL de suspensão de

84 células e mantidos a 37 ± 2 ° C por 24 horas em estufa bacteriológica. Todos os
85 experimentos foram realizados em triplicatas mais um controle, onde o microrganismo
86 não foi inoculado.

87 O extrato livre de células (ELC) foi obtido com a adição de água destilada
88 aos substratos fermentados, que foram então homogeneizados em Shaker à 180 rpm por
89 30 minutos, a suspensão foi centrifugada a 9000 rpm por 15 minutos a 4 ° C. O
90 sobrenadante foi dialisado por 24 horas em água destilada e utilizado para a
91 determinação da atividade enzimática.

92

93 2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

94

95 2.4.1 Atividade Amilolítica

96

97 A atividade amilolítica foi determinada segundo Miller (1959) com
98 algumas modificações (Moreira *et al.*, 1999). Os tubos reacionais continham 500 µL de
99 amido 1 % acrescido de 500 µL de extrato enzimático, incubados por 10 min a 40 ° C.
100 Em seguida 250 µL da mistura foi reagida com 250 µL de DNS em banho fervente por 10
101 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 2,5 mL de água destilada e as leituras
102 da absorvância realizada à 540 nm. A unidade enzimática foi definida como a quantidade
103 em µg de açúcares redutores liberados por mL e por minuto nas condições da reação.

104

105 2.4.2 Atividade Proteolítica

106

107 A atividade proteolítica foi determinada pela quantificação dos peptídeos
108 solúveis em ácido tricloro acético (TCA) 10 %. O substrato utilizado para essa
109 determinação foi uma solução de soro albumina bovina 5 mg/mL. Adicionou-se 500 µL
110 do extrato enzimático em 250 µL do substrato e 250 µL de tampão glicina-NaOH pH 9,5
111 e incubado em banho Maria a 37 ° C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de
112 250 µL de TCA e a solução, centrifugada a 9000 rpm por 15 minutos a 4 ° C. A
113 concentração de peptídeo foi determinada pelo o método de Hartree (1972) no
114 comprimento de onda de 650 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) foi
115 definida como a quantidade de µmoles de tirosina solúvel liberada por mL do extrato
116 enzimático por minutos, nas condições da reação.

117

118 2.5 ENSAIOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE

119

120 2.5.1 Curva de Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em Fermentação

121 Submersa para a Padronização do Tempo de Inóculo

122

123 Os cultivos foram preparados em Erlenmeyers de 50 mL com 10 mL de
124 MSM contendo 0,2 % (p/v) de glucose como fonte de carbono, a bactéria foi transferida
125 assepticamente para este meio. Os frascos foram incubados a 37 ± 2 ° C e 180 rpm em
126 Shaker orbital, nos seguintes períodos de tempo: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas, em
127 seguida foram realizadas diluições seriadas dos cultivos (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000),
128 sendo que 200 µL dessas diluições foram plaqueadas em meio sólido de Dyg's e
129 incubadas por 24 horas a 37 ± 2 ° C. As unidades formadoras de colônias (UFC/mL)
130 foram então determinadas.

131 2.5.2 Padronização da Fermentação em Estado Sólido nos Substratos Farelo de Soja e
132 Farelo de Milho

133

134 2.5.2.1 Determinação da composição da solução umedecedora

135 Diferentes soluções umedecedoras para hidratar os substratos sólidos e
136 disponibilizar alguns substratos solúveis foram utilizadas: água; meio de sais minerais
137 (MSM) (2); MSM + glucose 1 %; MSM + YE 1 %; MSM + glucose 1 % + YE 1 %. As
138 fermentações foram interrompidas após 24 horas e a resposta deste teste foi a atividade
139 enzimática.

140

141 2.5.2.2 Cinética de produção de amilase e protease

142

143 Os substratos FS e FM foram umedecidos com MSM + glu 1 % + YE 1
144 %, 200 µL de suspensão de células foi inoculado a estes subprodutos agrícolas e as
145 fermentações foram interrompidas em diferentes tempos: 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24, 30, 36 e
146 48 horas. Os ELC foram dialisados e então determinada a atividade da amilase e da
147 protease.

148

149 2.5.2.3 Avaliação de agentes de estruturação na produção de amilase e protease em
150 farelo de soja

151

152 Os resíduos casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar foram
153 empregados como agentes de estruturação na fermentação em estado sólido de modo a
154 facilitar a aeração do meio. Para a realização do experimento cultivou-se o microrganismo

155 no substrato farelo de soja + casca de arroz (proporção 1:1) e em farelo de soja + bagaço
156 de cana-de-açúcar (proporção 1:1), umedecidos com MSM + glu 1 % + YE 1 % e cultivado
157 por 36 horas para a produção de amilase e 9 horas para a produção de protease. As
158 fermentações foram interrompidas, os ELC dialisados e as atividades enzimáticas
159 determinadas.

160 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

161

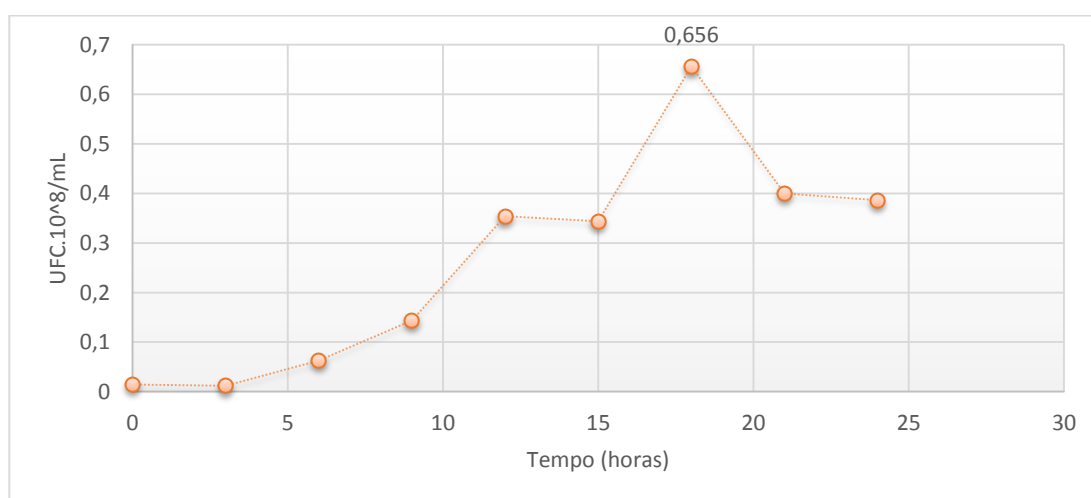
162 3.1 CURVA DE CRESCIMENTO DO *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* MO.04B EM FERMENTAÇÃO 163 SUBMERSA PARA A PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE INÓCULO

164

165 A padronização do inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foi
166 realizada em MSM (Camilios-Neto, 2010) por se tratar de um meio simples e por já ter
167 sido verificado por outros autores (Massi, 2014; Papi, 2013; Pedro, 2012) que o
168 microrganismo é capaz de desenvolver-se facilmente nesse meio. Portanto, de forma a
169 avaliar o crescimento do MO este foi inicialmente cultivado em MSM contendo glucose
170 0,2 % (m/v) nos seguintes intervalos de tempo: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas (Figura
171 1).

172

173 **Figura 1-** Curva de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em meio de sais
174 minerais e glucose 2 % em diferentes intervalos de tempo.



175

176

177 Observou-se que as primeiras 9 horas foi o período de adaptação do
178 microrganismo. A partir de 10 até 18 horas foi o período que ocorreu a maior proliferação
179 celular de $1,4 \times 10^7$ a $6,6 \times 10^7$ UFC/mL, e depois de 18 horas começou a ocorrer a fase
180 de morte celular. Papi (2013) também avaliou o crescimento de *B. amyloliquefaciens*
181 nestas mesmas condições e em diferentes intervalos de tempo, verificando que o período
182 de maior crescimento celular foi em 18 horas com $3,7 \times 10^8$ UFC/mL. Gangadharan
183 (2006) obteve em 18 horas 2×10^9 UFC/mL quando o *B. amyloliquefaciens* foi cultivado
184 em caldo nutritivo a 37°C , sendo assim verificado que esta bactéria pode crescer
185 rapidamente em diferentes meios sendo eles simples ou complexos em temperaturas
186 moderadamente elevadas. Dessa forma, o tempo de 18 horas foi determinado como o
187 melhor tempo para a proliferação celular do microrganismo nas condições estudadas.

