



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉ SANTOS FERREIRA TAVARES RAMOS

**FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A  
PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus*  
*amyloliquefaciens MO.04b***

ANDRÉ SANTOS FERREIRA TAVARES RAMOS

**FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A  
PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus*  
*amyloliquefaciens* MO.04b**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Inês Rezende

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R175f Ramos, André Santos Ferreira Tavares.  
Farelo de soja como substrato para a produção de proteases por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b / André Santos Ferreira Tavares Ramos. - Londrina, 2017.  
93 f. : il.

Orientador: Maria Inês Rezende.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola - Tese. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos - Tese. 3. Resíduos agrícolas - Tese. I. Rezende, Maria Inês. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

ANDRÉ SANTOS FERREIRA TAVARES RAMOS

**FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE  
PROTEASES POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Cristiane Baldo da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Milena Martins Andrade  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

Londrina, 1 de agosto de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Rezende, pela partilha de conhecimento, orientação, profissionalismo e amizade. Por toda a ajuda na compreensão das técnicas ajuda com os equipamentos, correções do trabalho e pela sua inteligência. O mais sincero obrigado.

Ao corpo docente do departamento de Bioquímica e Biotecnologia porque todo o conhecimento é importante e as interligações entre eles ainda mais. Em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Baldo da Rocha e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Gasparin pela ajuda, conselhos e ensinamentos.

Ao corpo técnico do departamento de Bioquímica e Biotecnologia impossível seria não poder agradecer. Naqueles momentos em que nada funciona, o equipamento se desprograma, o maior agradecimento para o Sr. Nelson Janeiro Rodriguez pela ajuda apoio e amizade. Ao Edvaldo Santos da Silva e Sandra Aparecida pela continua melhoria das condições de trabalho no laboratório e pela simpatia a minha gratidão. Aos técnicos administrativos Elda Jonas Aguiar e Sérgio do N. Evangelista pelo profissionalismo e ajuda com todas as formalidades e pareceres formais.

Aos amigos e colegas de laboratório, pela ajuda concedida durante as aulas e na realização dos experimentos em especial ao Douglas.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*A tensão que nos retesa  
E a dor que nos martiriza  
São montanha que nos pesa,  
São sombra que se reveza  
Com a luz que as nuvens matizam.*

Milton Paulo de Lacerda

RAMOS, André Santos Ferreira Tavares. **Farelo de soja como substrato para a produção de proteases por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.** 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de grãos de soja com um total de 106 milhões de toneladas produzidas na safra de 2016. O farelo de soja é um subproduto da extração do óleo de soja com cerca de 30,9 milhões de toneladas produzidas, constituindo 30 % da produção total. Devido à presença de 47 % de proteínas e 14 % de carboidratos, o farelo de soja é um material com grande potencial para ser utilizado como substrato em processos fermentativos. O gênero *Bacillus* é um reconhecido produtor de enzimas proteolíticas que são utilizadas em larga escala industrial, no processamento de carnes, confecção de queijos e produção de detergentes entre outras aplicações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases utilizando farelo de soja como principal substrato em fermentação submersa. Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio de sais minerais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L acrescidos de glucose 10 g/L. Diferentes concentrações de farelo de soja 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,0 e 4,0 % (m/v) foram testadas para a produção de proteases na presença e na ausência de extrato de levedura (EL) 1 g/L. Após se obter o valor de concentração de farelo de soja em que a atividade era maior foi feita uma otimização tendo como valores centrais glucose 1 g%, EL 0,7g% e farelo de soja 2g%. Os frascos foram inoculados com 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de células e incubados a  $37 \pm 2$  °C, 180 rpm por 24 horas. A interrupção dos cultivos foi feita por centrifugação, 15 min a 3.500 x g. O sobrenadante foi denominado extrato livre de células (ELC) que foi dialisado contra água destilada por 36 h, e então, utilizado para a determinação da atividade proteolítica. A determinação da atividade enzimática ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi quantificada pela metodologia de Hartree utilizando soro albumina bovina como substrato. O valor máximo de atividade encontrado foi: 42,99  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  para os cultivos em 2,6 % (m/v) de farelo de soja, 1,3 % (m/v) de glucose e 1,1 % (m/v) de extrato de levedura. Todos os resultados obtidos apresentam um nível de significância igual ou superior a 95 % nas quadruplicatas. Os resultados evidenciaram que o farelo de soja foi um substrato eficiente para a produção de proteases por *Bacillus amyloliquefaciens* M0-04b num meio de baixo custo por um processo simples.

**Palavras-chave:** Fermentação submersa. *Bacillus amyloliquefaciens*. Protease. Farelo de soja. Resíduos agroindustriais. Planejamento fatorial.

RAMOS, André Santos Ferreira Tavares. **Soybean meal as substrate for the production of proteases by bacillus amyloliquefaciens MO.04b.** 2017. 93 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Brazil is the world's second largest producer of soybeans with a total of 106 million tons produced in the 2016 harvest. Soybean meal is a by-product associated with the extraction of soybean oil with about 30,9 million tons produced, 30% of total production. Due to the presence of 47% proteins and 14% carbohydrates the soybean meal is a material with potential to be used as a substrate in fermentative processes. The *Bacillus* sp. is a well-recognized producer of proteolytic enzymes, used in large industrial scale in meat processing, cheese confection, detergent production among other applications. The objective of this work was to evaluate the production of proteases using soybean meal as a main substrate in submerged fermentation. The cultures were grown in 50 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of mineral salts medium KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L plus glucose 10 g/L. Different concentrations of soybean meal 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 2.0 and 4.0% (w / v) were tested for the production of proteases in the presence and absence of yeast extract (YE) 1 g/L. The soybean meal concentration at which the activity was highest was optimized with glucose as 1 g%, YE 0.7 g% and soybean meal 2 g%. The flasks were inoculated with 200 µL of cell suspension and incubated at 37 ± 2 ° C, 180 rpm for 24 hours. Interruption of cultures was done by centrifugation, 15 min at 3500 x g. The supernatant was called cell free extract (CFE) which was dialyzed with distilled water for 36 h and then used for the determination of proteolytic activity. The determination of the enzymatic activity (U.mL<sup>-1</sup>) was quantified by the Hartree methodology using bovine serum albumin as substrate. The maximum value of activity found was: 42.99 U.mL<sup>-1</sup> for the cultures in 2.6% (w/v) soybean meal, 1.3% (w/v) glucose and 1.1% (w/v) yeast extract. All the results obtained have a level of significance equal or greater than 95% and were performed in quadruplicates. The results showed that soybean meal was an efficient substrate for the production of proteases by *Bacillus amyloliquefaciens* M0-04b in a low cost medium by a simple process.

**Keywords:** Submerged fermentation. *Bacillus amyloliquefaciens*. Protease. Soybean meal. Agroindustrial residues. Optimization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Mecanismo enzimático das Serina Proteases .....	19
<b>Figura 2-</b>	Mecanismo enzimático das metaloproteases.....	20
<b>Figura 3-</b>	Resumo económico dos grãos de soja e farelo de soja para 2016.....	40
<b>Figura 4-</b>	Curva da biomassa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> M0-04b .....	48
<b>Figura 5-</b>	Atividade da protease usando peptona (A) , e extrato de levedura (B) em diferentes concentrações de farelo de soja no meio .....	50
<b>Figura 6-</b>	Curva de tempo para a produção enzimática de proteases por <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> MO-04b cultivado em farelo de soja 2% (m/v) e extrato de levedura 1% (m/v) .....	51
<b>Figura 7-</b>	Avaliação do pH em função das horas de fermentação.....	52
<b>Figura 8-</b>	Superfície de resposta para a produção de proteases utilizando extrato de levedura e glucose (U/ mL) .....	54
<b>Figura 9-</b>	uperfície de resposta para a produção de proteases utilizando extrato de levedura e farelo de soja (U/ mL).....	54
<b>Figura 10-</b>	Superfície de resposta para a produção de proteases utilizando glucose e farelo de soja (U/ mL) .....	55
<b>Figura 11-</b>	Gráfico de Pareto representando a significância das variáveis independentes .....	57
<b>Figura 12-</b>	Valores preditivos e observados.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Valores e projeções de transações globais envolvendo enzimas.....	15
<b>Tabela 2-</b>	Condições otimizadas para a produção de proteases em fermentação submersa.....	25
<b>Tabela 3-</b>	Condições otimizadas para a produção de proteases em fermentação sólida .....	26
<b>Tabela 4-</b>	Composição do farelo de soja .....	41
<b>Tabela 5-</b>	Composição do meio DYG's .....	43
<b>Tabela 6-</b>	Composição do meio mínimo de sais minerais .....	43
<b>Tabela 7-</b>	Composição centesimal dos resíduos agroindustriais .....	44
<b>Tabela 8-</b>	Valores Codificados otimização.....	46
<b>Tabela 9-</b>	Codificação dos valores para a otimização .....	47
<b>Tabela 10-</b>	Atividade enzimática por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO-04b em diferentes concentrações de Farelo de soja .....	49
<b>Tabela 11-</b>	Delineamento do composto central para a produção de proteases.....	53
<b>Tabela 12-</b>	Análise de variância dos dados obtidos pelo planejamento .....	56

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

Asp	Aspartato
Cis	Cisteína
DFP	Fluorofosfato de di-isopropilo
EL	Extrato de Levedura
ELC	Extrato livre de células
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Msm	Meio de Sais Minerais
OD	Densidade ótica
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
SmF	Fermentação Submersa
SSF	Fermentação Sólida
Ufc	Unidade formadora de colônias

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
3.1	PROTEASES .....	15
3.2.	FONTES DE PROTEASES .....	16
3.2.1	Proteases Microbianas .....	16
3.2.1.1	Bactérias .....	16
3.2.1.2	Vírus .....	16
3.2.1.3	Fungos .....	17
3.3	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES DE ACORDO COM A COMISSÃO DE ENZIMA .....	17
3.3.1	Exopeptídases .....	17
3.3.1.1	Amino peptidases .....	17
3.3.1.2	Peptidases carboxílicas .....	18
3.3.2	Endopeptídases .....	18
3.3.2.1	Serina proteases (EC.3.4.21) .....	18
3.3.2.2	Proteases cisteínicas (EC.3.4.22).....	19
3.3.2.3	Proteases aspárticas (EC 3.4.23).....	19
3.3.2.4	Metaloproteases (EC 3.4.24) .....	20
3.4	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS PROTEASES BACTERIANAS .....	20
3.4.1	Temperatura Ótima e Termo-Estabilidade das Proteases Alcalinas.....	21
3.4.2	pH ótimo das Proteases Alcalinas .....	21
3.4.3	Efeito dos Inibidores.....	22
3.4.4	Peso Molecular .....	22
3.5	REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE UMA EXOPROTEASE .....	22
3.5.1	Indução de Proteases Extracelulares.....	22
3.5.2	“Feed Back Expression “ .....	22