188

189 3.2 PADRONIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NOS SUBSTRATOS FARELO DE SOJA E 190 FARELO DE MILHO

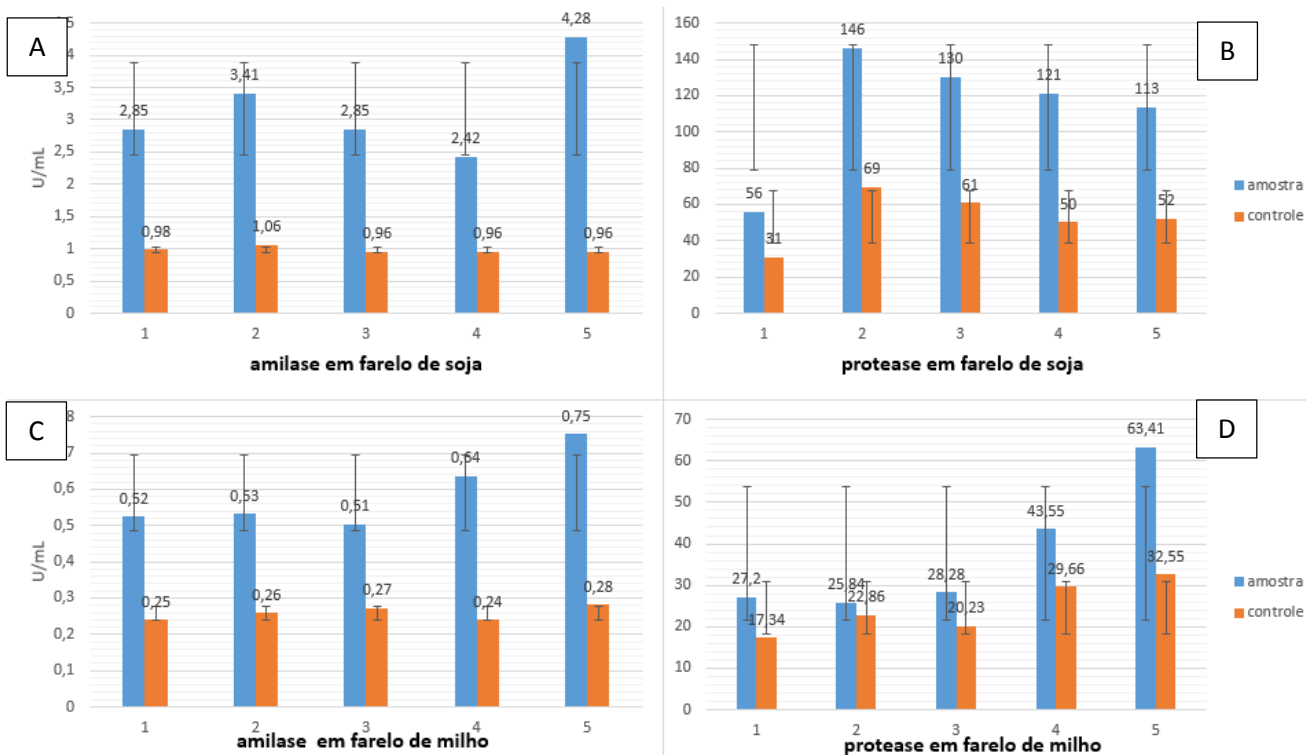
191

192 3.2.1 Determinação da Composição da Solução Umedecedora

193

194 Na Figura 2 estão apresentados os resultados que demonstram a
195 influência das diferentes soluções umedecedoras: água (1); MSM (2); MSM + glucose 1
196 % (3); MSM + YE 1 % (4); MSM + glucose 1 % + YE 1 % (5) nos substratos sólidos e sua
197 ação sobre a atividade enzimática.

198 **Figura 2-** Avaliação de diferentes soluções umedecedoras para a produção de amilase
 199 e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b onde: (1) Água; (2) MSM; (3) MSM +
 200 glucose 1 % (m/v); (4) MSM + YE 1 % (m/v); (5) MSM + glucose 1 % + YE 1 % (m/v).



201

202

203 Quando a bactéria foi cultivada em farelo de soja, a solução
 204 umedecedora que favoreceu a produção de amilase (Fig. 2a) foi solução 5 obtendo 4,28
 205 U/mL de atividade (amostra não dialisada) enquanto que a produção de protease (Fig 2b)
 206 foi favorecida pela solução 2 com atividade de 146 U/mL (amostra não dialisada), agora
 207 quando o cultivo foi realizado no substrato farelo de milho ambas as enzimas foram
 208 favorecidas pela solução umedecedora 5 com atividades de 0,75 U/mL para a amilase e
 209 63 U/mL para protease sendo as amostras não dialisadas.

210

211 Alguns autores relatam que a fonte de carbono pode ser utilizada como

212 produtos amiláceos e podendo em alguns casos ser reprimida na presença de açúcares
213 simples, como frutose e xilose (Gupta *et al.*, 2003; Gancedo, 1991). Ao analisarmos os
214 gráficos observamos que quando o microrganismo foi cultivado em meios onde o
215 substrato foi umedecido com MSM contendo somente glucose, ocorreu uma diminuição
216 na produção de amilase, podendo ser atribuída a repressão causada pela glucose, agora
217 quando o cultivo deu-se em meio umedecido com a glucose na presença de extrato de
218 levedura a produção da amilase foi favorecida.

219 Segundo Abate *et al.* (1999) uma característica interessante para o
220 *Bacillus amyloliquefaciens* em relação a curva de crescimento e a produção de enzimas,
221 foi que a presença de extrato de levedura no meio de cultivo aumenta significativamente
222 o crescimento desse microrganismo e conseqüentemente a produção enzimática.

223 Considerando que a solução 5, foi a que apresentou um melhor
224 rendimento na produção das enzimas na maioria dos cultivos, e que ela é composta por
225 MSM + glucose 1 % + YE 1 % (m/v), e que para o crescimento microbiano o nitrogênio é
226 de grande importância (Gupta *et al.*, 2003), pode-se esperar que meios de cultura que
227 contenham uma fonte adicional de nitrogênio favoreçam a produção de enzimas
228 bacterianas e quando a glucose é utilizada em conjunto com o YE na concentração de 1
229 % (m/v) não ocorre a repressão da produção da amilase.

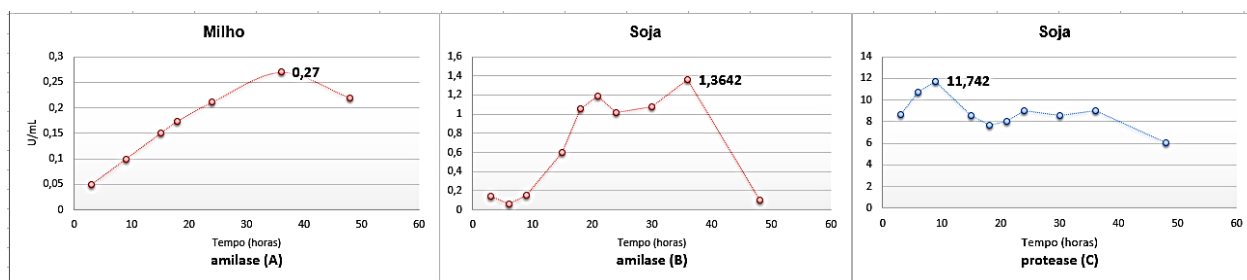
230 Sendo assim, a solução 5 foi selecionada para umedecer os substratos
231 sólidos de forma que todos experimentos fossem conduzidos nas mesmas condições.

232

233 3.3 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE

234 As enzimas são produtos do metabolismo microbiano obtidas em
235 diferentes etapas do crescimento celular. As enzimas extracelulares são obtidas durante

236 a fase de crescimento exponencial log ou durante a fase estacionária. Foi realizada uma
 237 curva de crescimento em relação a atividade enzimática nos seguintes tempos: 3, 6, 9,
 238 15, 18, 21, 24, 30, 36 e 48 horas, obtendo-se o melhor tempo de produção de amilase e
 239 protease. A Figura 3 mostra que a maior produção de amilase ocorreu no tempo de
 240 fermentação de 36 horas para ambos os substratos, 1,36 U/mL de atividade amilolítica
 241 em farelo de soja e 0,272 U/mL em farelo de milho. O maior pico de atividade proteolítica
 242 obtido em farelo de soja foi de 11,742 U/mL quando o tempo de fermentação atingiu 9
 243 horas, sugerindo que essas enzimas não são produzidas na mesma fase de crescimento.
 244
 245 **Figura 3-** Cinética de produção de amilase em farelo de milho (A) e farelo de soja (B) e
 246 produção de protease em farelo de soja (C) pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.



247

248

249 A α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* foi produzida no final da fase
 250 de crescimento exponencial e no começo da fase estacionária (Morcel; Biedermann,
 251 1994), outra característica interessante desta bactéria, é que na maioria das vezes ela
 252 não produz as enzimas amilase e protease concomitantemente, a produção de uma delas
 253 em determinada fase de crescimento pode levar a inativação da outra, em geral a
 254 protease é produzida primeiro podendo inibir a produção de amilase (Abate *et al.*, 1999).

255 Em ambos os substratos a produção de amilase foi mais expressiva na
 256 fase exponencial de crescimento, enquanto que a produção de protease se deu nas

257 primeiras horas de fermentação. Ainda na Figura 3 é possível verificar que quando a
258 amilase ou a protease atingiu seu pico máximo de atividade houve uma diminuição da
259 atividade da outra enzima, outros autores obtiveram resultados semelhantes. Teodoro e
260 Martins avaliaram condições de cultivo para a produção de amilases termoestáveis por
261 *Bacillus sp* e observaram que quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo
262 amido e glucose em diferentes concentrações, a atividade máxima (aproximadamente 20
263 U/mL) obtida em todas elas foi depois de ocorrido 36 horas de fermentação. Corrêa
264 (2009) realizou a produção simultânea de α -amilase e protease por um *Bacillus sp*
265 termofílico, e obteve resultados semelhantes na relação tempo/produção. Este autor
266 verificou que quando o microrganismo era cultivado em um meio líquido contendo
267 somente amido solúvel a produção máxima de amilase (325 U/mg) era obtida depois de
268 36 horas de fermentação na fase estacionária, enquanto que a produção de protease (47
269 U/mg) ocorria com 18 horas de fermentação na fase log.

270 Nascimento e Martins (2004) relatam um padrão de crescimento e
271 produção de protease de uma cepa de *Bacillus* cultivada em meio líquido semelhante ao
272 do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. A atividade máxima de protease (1,93 U/mg) foi
273 também determinada em 9 horas de fermentação

274 Esses resultados selecionaram os tempos de 36 horas para a produção
275 de amilase e de 9 horas para a produção de protease em farelo de soja. O farelo de milho
276 foi descartado tendo em vista a baixa produção das enzimas.

277

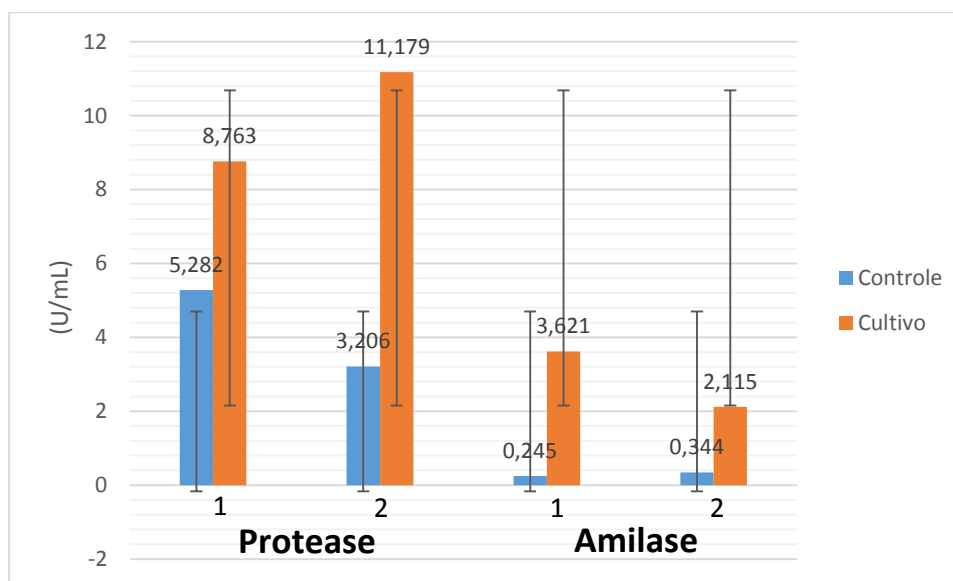
278 3.4 DETERMINAÇÃO DE UM AGENTE DE ESTRUTURAÇÃO NA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE
279 EM FARELO DE SOJA

280

281 Os agentes estruturantes desempenham um papel muito importante na
282 FES controlando problemas causados pelo baixo teor de umidade (Batham *et al.*, 2013).
283 Dois resíduos da agroindústria foram testados como agentes de estruturação na
284 fermentação em estado sólido, a casca de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar que foram
285 introduzidos na fermentação juntamente com o farelo de soja nas mesmas proporções
286 de 1:1, afim de se verificar qual dos dois agentes favoreceriam a produção das enzimas
287 (Figura 4).

288

289 **Figura 4-** Produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em
290 farelo de soja, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz como agentes
291 estruturantes. Onde 1: farelo de soja + casca de arroz; 2: farelo de soja + bagaço de
292 cana-de-açúcar.



293

294 A maior produção de amilase ocorreu quando o *B. amyloliquefaciens*
295 MO.04b foi cultivado em farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar obtendo 3,621 U/mL

296 de atividade e a maior produção de protease foi para o cultivo em farelo de soja + casca
297 de arroz com 11,179 U/mL de atividade sendo as amostras dialisadas.

298 Se compararmos as atividades obtidas com as atividades nas
299 fermentações realizadas somente com o farelo de soja tendo os ELC dialisados,
300 observamos que houve um aumento de mais de 100 % na atividade amilolítica, a
301 produção de amilase passou de 1,364 U/mL para 3,621 U/mL, já a produção de protease
302 manteve-se praticamente constante com índices de atividade de 11,7 e 11,17 U/mL,
303 sugerindo que uma alteração na proporção de farelo de soja e casca de arroz através de
304 delineamento estatístico favoreça a produção da enzima.

305 Os resultados encontrados sugerem que a produção das enzimas por
306 *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b no farelo de soja foi favorecida na presença dos
307 agentes de estruturação. Provavelmente a utilização de agentes de estruturação
308 juntamente com o substrato propiciem um meio de cultivo mais favorável para o
309 metabolismo microbiano. Considerando que uma das desvantagens da FES é a
310 dificuldade de transferência de calor e massa no sistema devido a tendência de alguns
311 substratos compactar-se, o que ocorre com o farelo de soja após autoclavagem
312 dificultando a aeração do meio, a presença de agentes de estruturação aumentam a
313 porosidade do meio e auxiliam na diminuição da compactação dos substratos,
314 aumentando assim, a transferência de massa e calor como o crescimento microbiano e
315 conseqüentemente a produção de enzimas (Mitchell *et al.*, 2003; Ooijkaas *et al.*, 2000;
316 Batham *et al.*, 2013).

317 Massi (2014) avaliando a produção de biossurfactantes pelo *Bacillus*
318 *amyloliquefaciens* em diferentes subprodutos agrícolas, também observou que a
319 produção deste metabólito era favorecida com a mistura do farelo de soja e da casca de

320 arroz como agente estruturante. Possivelmente esses agentes possuem em suas
321 estruturas substâncias que favorecem o crescimento do microrganismo e
322 conseqüentemente uma maior atividade metabólica.

323 Gomes (2012) relata que o gênero *Bacillus* é aeróbico ou anaeróbico
324 facultativo, preferencialmente este microrganismo desenvolve-se na presença de
325 oxigênio, os agentes estruturantes em processos biotecnológicos auxiliam em diversos
326 fatores como no controle do pH e temperatura do meio de cultivo, podem ser utilizados
327 como fonte de energia, ajustam o teor de umidade, assim como, contribuem para a
328 aeração do meio (Batham *et al.*, 2013). A casca de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar
329 no meio de cultivo funcionam como agentes de estruturantes, ou seja, facilitam a aeração
330 em cultivos sólidos o que pode explicar uma maior produção de metabólitos nessas
331 condições. Os resultados demonstram que o farelo de soja é um bom substrato para a
332 produção de protease de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b por FES, assim como, a
333 utilização de resíduos como agentes estruturantes favorecem o crescimento do
334 microrganismo nas condições estudadas.

335

336 **REFERÊNCIAS**

- 337 [1] ABATE CM et al. (1999) Production of amylolytic enzymes by *Bacillus*
338 *amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*.
339 *Biotechnol.Lett.*: 21 249-252.
340
- 341 [2] AKCAN N, UYAR F (2012) Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus*
342 *subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *Eurasia J Biosci* 5: 64-72.
343
- 344 [3] BATHAM M, GUPTA R, TIWARI A (2013) Implamentation of Bulking Agents
345 Composting: A Review. *J Bioremed Biodeg* 4: 1-3.
346
- 347 [4] CAMILIOS NETO D (2010) Produção de ramnolipídios por fermentação em estado
348 sólido. Paraná, Brasil, 156p. (tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná)
349
- 350 [5] CORRÊA TLR (2009) Produção simultânea de α -amilase e protease
351 pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de
352 detergente. Rio de Janeiro, Brasil, 54p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual
353 do Norte Fluminense Darcy Ribeiro).
354
- 355 [6] EMBRAPA (2014) Disponível em:
356 <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> Acesso em: 11 de
357 Março de 2015.
358
- 359 [7] GANCEDO JM (1991) Carbon eatabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* 206: 297-
360 313.
361
- 362 [8] GANGADHARAN D, SWETHA S, NAMPOOTHIRI KM, PANDEY A (2006) Solid
363 culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technol.*
364 *Biotechnol* 44: 269-274.
365
- 366 [9] GOMES, M. **Gênero Bacillus spp.** Disponível em:
367 <<http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3AAnero%20Bacillus%204-2012-1.pdf>>
368 Acesso em: 11 de Março de 2015.
369
- 370 [10] GRANZOTTO G, MARCELINO PRF, BARBOSA AM, RODRIGUES EP, REZENDE
371 MI, OLIVEIRA ALM (2012) Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated
372 soil: indentification of oil-eating *Bacillus* strains. *Ann. Microbial* 62: 1681-1690.
373
- 374 [11] GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, GOSWAMI VK, CHAUHAN B (2003)
375 Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Bichemistry* 38: 1599-
376 1616.
377
- 378 [12] HARTREE EF (1972) Determintion of protein: a modification of the Lowry method that
379 gives a linear photometric response. *Anal. Biochem* 48: 422-427.
380

- 381 [13] MASSI JB (2014) Farelo de soja e casca de arroz para a produção de
382 biossurfactantes (lipopetídeos) por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b 2014. Paraná,
383 Brasil, 101p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas. UEL).
384
- 385 [14] MILLER GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing
386 sugars. *Analytical Chemistry* 3: 426-428.
387
- 388 [15] MITCHELL DA, VON MEIEN OF, KRIEGER N (2003) Recent developments in
389 modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem*
390 *Enginee J* 13: 137-147.
391
- 392 [16] MONTEIRO VN, SILVA RN (2009) Aplicações industriais da biotecnologia
393 enzimática. *Revista Processos Químicos*, ano. 3, n. 5.
394
- 395 [17] MORCEL C, BIEDERMANN K (1994) Coupling of fermentation and microfiltration for
396 α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol. Rev* 14: 57-62.
397
- 398 [18] MOREIRA FG, DE LIMA FA, PEDRINHO SRF, LENARTOVIEZ V, DE SOUZA CGM,
399 PERALTA RM (1999) Production of amylases by *Aspergillus tamari*. *Ver Microbiol* 30:
400 157-162.
401
- 402 [19] NASCIMENTO HCA, MARTINS MLL (2004) Production and properties of an
403 extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 35: 91-96.
404
- 405 [20] OOIJKAAS LP, WEBER FJ, BUITELAAR RM, TRAMPER J, RINZEMA A (2000)
406 Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production
407 systems. *Trends in Biotechnol* 18: 356-360.
408
- 409 [21] PANDEY A (2003) Solid-State fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-
410 84.
411
- 412 [22] PANDEY A, SOCCOL CR, MITCHELL D (2000) New developments on solid-state
413 fermentation, I: Bioprocess and applications. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
414
- 415 [23] PAPI MC (2013) Biossurfactante de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b: Produção,
416 Otimização e Caracterização Molecular. Paraná, Brasil, 113p. (Dissertação de Mestrado.
417 Centro de Ciências Exatas. UEL).
418
- 419 [24] PEDRO EM (2012) Potenciais para a produção de biossurfactantes. Paraná, Brasil,
420 110p. (Monografia de Especialização. Centro de Ciências Exatas. UEL).
421
- 422 [25] POLITZER K, BOM EPS (2006) Enzimas Industriais e Especiais.
423 http://www.redetec.org.br/publique/media/tr03_enzimas.pdf
424
- 425 [26] PRAKASHAN, RS, RAO CS, SARMA PN (2006) Green dran husk – an inexpensive
426 substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. In solid-state fermentation.
427 *Bioresource Technol* 97: 1449-1454.