3.6	PRODUÇÃO DE PROTEASES POR BACILLUS SP.....	24
3.6.1	Produção de Proteases por Bacillus spp. em Fermentação Submersa .....	26
3.6.2	Produção de Proteases por Bacillus em Fermentação Sólida .....	29
3.6.3	Produção de Proteases por Bacillus spp. em Imobilização.....	30
3.7	COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO .....	30
3.7.1	Otimizações do Meio.....	31
3.7.1.2	Efeito das fontes de nitrogênio .....	32
3.7.1.3	Efeito de íons metálicos e sais .....	32
3.8	APLICAÇÕES DAS PROTEASES BACTERIANAS. ....	33
3.8.1	Industria de Detergentes .....	33
3.8.2	Indústria Alimentar .....	34
3.8.2.1	Peptídeos bioativos .....	34
3.8.2.2	Processamento de alimentos .....	35
3.8.3	Industria Farmacêutica .....	36
3.8.4	Industria Têxtil .....	37
3.8.5	Outras Aplicações.....	38
3.9	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	MICROORGANISMO .....	43
4.2	MEIOS DE CULTIVO .....	43
4.2.1	Meio de Manutenção (DYGS).....	43
4.2.2	Meio Mínimo de Sais Minerais .....	43
4.2.3	Resíduo Agroindustrial.....	44
4.3	PREPARO DO INÓCULO .....	44
4.4	FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	44
4.4.1	Preparação dos Cultivos .....	44
4.4.2	Interrupção dos Cultivos.....	44
4.4.2.1	Determinação do pH.....	44
4.4.3	Curva de Biomassa .....	45
4.5	PRODUÇÃO DE PROTEASE POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO-04B .....	45
4.5.1	Avaliação da Melhor Concentração de Farelo de Soja no Meio .....	45
4.5.2	Avaliação da Fonte de Nitrogênio .....	45

4.5.3	Avaliação da Cinética de Produção .....	45
4.5.4	Planejamento fatorial e Análise por Metodologia de Resposta .....	46
4.4.5	Determinação da Atividade Proteolítica.....	47
4.4.6	Determinação das Proteínas Totais.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1	CONSTRUÇÃO DA CURVA DE BIOMASSA .....	48
5.2	AVALIAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE SOJA NO MEIO .....	48
5.3	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE SOJA NA PRESENÇA DE PEPTONA E DE EXTRATO DE LEVEDURA.....	50
5.4	CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO-04B .....	51
5.5	AVALIAÇÃO DO PH EM FUNÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO .....	52
5.6	DELINEAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA POR RESPOSTA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO-04B .....	53
5.6.1	Delineamento Fatorial Para a Produção de Protease .....	53
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores orgânicos, que atuam em papéis vitais e muitos aspectos do dia a dia, desde a expressão dos nossos genes até processos industriais.

As enzimas focadas neste trabalho são as proteases, estas são comuns a todos os reinos animais, o que indica a sua importância e complexidade. A possibilidade de poder produzir estas enzimas por organismos conhecidos e caracterizados tem vantagens a nível de sistemas de produção com interações de componentes do meio conhecidas, como a possibilidade de aumentar ainda mais a rentabilidade das mesmas pelo aumento de produção.

As proteases constituem um dos maiores grupos de enzimas industriais, cerca de 65 % do total de mercado enzimático. Estas aplicam-se nas mais diversas áreas como alimentar, farmacêutica, têxtil, médica entre muitas outras. Os dados mais recentes apontam um volume de negócios de mais de 3 bilhões de dólares americanos.

A valorização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de biomoléculas é de extrema importância, uma vez que permite baixar os custos da produção e reutilizar, muitas vezes materiais com um fim incerto. Uma vez que o Brasil se encontra numa fase de expansão na indústria de produção de biomoléculas, será fundamental demonstrar a aplicabilidade tanto de microrganismos provenientes do bioma, como de substratos passíveis de serem utilizados.

Dessa forma pretende-se neste trabalho a produção de proteases em fermentação submersa e maximizar a sua produção através de delineamentos fatoriais nos componentes do meio.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b, utilizando farelo de soja no meio, por fermentação submersa.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o efeito da concentração de farelo de soja no meio para a produção de proteases em função do tempo;
- Avaliar a concentração de farelo de soja quando adicionado extrato de levedura e peptona ao meio;
- Determinar a curva de produção em função do tempo;
- Produzir a enzima através do método estatístico do delineamento do composto central em fermentação submersa.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 PROTEASES

As proteases são uma classe de enzimas hidrolíticas que atraem atenção por serem produzidas por diversos organismos e por suas diversas propriedades e aplicabilidades. As proteases são enzimas que hidrolisam proteínas pela adição de água na ligação peptídica e catalisam a síntese peptídica em solventes orgânicos e em solventes com um baixo teor de água (SOOKKHEO et al., 2000; BEG et al., 2003). A hidrólise das ligações peptídicas tem como produtos, fragmentos peptídicos e/ou aminoácidos livres.