- 428 [27] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD OP (2004) Development in the Use of *Bacillus*
429 Species for Industrial Production. *Can J Microbiol* 50:1-17.
430
- 431 [28] SILVA IF (2012) Produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta
432 de macaúba (*Acrocomiaaculeata*) e farinha de pupunha (*Bactrisgasipaes*) como
433 substratos. Minas Gerais, Brazil, 75p. (Dissertação de Mestrado. UFVJM).
434
- 435 [29] SOCCOL CR, VANDENBERGHE LPS (2003) Overview of applied solid-state
436 fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13: 205-218.
437
- 438 [30] TEODORO CES, MARTINS MLL (2000) Culture conditions for the production of
439 thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Braz J Microbiol* 31:
440

APÊNDICE B

Artigo 2. “Aplicação do delineamento simplex-centróide na produção de proteases ácidas de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04B em farelo de soja”

Título:

“Aplicação do delineamento simplex-centróide na produção de proteases ácidas de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em farelo de soja.”

"Application simplex centróide design for the production of acid proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b in soybean meal"

Autores:

Letícia Mileny Santos¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹ e Maria Inês Rezende¹.

Afiliação:

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondência do autor:

Maria Inês Rezende¹

E-mail: mirezende@uel.br Tel: +55 43 3371-4812 – Fax: + 55 43 3371-4216

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

A produção de protease pelo *Bacillus amyloliquefaciens* cepa MO.04b foi realizada em meio sólido através do delineamento experimental de misturas simplex-centróide, foi utilizado como substratos o farelo de soja, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar provenientes da agroindústria. A melhor mistura obtida para a produção de protease foi o farelo de soja + casca de arroz (20,32 U/mL). Estudos sobre a caracterização parcial da protease revelaram que a temperatura ótima desta enzima foi de aproximadamente 25 ° C. A enzima foi estável por 90 minutos nas temperaturas de 30, 50 e 70 ° C retendo até 71 % de atividade original, a perda de mais de 50 % da atividade original só foi observada após 120 minutos. O valor de pH ótimo encontrado para esta protease foi de aproximadamente 3,0 indicando caráter ácido da enzima. Os resultados encontrados no modelamento matemático indicaram que a presença do farelo de soja no meio de cultivo favorece a produção da protease e que nas condições utilizadas o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b é produtor de protease ácida estável em altas temperaturas. Os resultados obtidos sugerem que a protease produzida neste trabalho apresenta algumas propriedades interessantes para futuras aplicações industriais.

20 **Palavras-chave:** Proteases, *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, fermentação em
21 estado sólido, delineamento simplex-centróide e resíduos agroindustriais.

22 1 INTRODUÇÃO

23

24

25

26

27

28

29

30

Proteases são hidrolases que clivam as ligações peptídicas nas proteínas (Rao *et al.*, 1998), possuem uma extensa diversidade de ação e estrutura. Elas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, devido ao seu amplo campo de aplicações, movimentando ativamente a economia desse setor (Monteiro; Silva, 2009; Gupta; Beg, 2002; Politzer; Bom, 2006). São encontradas em uma grande diversidade de fontes, podendo ser ácidas, neutras ou alcalinas (Gupta; Beg, 2002).

31

32

33

As proteases ácidas e neutras são geralmente produzidas por fungos não sendo termoestáveis, enquanto que as proteases bacterianas costumam ter um pH ótimo alcalino sendo frequentemente termoestáveis (Kumar; Takagi, 1999).

34

35

36

37

38

Espécies do gênero *Bacillus* possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas enquanto que, as proteases ácidas são pouco relatadas, elas podem ser aplicadas em diferentes segmentos industriais principalmente se forem termoestáveis sendo de grande interesse econômico (Abate *et al.*, 1999; Ellaiah *et al.*, 2002; Gomes, 2012).

39

40

41

42

43

44

45

46

47

Preferencialmente as proteases são produzidas por cultivos submersos, contudo, a fermentação em estado sólido (FES) é de grande interesse dos pesquisadores na produção de metabólitos microbianos (Pandey *et al.*, 2000; Batham *et al.*, 2013). Considerando, que na atualidade um dos grandes desafios é o desenvolvimento sustentável em harmonia com a natureza, buscando instrumentos tecnológicos, científicos e sociais para cumprir estes objetivos, um termo que vem destacando-se é a biorrefinaria, onde se busca minimizar a geração de resíduos e do consumo de energia potencializando um menor custo-benefício no uso de recursos, através de uma rota de produção integrada, assim, a FES é uma estratégia

48 biotecnológica que pode ser utilizada em conjunto com a biorrefinaria devido a sua
49 importância na transformação da biomassa visando a conservação de energia e a
50 sustentabilidade, com vantagens como a conservação do meio ambiente; os resíduos
51 agroindustriais podem ser utilizados como substratos, assim como, agentes de
52 estruturação nesse tipo de fermentação consistindo em um processo biotecnológico
53 sustentável (Pandey *et al.*, 2000; Batham *et al.*, 2013).

54 A FES é geralmente descrita como o crescimento de microrganismos
55 sobre ou dentro do substrato sólido na ausência de água livre em baixo teor de
56 umidade. A aplicação desse tipo de fermentação para a produção de enzimas, como
57 as proteases, no Brasil é muito interessante, devido a ampla diversidade agrícola do
58 país o que possibilitaria o reaproveitamento de diversos subprodutos e resíduos da
59 agroindústria como o farelo de soja, a casca de arroz e o bagaço de cana-de-açúcar
60 agregando valor a estes, podendo assim, mitigar problemas econômicos, sociais e
61 ambientais (Pinto *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2000; Pandey, 2003; Soocol;
62 Vandenberghe, 2003).

63 Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito
64 da mistura de um subproduto e dois resíduos da agroindústria (farelo de soja, bagaço
65 de cana-de-açúcar e casca de arroz) utilizados como substratos e agentes de
66 estruturação, através de um planejamento de misturas simplex-centróide na produção
67 de protease pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, e caracterizar parcialmente a
68 enzima nas melhores condições de fermentação em estado sólido.

69 2 MATERIAIS E MÉTODOS

70 2.1 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

71

72 O microrganismo utilizado foi o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b,
73 cepa originalmente isolada por Granzotto (2012) de solo contaminado com petróleo
74 proveniente das proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR). O inóculo foi
75 preparado em Erlenmeyers de 50 mL contendo 9 mL de meio de sais minerais (MSM)
76 (Camílios-Neto, 2010) acrescido de 1 mL de glucose 2 %, incubados por 24 horas a
77 37 ± 2 ° C e 180 rpm em Shaker orbital. Após este período 200 µL da suspensão de
78 células obtida foi utilizada como inóculo.

79

80 2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

81

82 Para a realização da fermentação em estado sólido utilizou-se como
83 substratos farelo de soja (FS), bagaço de cana-de-açúcar (BC) e casca de arroz (CA)
84 individualmente e nas proporções de 1:1:0 e 1/3:/1/3:1/3, totalizando 3,75 g de resíduo
85 agroindustrial. Os substratos foram umedecidos com uma solução contendo MSM +
86 glucose 1 % + extrato de levedura 1 % e esterilizados em autoclave. Inoculou-se 200
87 µL de suspensão de células que foi mantido por 9 horas, à temperatura de $37 \pm$ ° C
88 em estufa bacteriológica (Papi, 2013).

89 O extrato bruto enzimático foi obtido pela adição de água destilada
90 aos substratos fermentados, que foram então homogeneizados em Shaker à 180 rpm
91 por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 9000 rpm por 15 minutos a 4 ° C. O
92 sobrenadante foi dialisado por 24 horas em água destilada e utilizado para a
93 determinação da atividade enzimática. Na Tabela 1 estão descritas a composição

94 centesimal dos resíduos utilizados como substratos e agentes de estruturação na
95 FES.

96 **Tabela 1-** Composição centesimal dos resíduos agroindustriais.

	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Carboidratos
Farelo de soja	24 %	4 %	5 %	47 %	14 %
Bagaço de cana	22 %	2 %	7 %	2 %	61 %
Casca de arroz	22 %	14 %	12 %	2 %	39 %

97

98 2.3 ENSAIO ENZIMÁTICO

99

100 A atividade proteolítica foi determinada pela quantificação de
101 peptídeos solúveis em ácido tricloro acético (TCA) 10 %. O substrato utilizado para
102 essa determinação foi uma solução de soro albumina bovina 5 mM. Adicionou-se 0,5
103 mL do extrato enzimático em 0,25 mL do substrato e 0,25 mL de tampão glicina- NaOH
104 pH 9,5 e incubado em banho-maria a 37 ° C por 1 hora. A reação foi interrompida pela
105 adição de 0,25 mL de TCA e a solução, centrifugada a 9000 rpm por 15 minutos a 4 °
106 C. Uma unidade de atividade proteolítica (U/mL.min) foi definida como μ moles de
107 tirosinas solúveis liberados pela ação das proteases por mL do extrato enzimático por
108 minuto, nas condições da reação. A concentração de peptídeos foi determinada pelo
109 o método de Hartree (1972) no comprimento de onda de 650 nm.

110

111 2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E MODELAMENTO MATEMÁTICO

112

113 Afim de se avaliar o efeito da mistura de três substratos na FES, foi
114 utilizado o planejamento experimental de misturas simplex-centróide visando obter

115 uma maior produção de protease, os substratos utilizados foram: farelo de soja (x_1),
 116 bagaço de cana-de-açúcar (x_2) e casaca de arroz (x_3). O delineamento para três
 117 componentes foi composto de 7 ensaios com duas repetições no ponto central (Tabela
 118 2).

119 **Tabela 2-** Codificação do delineamento experimental simplex centroide.