As enzimas proteolíticas são encontradas em todos os organismos vivos, e são essenciais para o crescimento celular e diferenciação. O interesse no estudo das enzimas proteolíticas tem sido amplamente renovado devido ao reconhecimento que estas enzimas não possuem apenas papéis importantes nos processos metabólicos, mas também tem ganhado atenção pela comunidade industrial (GUPTA et al., 2002). As proteases são responsáveis por uma grande faixa no mercado de enzimas, como se pode ver na tabela 1. No entanto segundo o relatório de prospecções da Advanced Enzymes® (2016, p. 37), “[...]. As carbohidrases irão continuar a representar a maior categoria de enzimas usadas, devido aos grandes mercados de processamento de etanol e produção e féculas e amidos, bem como aplicações em alimentos e bebidas, têxteis e medicamentos.”

**Tabela 1-** Valores e projeções de transações globais envolvendo enzimas

<b>DEMANDA MUNDIAL DE ENZIMAS POR TIPO (MILHÕES DE US \$)</b>					
<b>Ano</b>	2002	2007	2012	2017	2022
CARBOIDRASES	775	1295	1835	2340	3060
PROTEASES	765	1050	1315	1760	2345
POLMERASES / NUCLEASES	250	370	555	840	1270
LIPASES	114	187	255	345	460
FITASES	79	178	210	300	400
OUTRAS ENZIMAS	282	435	685	950	1355
<b>TOTAL</b>	2400	3700	5130	6950	9500

**FONTE:** Adaptado de Advanced Enzymes

## 3.2. FONTES DE PROTEASES

Uma vez que as proteases são necessárias nos processos fisiológicos para diversas atividades metabólicas dos organismos vivos. Elas podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos.

### 3.2.1 Proteases Microbianas

As proteases estão distribuídas por toda a microbiota. Embora as proteases estejam presentes em todos os reinos, os microrganismos são a fonte preferível para a obtenção destas enzimas sendo que estas são cerca de 46 % da produção comercial global (Tabela 1). As serina proteases (EC 3.4.21) estão entre as mais importantes comercialmente (KUMAR e TAKAGI, 1999; PRAKASHAM et al., 2006). O interesse da indústria pelas proteases microbianas se deve ao seu rápido crescimento, relação preço custo e a possibilidade de melhorar geneticamente a produção de enzimas com vista a obtenção de melhores propriedades e rendimentos.

#### 3.2.1.1 Bactérias

Como mencionado anteriormente grande parte das proteases comerciais são de origem bacteriana. Estas enzimas são produzidas por uma grande variedade de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter*, *Thermoactinomyces* e espécies pertencendo a *Sterptomyce*, no entanto o género *Bacillus* é a maior fonte de proteases uma vez que excreta uma grande diversidade de enzimas para o meio extracelular. As proteases alcalinas de fonte bacteriana são muito utilizadas na formulação de detergentes devido à sua alta atividade e estabilidade a um pH alto (9 – 11) e a uma temperatura alta (50 – 60 °C). As proteases neutras de origem bacteriana, chamadas comercialmente por Neutrase® produzidas por *B. amyloliquefaciens* pela Novozyme Enzymes® são ativas a um pH entre 5 – 8 e uma temperatura entre 35 – 40 °C. Um dos primeiros trabalhos que reporta uma protease alcalina em *Bacillus spp.* foi publicado em 1971 por Horikoshi. Existem também outros tipos de proteases como gelatinolíticas e fibrinolíticas (BIJENDER B. et al., 2014).

#### 3.2.1.2 Vírus

As proteases virais estão muitas vezes envolvidas em processos fatais para a vida como AIDS e cancro. As enzimas codificadas no genoma do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), como a transcriptase reversa (TR) e a

integrase (INT) derivam da proteólise de uma poli-proteína (Gag-pol). O genoma viral catalisa a Gagpol que é ativa como um homodímero, um dímero proteico cuja constituição é exatamente idêntica (OLIVARES et al., 2007). Grande parte das proteases virais são endopeptídases ao invés de exopeptídases (RAWLING e BARRELL, 1993). O estudo destas proteases visa a criação de inibidores sintéticos para a formulação de vacinas e medicamentos ao invés de aplicações agrícolas e alimentares ou de indústria básica.

### 3.2.1.3 Fungos

Os fungos sintetizam uma maior variedade de proteases do que as bactérias. Os fungos filamentosos são usados com muita eficiência para a secreção de várias enzimas hidrolíticas, como as proteases. Estas enzimas usualmente mostram melhores resultados comparativamente com as bactérias quando cultivadas em fermentação sólida (PANDEY et al., 1999). Os fungos são conhecidos por produzir proteases ácidas, neutras, alcalinas e metaloproteases. Um único organismo pode produzir mais de um tipo de protease. As proteases fúngicas são ativas numa grande faixa de pH desde 4 a 11 e exibem diversas especificidades pelo substrato.

## 3.3 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES DE ACORDO COM A COMISSÃO DE ENZIMA

De acordo a nomenclatura do Comité internacional da União de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas como hidrolases. As proteases podem ainda ser classificadas de acordos com os 3 critérios apresentados: A reação catalisada, natureza química do sitio ativo, relação evolucionaria revelada pela estrutura.

Uma outra caracterização é o lugar de ação da enzima na cadeia polipeptídica, onde podem ser tanto exopeptidases como endo peptidases

### 3.3.1 Exopeptídases

Estas enzimas atuam somente no final das cadeias polipeptídicas. Baseado no seu lugar de ação ou o terminal amina ou o carboxílico, podem ser classificadas como peptidases amino- e / ou carboxílicas (RAKSAKULTHAI e HAARD, 2003).

#### 3.3.1.1 Amino peptidases

As amino proteases atuam numa terminal amina livre da cadeia polipeptídica, liberando um único amino ácido, um dipéptido ou um tripéptido. Estas enzimas são

produzidas numa grande variedade de espécies microbianas como bactérias e fungos .A maioria dela requer íons divalentes como  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ou  $Zn^{+2}$  para a sua atividade ser ótima ( NADIA Z. et al., 2013).

### 3.3.1.2 Peptidases carboxílicas

As peptidases carboxílicas digerem a proteína e liberam um único aminoácido ou um dipéptido no terminal carboxílico. São conhecidos três grupos distintos de carboxipeptídases como, metalo-carboxipeptidases e cisteína-carboxipeptídase, dependendo do aminoácido presente no sítio ativo enzimático (VERMELHO A. et al., 2008). As carboxipeptídases serínicas podem ser isoladas de diferentes fungos e apesar de todas terem diferentes pH ótimos, diferentes temperaturas ótimas e diferente peso molecular elas apresentam o mesmo perfil de substratos. Já as metalo-carboxipeptídases isoladas de *Pseudomonas e Saccharomyces* requerem  $Zn^{+2}$  ou  $Co^{+2}$  para a sua atividade (JAI KAUSHIK et al., 2006)

### 3.3.2 Endopeptídases

As endopeptídases atuam nas ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica, afastadas tanto do terminal amina como carboxílico. As endopeptídases dividem-se em quatro subgrupos de acordo como o seu mecanismo catalítico: serina proteases, proteases aspárticas, proteases cisteínicas e metalo-proteases (VERMELHO A. et al., 2008)

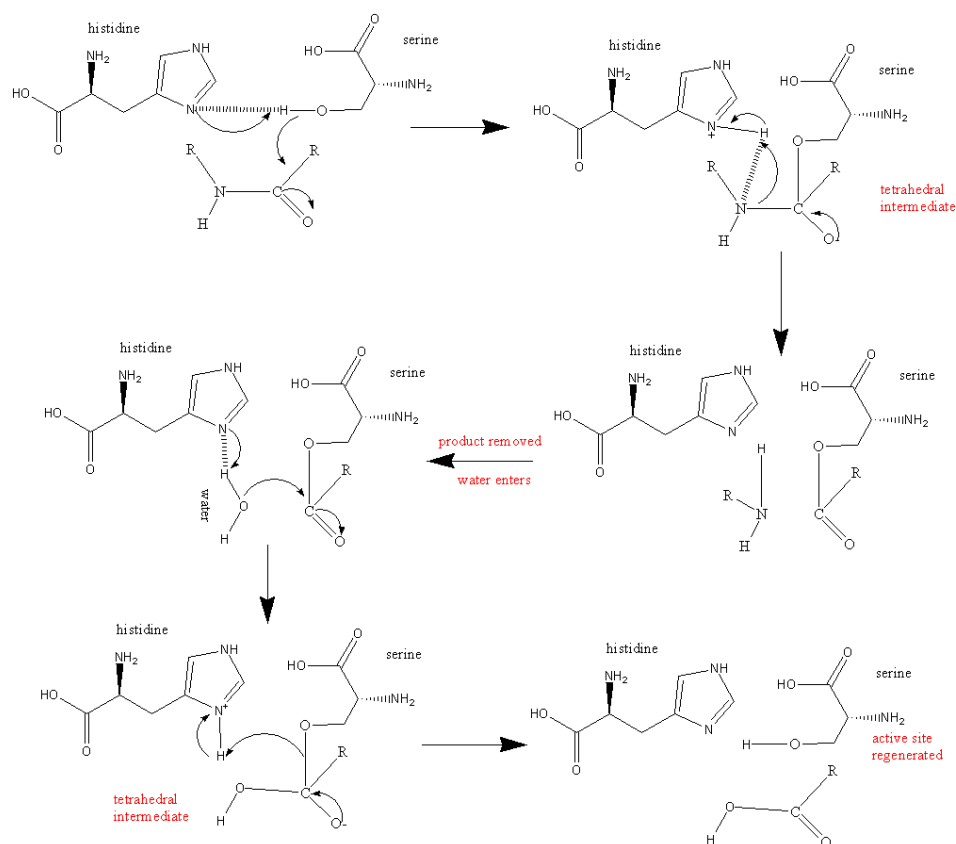
#### 3.3.2.1 Serina proteases (EC.3.4.21)

As serina proteases são caracterizadas por terem serina no local ativo. Elas estão presentes e relatadas em bactérias, fungos e vírus, são encontradas em endopeptídases, bem como exopeptídases.