Ensaio	Mistura			
	Codificada ($x_1; x_2; x_3$)*	X_1^*	X_2^*	X_3^*
1	(1; 0; 0)	3,75	0	0
2	(0; 1; 0)	0	3,75	0
3	(0; 0; 1)	0	0	3,75
4	(½; ½; 0)	1,875	1,875	0
5	(½; 0; ½)	1,875	0	1,875
6	(0; ½; ½)	0	1,875	1,875
7	(⅓; ⅓; ⅓)	1,25	1,25	1,25
8	(⅓; ⅓; ⅓)	1,25	1,25	1,25
9	(⅓; ⅓; ⅓)	1,25	1,25	1,25

120 * X_1 – Farelo de soja; X_2 – Bagaço de cana-de-açúcar; X_3 – Casca de arroz

121

122 Modelo Matemático

123 A função utilizada foi do tipo

$$124 Y = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i < j} \sum_{i < j}^q \beta_{ij} X_i X_j$$

125 Onde y representa a função resposta dos dados experimentais; x_1 , x_2
 126 e x_3 são as variáveis independentes e correspondem à porcentagem de farelo de soja,
 127 bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz na mistura, respectivamente, e o γ o
 128 parâmetro estimado.

129 2.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

130

131 2.5.1 Determinação da Temperatura e do pH Ótimos para a Atividade Enzimática

132

133 Foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)
 134 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos
 135 (Tabela 3).

136 Para a determinação da temperatura e do pH ótimos foi utilizado a
 137 metodologia de atividade proteolítica descrita no item 2.3, variando-se apenas as
 138 temperaturas de incubação e substituindo o tampão utilizado. As temperaturas
 139 utilizadas foram de 25, 35, 50, 65 e 75 ° C e os pHs de 3,0, 4,0, 5,5, 7,0 e 8.

140

141 **Tabela 3-** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2

Experimentos	Codificado (real)		Descodificado	
	pH	T (° C)	pH	T (° C)
	X ₁ (X1)	X ₂ (X2)	X1	X2
1	-1	-1	4,0	35
2	-1	+1	4,0	65
3	+1	-1	7,0	35
4	+1	+1	7,0	65
5	-1,41	0	3,0	50
6	+1,41	0	8,0	50
7	0	-1,41	5,5	25
8	0	+1,41	5,5	75
9	0	0	5,5	50
10	0	0	5,5	50
11	0	0	5,5	50

142 * X₁ – pH; X₂ – Temperatura (° C)

143 2.5.2 Efeito da Temperatura na Estabilidade da Protease

144

145 A estabilidade térmica foi avaliada pela pré-incubação do extrato bruto
146 enzimático a 30, 50 e 70 ° C por um período de 0 a 120 minutos. A atividade residual
147 foi determinada pelo ensaio proteolítico já descrito em temperatura e pH ótimo já
148 determinados.

149

150 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

151

152 **3.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* MO.04B**

153

154 Os resultados do delineamento experimental de misturas simplex-
 155 centróide mostraram que a produção de protease é afetada diretamente pela presença
 156 do farelo de soja, esse substrato é essencial para a produção da enzima. Os valores
 157 de atividade obtidos no delineamento podem ser observados na Tabela 4.

158

159 **Tabela 4-** Valores médios de atividade proteolítica obtidos segundo o delineamento
 160 experimental de misturas simplex-centróide.

Ensaio	Mistura Codificada ($x_1; x_2; x_3$)**	Mistura Original* ($X_1; X_2; X_3$)**	Atividade Protease (U/mL)
1	(1; 0; 0)	(1; 0; 0)	17,29
2	(0; 1; 0)	(0; 1; 0)	5,87
3	(0; 0; 1)	(0; 0; 1)	6,99
4	(½; ½; 0)	(0,5; 0,5; 0)	20,87
5	(½; 0; ½)	(0,5; 0; 0,5)	20,31
6	(0; ½; ½)	(0; 0,5; 0,5)	5,49
7	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 0,33; 0,33)	19,29
8	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 0,33; 0,33)	18,08
9	(⅓; ⅓; ⅓)	(0,33; 0,33; 0,33)	15,94

161 * X_1 – Farelo de soja; X_2 – Bagaço de cana-de-açúcar; X_3 – Casca de arroz

162

163 O modelo matemático que melhor se ajustou aos dados obtidos foi o
 164 quadrático. Observa-se na equação 1 que os parâmetros x_1 , x_2 e x_3 são significativos
 165 ($p < 0,05$), sendo que o efeito x_1x_2 foi o mais expressivo seguido de x_1x_3 , o R^2 ajustado
 166 foi de 0,9822, indicando que o modelo explicou 98,22 % da variação dos dados

167 experimentais. Quando a FES foi realizada somente com o farelo de soja, um
168 substrato mais rico em proteínas, a atividade proteolítica obtida foi de 17,29 U/mL,
169 contudo, quando este mesmo substrato foi misturado com o bagaço de cana-de-
170 açúcar a atividade passou a ser de 20,87 U/mL e a mistura com a casca de arroz
171 obteve atividade de 20,31 U/mL. Isso significa que quando o farelo de soja é utilizado
172 em conjunto com o bagaço de cana-de-açúcar ou casca de arroz há um aumento na
173 atividade da enzima, esses efeitos são observados na equação 1. Os altos
174 coeficientes e a análise de variância mostraram que a equação 1 pode ser utilizada
175 para fins preditivos.

176

$$177 \quad Y = +17,286 \cdot x_1 + 5,559 \cdot x_2 + 6,679 \cdot x_3 + 37,859 \cdot x_1 \cdot x_2 + 33,391 \cdot x_1 \cdot x_3 \quad (1)$$

178

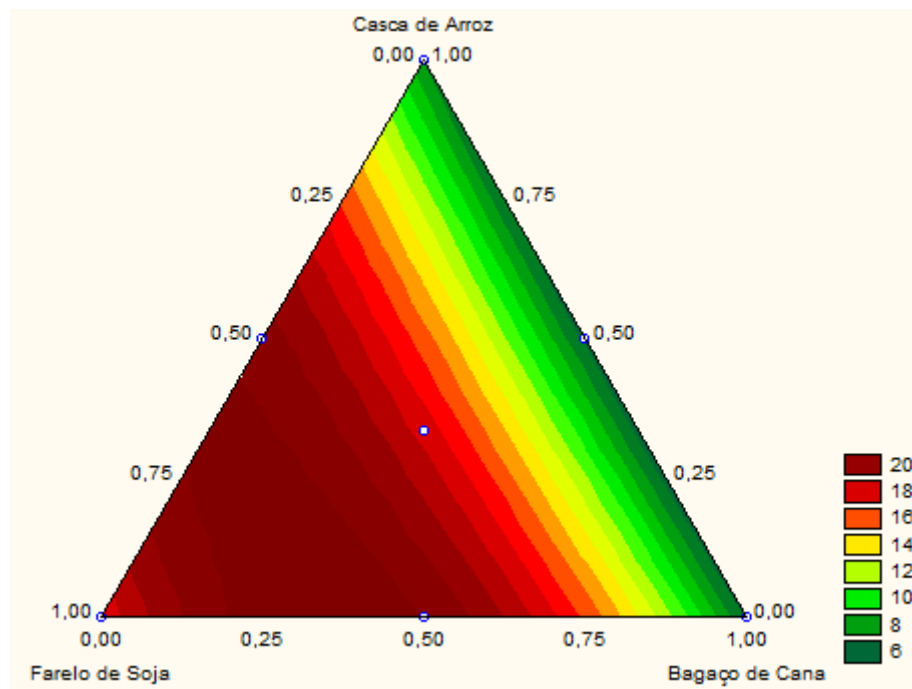
179 Considerando que o farelo de soja tem tendência a compactar-se na
180 FES após autoclavagem, que alguns resíduos em processos biotecnológicos podem
181 ser utilizados como agentes de estruturação (Batham *et al.*, 2013) e que as
182 fermentações ocorridas somente com o bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz
183 apresentaram baixa atividade proteolítica, pode se esperar que estes resíduos
184 funcionem como agentes estruturantes na FES nas condições estudadas, pois ao
185 serem utilizados juntamente com o farelo de soja, estes resíduos diminuiriam a
186 compactação do FS melhorando a aeração do meio de cultivo e conseqüentemente
187 aumentando a produção de protease.

188 A região da combinação binária entre as variáveis independentes x_1 ,
189 x_2 e x_3 pode ser observada através das curvas de nível, obtidas pelo modelo
190 matemático apresentada na Figura 1. As regiões de contorno da superfície de
191 resposta para a variável dependente, atividade proteolítica, obtidas por meio da
192 equação 1, evidenciou uma região ampla de elevada produção de protease na

193 presença do farelo de soja. Observou-se também que as regiões com grandes
 194 proporções de bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz promoveram um
 195 decréscimo da atividade proteolítica.

196

197 **Figura 1-** Curva de contorno resultante da influência dos substratos agrícolas sobre a
 198 atividade de protease.



199

200

201 A composição do meio de cultura é um fator chave quando se deseja
 202 otimizar a produção de enzimas por microrganismos. A fonte de carbono é um dos
 203 parâmetros mais importantes no crescimento do MO e na quantidade de metabólitos
 204 secretados, e também representa boa parte do custo envolvido na produção de
 205 enzimas (Pandey *et al.*, 2000). Considerando que a casca de arroz é um dos resíduos
 206 agroindústrias menos aproveitados, e a resposta do planejamento simplex-centróide
 207 mostrou que o efeito como agente estruturante deste resíduo e do bagaço de cana-
 208 de-açúcar, juntamente com o farelo de soja na FES foram semelhantes, a casca de

209 arroz foi selecionada como agente de estruturação, com o farelo de soja como
 210 substrato, para a produção de protease pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.