A tríade catalítica é formada por três resíduos essenciais que são His (base), Asp (eletrófilo) e Ser (nucleófilo). O primeiro passo na catálise é a formação de um grupo acíl uma enzima intermédia entre o substrato e a forma de serina essencial. A formação deste covalente intermediário procede o estado de transição tetraédrico negativamente carregado e então a ligação peptídica é clivada. Durante o segundo passo ou desacilação, o intermediário acilo-enzima é hidrolisado por uma molécula de água para libertar o peptídeo e restaurar o Ser-hidróxilo da enzima (Figura 2). A desacilação, que também envolve a formação de um tetraédrico intermediário de transição, prossegue através da via de reação inversa de acilação. Uma molécula de água age como

nucleófilo atacante em vez do resíduo Ser. Os resíduos fornecem uma base geral e aceitam o grupo OH do resíduo Ser reativo (Rao et al., 1998).

**Figura 1-** Mecanismo enzimático das Serina Proteases



**Fonte:** Carnegie Mellon University

### 3.3.2.2 Proteases cisteínicas (EC.3.4.22)

Relativamente às proteases cisteínicas a catálise procede através da formação de um intermediário covalente e envolve uma cisteína (Cis) e um resíduo de histidina. Os resíduos de Cis e His essenciais desempenham o mesmo papel que Ser e His, respetivamente, como nas serina proteases. O nucleófilo é um íon tiolato em vez de um grupo hidroxilo. O íon tiolato é estabilizado através da formação de um par de íons com o grupo imidazólio vizinho de His. O nucleófilo atacante é o par de íons tiolato-imidazólio em ambos os passos (ZBIGNIEW G. et al., 2001).

### 3.3.2.3 Proteases aspárticas (EC 3.4.23)

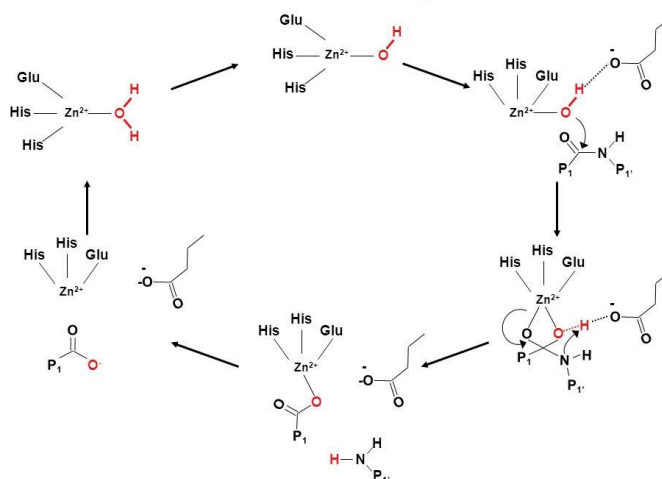
As proteases de ácido aspártico, conhecidas como proteases ácidas, são as endopeptidases que dependem dos resíduos de ácido aspártico para a sua atividade catalítica. As proteases ácidas foram agrupadas em três famílias, nomeadamente pepsina, retropepsina e pararetrovírais. A maioria das proteases aspárticas exibem

atividade máxima a pH baixo e têm pontos isoelétricos na gama de pH 3 a 4,5. Os seus pesos moleculares estão na gama de 30 a 45 kDa. As proteases aspárticas são inibidas pela pepstatina (VIRGINIA et al., 2016).

### 3.3.2.4 Metaloproteases (EC 3.4.24)

O mecanismo catalítico por metaloproteases envolve a formação de um intermediário tetraédrico não covalente após o ataque de uma molécula de água ligada ao zinco no grupo carbonilo da ligação “scissile”. Este intermediário é ainda decomposto pela transferência do protão do ácido glutâmico para o grupo de saída da molécula (SHANSHAN WU et al., 2010).

**Figura 2-** Mecanismo enzimático das metaloproteases



**Fonte:** [https://chem.libretexts.org/Core/Biological\\_Chemistry/Catalysts/Metalloproteases](https://chem.libretexts.org/Core/Biological_Chemistry/Catalysts/Metalloproteases)

### 3.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS PROTEASES BACTERIANAS

As proteases bacterianas como mencionado anteriormente são geralmente alcalinas (com exceção das neutras) e exibem uma atividade ótima a uma gama de pH entre 8,0 e 11,0 são inativadas por inibidores do sítio ativo de serina tais como fenil-metil sulfonil fluorida (PMSF) e diisopropil fluoro fosfato (DIFP). Estas enzimas são concentradas em detergentes e no processamento de peles (ENZYME ASSAYS: A PRACTICAL APPROACH, 2002). As proteases alcalinas segregadas por bacilos neutrófilos e alcalófilos são de grande interesse comercialmente e representam uma fonte principal de enzimas proteolíticas produzidas. Elas são produzidas principalmente extracelularmente (KALISZ e SCHULTZ, 2008) com um peso molecular variando de 20.000 a 30.000 daltons, são estabilizadas por Ca<sup>2+</sup> e possuem ponto isoelétrico caracteristicamente alto (RAHMAN et al., 2005).

### 3.4.1 Temperatura Ótima e Termo-Estabilidade das Proteases Alcalinas

A estabilidade térmica das enzimas é afetada por pelo menos dois fatores isolados ou em combinação. O primeiro é a estrutura primária da enzima. Um elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos na molécula enzimática proporciona uma estrutura compacta, que não é desnaturada facilmente por uma alteração no ambiente externo. Além disso, as pontes dissulfureto e outras ligações proporcionam uma elevada resistência tanto à inativação do calor como à desnaturação química. Em segundo lugar, componentes específicos como polissacarídeos e cátions divalentes, se presentes, podem estabilizar a molécula (ÖZTÜRK, 2001).

Embora não haja evidência firme de que as enzimas termoestáveis derivam necessariamente de organismos termofílicos há, no entanto, uma maior chance de encontrar proteínas termoestáveis a partir de bactérias termofílicas (RAHMAN et al., 1994). Assim, uma vasta gama de proteases microbianas de espécies termofílicas como *Thermus sp.*, *Desulfurococcus* e alguns *Bacillus spp.*, têm sido amplamente purificadas e caracterizadas.

Um dos primeiros bacilos termófilos e alcalifílicos isolados foi uma estirpe de *B. stearothermophilus* isolada por Salleh em 1977, que é estável a 60°C (HAKI E RAKSHIT, 2003). Inúmeros estudos sobre proteases alcalinas microbianas têm sido feitos tendo em vista de sua relação estrutura-função e possíveis aplicações, pois industrialmente são precisos biocatalisadores estáveis capazes de suportar condições de temperaturas altas e pH não neutros.

### 3.4.2 pH ótimo das Proteases Alcalinas

Como as enzimas são moléculas anfotéricas contêm um grande número de grupos ácidos e básicos, localizados principalmente na sua superfície. As cargas nesses grupos variarão, de acordo com suas constantes de dissociação ácida, com o pH de seu ambiente. Isto afetará a carga líquida total das enzimas e a distribuição de cargas nas suas superfícies exteriores, para além da reatividade dos grupos catalisadores ativos. Estes efeitos são especialmente importantes na vizinhança dos sítios ativos, os quais irão repercutir efeitos na atividade, estabilidade estrutural e solubilidade da enzima (MITAL et al., 2006). A maioria das proteases comerciais disponíveis são do tipo subtilisina e são ativas na faixa de pH de 8 - 12. As proteases alcalinas de *Bacillus* apresentam uma atividade ótima e uma boa estabilidade a valores de pH alcalinos elevados (MITAL et al., 2006)

### 3.4.3 Efeito dos Inibidores

Os perfis de inibição de uma enzima dão uma ideia da sua natureza. De fato, a natureza do local ativo e o cofator necessário de uma enzima também podem ser avaliados por estudos usando inibidores (JASON et al., 2000). As proteases alcalinas são completamente inibidas pelo fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e fluorofosfato de di-isopropilo (DFP). A perda de atividade é atribuída à sulfonação do resíduo de serina essencial no local ativo por PMSF. Este padrão de inibição ilustrado pelas proteases alcalinas classifica-as como serina hidrólases (ÖZLEM et al., 2008). No caso das metalo proteases a inibição ocorre na presença de agentes quelantes como o EDTA e EGTA. As proteases cisteínicas são inibidas por indoacetamida e *p*-CMB, enquanto que as proteases aspárticas ou carboxílicas apenas são inibidas por pepstatina (SANDHYA C. et al., 2006).

### 3.4.4 Peso Molecular

As proteases alcalinas são biocatalisadores com massas moleculares situadas na gama de 15 a 30 KDa. Existem muitos poucos relatos com proteases alcalinas de massas moleculares mais elevadas 32KDa (HUANG *et al.*, 2003), 45 e 69 KDa (ZAREENA et al., 2014). O tamanho diminuto destas proteases certamente é uma vantagem para a sua produção de certa forma contínua.

## 3.5 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE UMA EXOPROTEASE

### 3.5.1 Indução de Proteases Extracelulares

Priest em 1977 propôs que a síntese de uma enzima extracelular é parcialmente constitutiva e parcialmente induzível. As enzimas catabólicas são normalmente induzidas pelo substrato enzimático, mas as exoenzimas são uma exceção, na medida em que são presumivelmente segregadas porque o substrato é incapaz de entrar na célula. O substrato, portanto, não induz diretamente a enzima. Está agora estabelecido que um baixo nível basal de exoenzimas constitutivas degrada o seu substrato exógeno e os produtos resultantes de baixo peso molecular entram na célula e induzem uma nova síntese enzimática. Portanto, o mecanismo de indução de exoproteases é mais ou menos empírico (PRIEST 1977).

### 3.5.2 “Feed Back Expression “

Os produtos finais da exoenzima podem reprimir a síntese da enzima de uma maneira semelhante à repressão do produto final das enzimas anabólicas intracelulares.

A síntese de proteases extracelulares é bem regulada e é fortemente reprimida pela presença de aminoácidos ou peptídeos no ambiente (DOROTHY et al., 2012). A síntese de exoproteases pode ser reprimida por diversas causas como radicais livres e até mesmo aminoácidos (HENRIETTA et al., 2006).