211

212 3.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

213

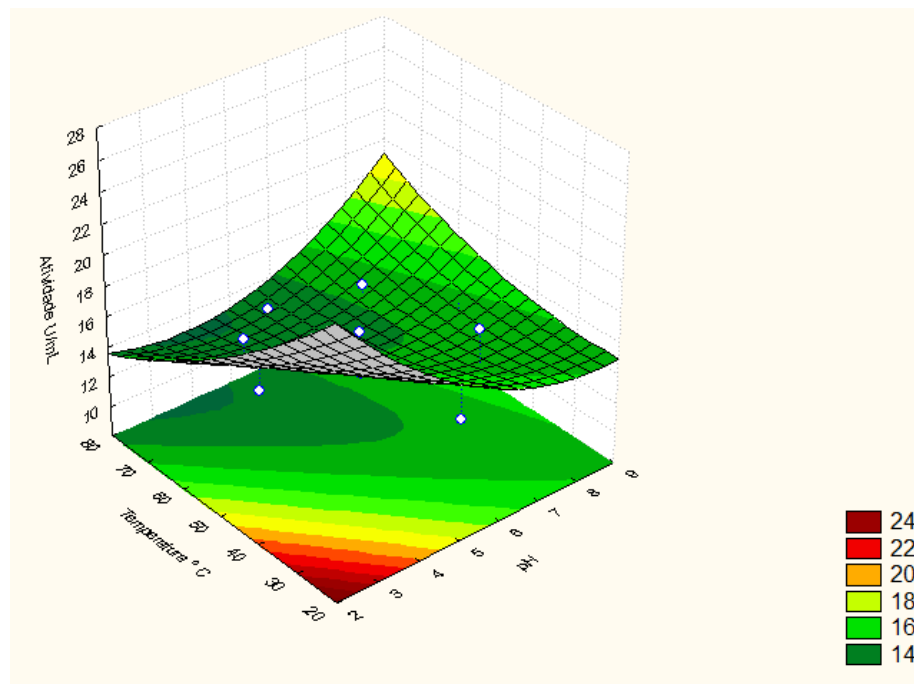
214 3.2.1 Determinação da Temperatura e do pH Ótimos para a Atividade Proteolítica

215

216 Para estudar o efeito dos parâmetros pH e temperatura, foram
 217 avaliados os intervalos de 3-8 para o pH e de 25 a 75 ° C para a temperatura
 218 observando sua ação sobre a atividade da protease através de um Delineamento
 219 Composto Central Rotacional (DCCR), onde foi possível obter uma superfície de
 220 resposta (Figura 2) com a região ótima da enzima.

221

222 **Figura 2-** Superfície de resposta da influência do pH e da temperatura sobre a
 223 atividade proteolítica de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b obtida através de um
 224 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).



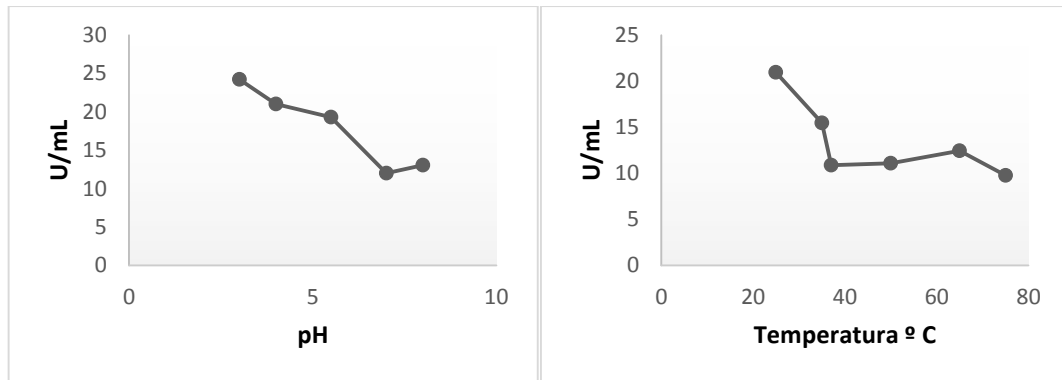
225

226

227 A superfície de resposta apresentada na Figura 2 mostra que o pH
228 ótimo da enzima está na faixa de 2 a 3 e a temperatura ótima entre 20 a 35 ° C,
229 indicando que esta protease tem caráter predominantemente ácido. Porém o teste da
230 ANOVA aplicado a este delineamento apontou que o pH e a temperatura não são
231 significativos em nível de 5 %. A confirmação dos resultados indicados pela superfície
232 de resposta, foi feita pela determinação do pH ótimo e da temperatura ótima através
233 de ensaios proteolíticos individualizados para estes parâmetros.

234 A figura 3 mostra o efeito do pH e da temperatura separadamente
235 sobre a atividade proteolítica, nota-se que a atividade máxima (24,3 U/mL) foi
236 determinada em pH 3,0 e temperatura de 25 ° C (20,9 U/mL), confirmando os
237 resultados obtidos no DCCR. Geralmente bactérias do gênero *Bacillus* produzem
238 proteases básicas termotolerantes tanto em cultivos submersos como em cultivos
239 sólidos (Kumar; Takagi, 1999). Nascimento e Martins (2004) realizaram a
240 caracterização de uma protease de *Bacillus* sp. cultivado em meio líquido contendo
241 amido e determinaram o pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 60 ° C resultados
242 semelhantes aos encontrados em outros trabalhos: pH ótimo igual a 9,0 e temperatura
243 de 70 ° C (Corrêa, 2009); pH ótimo igual a 9,0 e temperatura de 55 ° C (Corrêa, 2009).
244 As proteases ácidas são produzidas em geral por fungos; Dini (2010) encontrou, para
245 a protease produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae*, valor de pH ótimo igual a
246 5,5 e temperatura de 70 ° C; Fahmy, Ali e Mohamed (2004) encontraram pH ótimo
247 igual a 4,0 para a protease produzida por *Triticum aestivum*.

248 **Figura 3-** Influência do pH (A) e da temperatura (B) na atividade proteolítica.



249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260 3.2.3 Estabilidade térmica

261

262

263

264

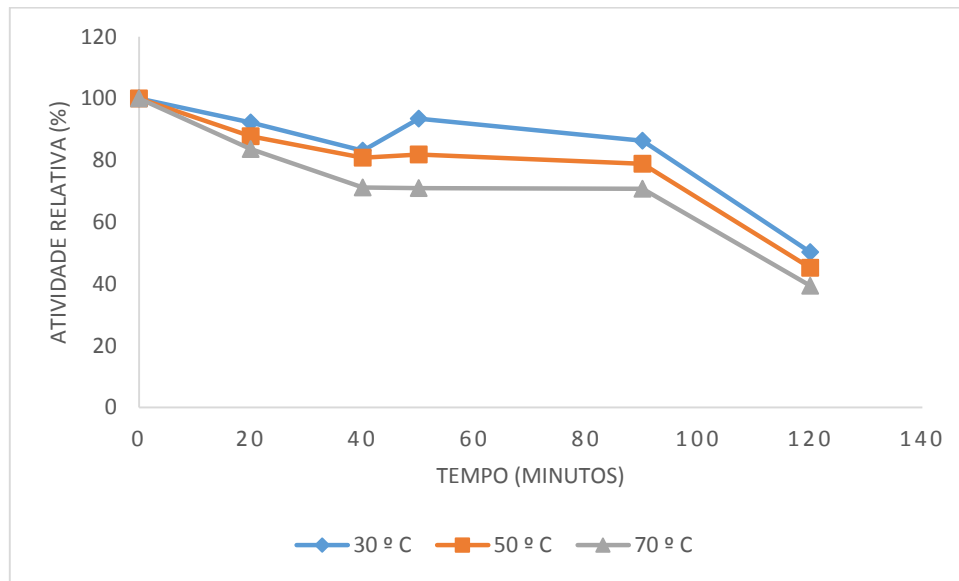
265

266

O gênero *Bacillus* possui alta taxa de crescimento, com curto tempo de fermentação, elevada capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized As Safe) considerado pelo FDA (Food and Drug Administration), características essas vantajosas e de grande importância para os diversos setores industriais (Gomes, 2012). Considerando essas vantagens, a produção de protease ácida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b seria de grande interesse industrial, para os diversos processos em que as enzimas de caráter básico não podem ser utilizadas.

A estabilidade térmica da protease nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C em diferentes tempos foi avaliada, e os resultados (Figura 5) indicam que esta enzima é termoestável, sendo capaz de manter atividade (12,04 U/mL) por um longo período de tempo (90 minutos) em temperatura alta (70 °C), o comportamento da enzima nas três temperaturas estudadas foi bem semelhante.

267 **Figura 5-** Efeito da temperatura na desnaturação da protease.



268

269 A 30, 50 e 70 ° C a enzima apresentou respectivamente 86, 78 e 70
 270 % de atividade após 90 minutos de incubação, indicando alta estabilidade térmica. A
 271 perda de mais de 50 % da atividade original da protease só foi observada após 120
 272 minutos de incubação.

273

274 A elevada termoestabilidade da protease condiz com relatos de outras
 275 enzimas secretadas pelo gênero *Bacillus* como, por exemplo, α -amilase,
 276 aproximadamente 60 % estável até 90 ° C por 1 hora (Carvalho *et al.*, 2008) e
 poligalacturonases, 58 % estável a 90 ° C (Cordeiro; Martins, 2009).

277

278 Resultados semelhantes de termoestabilidade de protease foram
 279 obtidos por Ladeira e colaboradores (2012) com *Bacillus sp.* SMIA-2 que manteve 80
 280 % de atividade por 2 horas a 60 ° C, por Sookkheo e colaboradores (2006) com
 281 *Bacillus stearothermophilus* TLS 33 que apresentou aproximadamente 60 % de
 282 atividade a 70 ° C, Nascimento e Martins (2006) obtiveram com uma cepa de *Bacillus*
sp na presença de Ca^{2+} 91 % da atividade original a 70 ° C.

283

284 Enzimas termoestáveis são vantajosas em aplicações industriais
 principalmente a protease por constituir uma enzima com um amplo campo de

285 aplicação, considerando que diversos processos biotecnológicos são conduzidos em
286 elevadas temperaturas, o que reduz riscos de contaminação por microrganismos
287 mesofílicos, e a velocidade de reação poder ser aumentada grandemente ao se operar
288 a uma temperatura relativamente elevada diminuindo assim o custo do processo
289 (Gomes *et al.*, 2007). Os resultados obtidos sugerem que a protease produzida pelo
290 *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b apresenta algumas propriedades interessantes
291 para futuras aplicações industriais.

292 **REFERÊNCIAS**

- 293 [1] ABATE CM. et al. (1999) Production of amylolytic enzymes by *Bacillus*
294 *amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*.
295 *Biotechnol Lett* 21: 249-252.
296
- 297 [2] BATHAM M, GUPTA R, TIWARI A (2013) Implamentation of Bulking Agents
298 Composting: A Review. *J Bioremed Biodeg* 4: 1-3.
299
- 300 [3] CAMILIOS NETO D (2010) Produção de ramnolipídios por fermentação em estado
301 sólido. Paraná, Brasil, 156p. (tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná)
302
- 303 [4] CARVALHO RV, CORRÊA TLR, SILVA JCM, MANSUR LRCO, MARTINS MLL
304 (2008) Properties of na amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Braz J Microbiol* 39:
305 102-107.
- 306 [5] CORDEIRO CAM, MARTINS MLL (2009) Produção de poligalacturonase, pelo
307 termofílico *Bacillus sp.* e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de*
308 *Alimentos* 29: 135-141.
- 309 [6] CORRÊA APF (2009) Purificação parcial e caracterização de uma protease
310 alcalina queratinolítica de *Bacillus sp.* P7. Rio Grande do Sul, Brasil, 76p. (Dissertação
311 de Mestrado. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. UFRGS).
- 312 [7] CORRÊA TLR (2009) Produção simultânea de α -amilase e protease pelo *Bacillus*
313 *sp.* SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Rio
314 de Janeiro, Brasil, 54p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte
315 Fluminense Darcy Ribeiro).
- 316 [8] DINI CM (2010) Produção, purificação e caracterização da protease de
317 *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de
318 queijo maturado. São Paulo, Brasil, 128p. (Tese de Doutorado. Instituto de
319 Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP)
- 320 [9] ELLAIAH P, SRINIVASULU B, ADINARAYANA KA (2002) review on microbial
321 alkaline proteases. *J. Sci. Ind. Res* 61: 690–704.
322
- 323 [10] FAMY A, ALI AA, MOHAMED, SA (2004) Characterization of cysteine protease
324 from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). *Bioresource Technology* 91: 297-304.
325
- 326 [11] GOMES, M. Gênero *Bacillus spp.* Disponível em:
327 <<http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3AAAnero%20Bacillus%204-2012-1.pdf>>
328 Acesso em: 11 de Março de 2015.
329
- 330 [12] GOMES E, GUEZ MAU, MARTIN N, SILVA R (2007) Enzimas termoestáveis:
331 fontes, produção e aplicação industrial. *Quim Nov* 30: 136-145.
332
- 333 [13] GRANZOTTO G, MARCELINO PRF, BARBOSA AM, RODRIGUES EP,
334 REZENDE MI, OLIVEIRA ALM (2012) Culturable bacterial pool from aged petroleum-
335 contaminated soil: indentification of oil-eating *Bacillus strains*. *Ann. Microbial* 62: 1681-
336 1690.
337

- 338 [14] GUPTA R, BEG QK (2002) Bacterid alkaline proteases: molecular approaches
339 and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnol* 59: 15-32.
340
- 341 [15] HARTREE EF (1972) Determintion of protein: a modification of the Lowry method
342 that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem* 48: 422-427.
343
- 344 [16] KUMAR CG, TAKAGI H (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial
345 viewpoint. *Biotechnol Advances* 17: 561-594.
346
- 347 [17] LADEIRA SA, DELATORRE AB, ANDRADE MVV, MARTINS MLL (2012)
348 Scientific Note: Use of pectin, whey protein and corn steep liquor for the production of
349 protease by thermophilic *Bacillus sp*. *Braz J Food Technol* 15: 92-98.
350
- 351 [18] MONTEIRO VN, SILVA RN (2009) Aplicações industriais da biotecnologia
352 enzimática. *Revista Processos Químicos*, ano. 3, n. 5.
353
- 354 [19] NASCIMENTO WCA, MARTINS MLL (2004) Production and properties of an
355 extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp*. *Braz J Microbiol* 35: 91-96.
356
- 357 [20] NASCIMENTO WCA, MARTINS MLL (2006) Produção de proteases por *Bacillus*
358 *sp* SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade
359 das enzimas com detergentes comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment* 26: 582-588.
360
- 361 [21] PANDEY A (2003) Solid-State fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:
362 81-84.
363
- 364 [22] PANDEY A, SOCCOL CR, MITCHELL D (2000) New developments on solid-state
365 fermentation, I: Bioprocess and applications. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
366
- 367 [23] PINTO GAS, BRITO ES, ANDRADE AMR, FRAGA SLP, TEIXEIRA RB (2005)
368 Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização
369 de Resíduos Agroindustriais Tropicais. *Comunicado Técnico on line Embrapa*, ISSN
370 1679-6535.
371
- 372 [24] POLITZER K, BOM EPS (2006) Enzimas Industriais e Especiais.
373 http://www.redetec.org.br/publique/media/tr03_enzimas.pdf
374
- 375 [25] RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV (1998) Molecular and
376 biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*
377 *Reviews* 62: 597-635.
378
- 379 [26] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD OP (2004) Development in the Use of *Bacillus*
380 *Species* for Industrial Production. *Can J Microbiol* 50: 1-17.
381
- 382 [27] SOCCOL CR, VANDENBERGHE LPS (2003) Overview of applied solid-state
383 fermentation in Brazil. *Biochem Enginee J* 13: 205-218.
384
- 385 [28] SOOKKHEO B, SINCHAIKUL S, PHUTRAKUL S, CHEN ST (2000) Purification
386 and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus*
387 *stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification* 20: 142-151.

CONCLUSÃO

- A utilização de diferentes volumes de inóculo não interfere na produção de amilase e protease;
- O meio de sais minerais suplementado com glucose e YE favorece a produção de amilase e protease quando utilizado como solução umedecedora dos substratos sólidos na FES;
- As enzimas amilase e protease não são produzidas na mesma fase de crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b;
- As misturas farelo de soja + farelo de milho não aumentam a produção das enzimas;
- O bagaço de cana-de-açúcar favorece a produção de amilase e casca de arroz a produção de protease quando utilizados como agentes de estruturação na FES;
- Quando o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b é cultivado em condições de FES tendo o farelo de soja como substrato ele é produtor de proteases ácidas termoestáveis;
- Os resultados obtidos sugerem que a protease produzida neste trabalho apresenta algumas propriedades interessantes para futuras aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ABATE, C.M. et al. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. **Biotechnol.Lett.**, v.21, n. 3, p. 249-252, 1999.
- ABOISA (1987) Aboisa óleos vegetais. Produtos: farelos de soja 48 %. Disponível em: <http://www.aboissa.com.br/produtos/view/474/farelo-de-soja-48.html>. Acesso em 17 de Janeiro de 2014.
- ASHGER, M.; ASAD, M. J.; RAHMAN, S. U.; LEGGE, R. L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 79, n. 3, p. 950-955, 2007.
- BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **MethodsofEnzymology**, v. 244, p. 1-15, 1994.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularioryzae* agente causal de bruzone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p.1165-1174, 1990.
- BEYNON, R.J. **ProteoliticEnzimes:apractical approach**. New York: Oxford University. Press, p. 257, 1996.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 233p. 1980.
- BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. **Journal of Biochemistry and Technology**, v. 3, n. 4, p. 448-457, 2012.
- CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídios por fermentação em estado sólido**. 2010, 156p. tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.
- CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.
- CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant Activity of Naphtalene Degrading *Bacillus pumilus* Strain Isolated from Oil Sludge. **JournalofBiotechnology**, v.109, p.255-262, 2004.
- CANILHA, L.; SILVA, D.D.V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analítica**, n. 20, 2006.
- CARRADINE, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E.S.; CARVALHO, A.J.F.; CURVELO, A.A.; MATTOSO, L.H.C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados de milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

CHERRY, H.M.; HUSSAIN, T.; ANWAR, M.N. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 7, p. 1988-1992, 2004.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

CORRÊA, Thamy Livia Ribeiro. **Produção simultânea de α -amilase e protease pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente.** 2009. 54f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz.** 1996. 203f. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. et al. **Collorimetric method for determination of sugars and related substance.** Anal. Chem., v.28, p.350-356, 1956.

ELLIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K.A review on microbial alkaline proteases. **J. Sci. Ind. Res**, v. 61, p. 690–704, 2002.

FEDATO, Luciana Maria. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** 2004, 68f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FREIRE, R.S.; PELEGRINE, R.; KUBOTA, L.T.; DURAN, N. New trends for treatment of industrial effluents containing organochloride species. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 504-511, 2000.

GANCEDO, J.M. Carbon eatabolite repression in yeast. Eur. J. Biochem. v. 206, p. 297-313, 1992.

GANGADHARAN, D.; SWETHA, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 269-274, 2006.

GARCIA, E.R.M.; MURAKAMI, A.E.; BRANCO, A.F.; FURLAN, A.C.; MOREIRA, I.; Efeito da suplementação enzimática em rações com farelo de soja e soja integral extrusada sobre a digestibilidade de nutrientes, o fluxo de nutrientes na digesta ileal e o desempenho de frangos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1414-1426, 2000.

GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M.R.V.; SUBRAMANIAN, T.V. JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state formation and application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 457-462, 1995.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 85-101, 2003.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 2006, 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GOMES, M. (2012) **Gênero *Bacillus spp.*** Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3AAAnero%20Bacillus%204-2012-1.pdf>> Acesso em: 11 de Março de 2015.

GOWTHAMAN, M. K.; KRISHNA, C., MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation: An overview. **Applied Mycology and Biotechnology**, v.1, p.305-352, 2001.

GRANZOTTO, G.; MARCELINO, P.R.F.; BARBOSA, A.M.; RODRIGUES, E.P.; REZENDE, M.I.; OLIVEIRA, A.L.M. de. Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: indentification of oil-eating *Bacillus* strains. **Ann. Microbial**. V. 62, p. 1681-1690, 2012.

GUPTA, R.; BEG, Q.K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnol**. V. 59, p.15-32, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Bichemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003.

HARGER, C ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: *Bioquímica das Fermentações*,56 p. 1982.

HARTREE, E.F. Determintion of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422-427, 1972.

HOLT, J. G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIANS, S.T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology**, 1994.

ISTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3º ed. São Paulo: IMESO, 1985. v.1.

KRISHNA, C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioresource Technology**, v.69, p.231-239, 2005.

KREBS, B.; JUNGE, H.; OCKHARDT, A. *Bacillus subtilis*: na effective biocontrol agent. **Pesticides Sciences**, v.37, p. 427-429, 1993.

MASSI, Juliana Barion. **Farelo de soja e casca de arroz para a produção de biossurfactantes (lipopeptídeos) por *Bacillus amyloliquefaciens MO.04b.*** 2014, 101f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para a utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MARTINS, A.K.S.; MARTINS, A.S.; BARBOSA, F.H.F. O gênero *Bacillus* e sua utilização probiótica. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**, v. 1, n. 1, ISSN 2318-4752, 2013.

MENONCIN, Silvana. **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. 2010, 68f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões, Erechim-RS.

MICHELIN, M. **Etudo da glucoamilase e da α -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotti*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas**. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Biologia – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 426-428, 1959.

MILNER, J. A., MARTIN, J., SMITH, A. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p. 507-512, 1997.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v.8, p. 183-225, 2002.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, ano. 3, n. 5, 2009.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGEDY, R.P. Principles of the solid substrate fermentation. In: **Filamentous Fungi**. 4. Ed. JE Smith, DR Berry and B Kristianse, E Arnold. (eds.). p. 117- 144, 1983.

MORCEL, C.; BIEDERMANN, K. Coupling of fermentation and microfiltration for α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 1, p. 57-62, 1994

MORGADO, I.F.; CARNEIRO, J.G.A.; LELES, P.S.S.; BARROSO, D.G. Resíduos agroindustriais prensados como substrates para a produção de mudas de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, v.57, p. 709-712, 2000.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Básica**. v.1.,2 ed. Rio de Janeiro: Medbook. 2011.

MURTHY, R.M.V.; KARANTH, N.G.; RAO, R.K.S. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**.V. 38, p. 99-149, 1993.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Biochen.**, v. 153, p. 375-380, 1944

NEURATH, H. The diversity of proteolyticenzimes. In: **Beynon R.J., Bond J.S, editors. Proteolytic Enzymes a Pratical Approach.** Oxford, UK: IRL Press, 1989: 1-13.

NOVOZYMES (2004) Latin America Ltda Enzymes at work. Disponível em : <http://novozymes.com/en/about-us/brochures/Pages/default.aspx>. Acesso em 20 jan. 2014.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascusaurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermtation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1991.

PANDEY, A. Solid-State fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; NIGMAN, P.; SOCCOL, C.R. SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**, v.31, p.135-152, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1^a ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p.760, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments on solid-state fermentation, I: Bioprocess and applications. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAPI, Mauro Capello. **Biossurfactante de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b: Produção, Otmização e Caracterização Molecular.** 113 f Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

PEDRO, Eliel Márcio. **Potenciais para a Produção de Biossurfactantes.** 2012, 110f. Monografia de Especialização em Bioquímica Aplicada – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Pr.

PILLAI, P.; MANDGE, S.; ARCHANA, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis*P13, **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1110-1117, 2011.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais.** Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.

PRAKASHAN, R.S.; RAO, C.S.; SARMA, P.N. Green gran husk –an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus sp.* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449-1454, 2006.

PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L.A.; BERKELEY, R.C.W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 3, p. 69-71, 1987.

POLITZER, K.; BOM, E.P.S. **Enzimas Industriais e Especiais Disponível** em: < http://www.redetec.org.br/publique/media/tr03_enzimas.pdf> Rio de Janeiro 2006. Acesso em: 26 de Novembro de 2014.

OLIVEIRA, D.C. **Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (*Manihotesculenta* Crantz)**. 2011, 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS-JUNIOR, A.F. Produção de amilases por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.61-66, 2007.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B.; RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Rev. Brasileira de Tec. Agroindustrial**, v.6, n. 2, p. 822-831, 2012.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010, 136f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.

RODRIGUES, Cristine. **Produção, extração e purificação de hormônio vegetal (ácido giberélico) por fermentação em estado sólido em polpa cítrica e utilização do extrato fermentado em meio de cultivo de bromélias *in vitro***. 2010, 178f. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Eventos Ed. 2002. 121p.

SANTANA, Renata Sampaio Mafra. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 2012, 73f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA.

- SANTOS, Leticia Mileny. **Perfil das enzimas extracelulares produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens* sob condição de fermentação em estado sólido**. 2012, 64f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina - Pr.
- SATO, K., SHIGETOSHI, S. Small-scale solid-state fermentations. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. A.L. Demain & J.E. Davies (eds) 2nd ed. ASM Press, Washington DC, pp. 61-79, 1999.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Development in the Use of Bacillus Species for Industrial Production. **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p.1-17, 2004.
- SCHULZ, D.; BONELLI, R.R.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocins produced by Bacillus spp. To conservation and food processing. **Alim.Nutr.**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.
- SHARMA, R.D.; GOMES, A.C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pausteriopenetrans*. **Nematologia Brasileira**, v. 23, p. 47-52, 1999.
- SILVA, Isadora Ferreira. **Produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos**. 2012, 75f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM
- SILVA, Marcelo de Andrade. **Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis***. 2011, 73f. Dissertação (Mestrados em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE.
- SILVA, G.A.B.; ALMEIDA, W. E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S.; Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através de fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Rev. Brasileira de Tec. Agroindustrial**, v.3, n.1, p. 28-41, 2009.
- SPIER, Michele Rigon. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.
- SOCCOL, C.R. ; CABRERO, M.A. ; ROUSSOS, S. ; RAIMBAULT, M. **Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava**, VI International Symposium on Microbial Ecology, Barcelona, 6-11 Septembre, 1992b.
- SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.
- SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.

SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, R.; PANDEY, A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 843-851, 2006.

TEODORO, C.E.S.; MARTINS, M.L.L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 298-302, 2000

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **J. Biotechnol**, v. 94, p. 137-155, 2002.

WANDERLEY, M.D.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. Asp ctos da produ o industrial de enzimas. **RevistaCitino**, v.1, n.1, 2011.

WANG, L.; YANG, S.T. Solid State Fermentation and Its Applications, Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. **Elsevier, Amsterdam**, pp. 465–489, 2007.

WANG, Q.; FAN, X.; HUAB, Z.; CHENB, J. Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, London, v. 34, n. 1, p. 107-113, 2007.

WORLD AGRICULTURAL SUPPLY AND DEMAND ESTIMATES (**WASDE-538**) (2015). Dispon vel em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

WELKER N. E, CAMPBELL L.L. Induction and properties of a temperature bacterio phage from *bacillus stearothermophilus*. **J Bacteriol**, v. 89, p. 175–184, 1967.

ZHU, Z.; ZHANG, G.; LOU, Y.; RAN, W.; SHEN, Q. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 254-260, 2012.

ANEXOS

ANEXO A
Normas para submissão de artigo para a revista Brazilian Journal of
Microbiology

Brazilian Journal of Microbiology
ISSN 1517-8382

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*" (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

Título

Autores e Afiliações

Resumo (200 a 250 palavras)

3 a 5 palavras-chave

Introdução

Material e Métodos

Resultados

Discussões

Agradecimentos (opcional)

Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

Título

Título resumido

Resumo (200 palavras)

3 a 5 palavras-chave

Texto

Agradecimentos (opcional)

Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br

ATO Traduções: www.atotraining.com.br

Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk

BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo. Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo. Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto. O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o BIOSIS. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

Artigos de Periódicos
 Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. Braz J Microbiol 37:101-107.

Artigos ou Capítulos de Livro
 Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

Livros
 Montville TJ, Matthews KR (2005) Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.

Patentes
 Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

Teses e Dissertações
 Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)
 Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

Publicações na Web
 Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11

Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado

anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título _____ do _____ Artigo:

"

"

Nome(s) do(s) Autor(es) _____ Assinatura(s) _____

_____/_____/_____ Data: _____

ANEXO B

Algumas Determinações Analíticas

Determinação de Açúcares Redutores Solúveis

A determinação dos açúcares redutores solúveis foi realizada segundo a metodologia descrita por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Este método é baseado na oxidação dos carboidratos com pontas redutoras livres pelo reativo cuproalcalino de Somogyi, resultando na formação de óxido cuproso. Na presença do reativo de Nelson há formação de um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e utilizou-se a solução padra de glucose a 100 µg/mL para o preparo da curva de calibração.

Determinação de Açúcares Totais Solúveis

Os açúcares totais foram dosados pelo método do fenol sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). A metodologia consiste na desidratação de pentoses e hexoses pelo ácido sulfúrico concentrado convertendo-os em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, os quais reagem com o fenol, formando um complexo colorido alaranjado. O complexo formado com pentose absorve com maior intensidade na região de 460 nm, enquanto com hexose em 490 nm. Para o preparo da curva de calibração foi utilizado como padrão glucose 100 µg/mL.

Metodologia de Bradford

Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 50 mg de Comassie Brilliant Blue G-250 em 25 mL de etanol 95 % e em seguida adicionou-se 50 mL de ácido fosfórico concentrado. A solução obtida foi avolumada para 100 mL com água destilada. O reagente foi preparado cinco vezes mais concentrado, dessa forma, no momento do uso era necessário a realização de uma diluição de 1:5.

Para a determinação das proteínas totais das amostras em tubos de ensaio proporções de 0,1 mL do ELC foram misturados a 1 mL do reagente de Bradford, as reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos as leituras das absorvâncias se deu em espectrofotômetro a 595 nm. Como padrão foi utilizado uma solução de soro albumina bovina (100 µg/mL) para o preparo da curva de calibração.