Comumente observa-se que as proteases extracelulares são sintetizadas durante a fase exponencial tardia do crescimento (LOPEZ e LOPERA, 2009). Tem sido demonstrado que a esporulação está relacionada com a síntese das serina proteases. Estudos de isolamento de mutantes demonstraram que durante a esporulação são elaboradas duas serina proteases que diferem em suas propriedades físico-químicas. O mutante asporogénico poderia sintetizar proteases de serina extracelulares a uma temperatura não permissiva. Isto sugere que a esporulação pode ser separada da síntese de proteínas extracelulares. Mas, na ausência de serina proteases intracelulares, a esporulação e a produção de proteínas não acontece. O estudo de cultura em batelada e cultura contínua revela que a síntese de proteases se torna máxima quando a esporulação começa (HANDBOOK ON THE BIOLOGY OF BACTERIA, 2006).

### 3.6 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *BACILLUS* SP.

As proteases das estirpes de *Bacillus* são amplamente estudadas e uma das principais razões são as propriedades interessantes que apresentam, incluindo alta atividade, estabilidade e em alguns casos, seletividade para o substrato. Portanto, são vários estudos focados na triagem, purificação e caracterização destas enzimas (JAIN et al., 2012; RAJKUMAR et al., 2011).

Neste contexto, as proteases de *Bacillus spp.* apresentam várias características notáveis para muitas aplicações industriais. Tendo em consideração a ampla gama de pH, temperatura da atividade e estabilidade, estas proteases são aplicadas por exemplo em indústrias detergentes para a remoção de manchas em tecidos (ANNAMALAI et al., 2013). Para esta aplicação, a enzima tem de ser altamente tolerante ao ambiente alcalino e não pode ser inativada por vários compostos tóxicos, incluindo oxidantes e surfactantes. Além disso, as proteases de *Bacillus spp.* podem também ser aplicadas na indústria alimentar para clarificação da goma xantana (ARMENTROUT et al., 1999), obtenção de peptídeos bioativos e processamento de diferentes alimentos (BOUGATEF et al., 2012, OZCAN e KURDAL, 2012).

Outra característica destas proteases é a estabilidade em solventes orgânicos e, portanto, a sua aplicação em síntese orgânica (CAILLE et al., 2002). Para esta última aplicação, a imobilização da enzima pode ser muito atraente e a reutilização da enzima pode ser realizada (CORÍCI et al., 2011).

Com base em todos estes aspectos interessantes das proteases do gênero *Bacillus*, estas enzimas são as mais comercializadas e frequentemente relatados vários estudos utilizando estirpes de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (FERREIRA et al., 2003, OZCAN e KURDAL, 2012). O uso de microrganismos para a produção de proteases apresenta vantagens em comparação com outras fontes, mas não é necessariamente rentável, simplesmente pelo fato dos componentes dos meios e o processamento de fermentação em larga escala ser dispendioso e frequentemente não permitir a viabilidade da produção de enzima (contaminação, mutação entre outros problemas). Assim, o primeiro passo importante é a seleção de uma estirpe de *Bacillus sp.* capaz de produzir grandes quantidades de proteases com propriedades desejáveis e controláveis.

Com a crescente ênfase na rentabilidade para a produção de enzimas, o uso de um meio de fermentação com baixo custo tem sofrido uma imensa pressão para um alto

lucro comercial, considerando que os custos dos componentes de fermentação correspondem a aproximadamente 30 a 40% do custo total (KIRK et al., 2002).

Por este motivo, o uso de resíduos e subprodutos agrícolas é o foco de vários estudos para torná-los alternativas aos componentes caros purificados como, monossacarídeos e oligossacarídeos, e fontes de proteínas, tais como peptona e caseína. Na tabela 2 e 3, mostra-se as condições otimizadas para a produção de proteases por diferentes *Bacillus* sp. em fermentação submersa (SmF) e fermentação sólida (SSF) respectivamente, utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais como componente de meios de cultura.

Estirpe	pH inicial meio	Temperatura (°C)	Agitação (Rpm)	Tempo (h)	Substrato	Atividade (U / mL)	Referência
<i>Bacillus</i> sp. BGS	11	37	150	48	Melaço	2992,75	Moorthy e Bascar, 2013
<i>B. subtilis</i> PCSI-5	7,5	37	120	48	Farelo soja	107	Nadeem et al., 2006
<i>B. subtilis</i>	10	37	150	48	Melaço e milhocina	401	Helal et al., 2012
<i>Bacillus pantotheneticus</i>	10	30	120	48	Melaço e farelo trigo	285	Shikha et al., 2007

**Tabela 2-** Condições otimizadas para a produção de proteases em fermentação submersa

**Fonte:** O autor

O aspecto mais importante é a produção ótima da protease e para este efeito a concentração de substratos, temperatura, pH, agitação e aeração deve ser otimizada. O uso de técnicas estatísticas, incluindo o design de Plackett Burman para a seleção das variáveis, o delineamento do composto central e a metodologia de superfície de resposta para a otimização das variáveis também é muito importante (CHENG et al., 2012). Nesta seção serão relatados e discutidos os aspectos mais importantes da produção de

proteases, tais como a produção da enzima por SmF, SSF e a imobilização do *Bacillus sp.* para a produção de proteases em SmF.

**Tabela 3-** Condições otimizadas para a produção de proteases em fermentação sólida

Estirpe <i>Bacillus</i> spp.	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Substrato	Atividade (U / g)	Referência
<i>Bacillus sp.</i> JB-99	90-95	50	96	Farelo de trigo bagaço cana	7000	Shivashara e Naik, 2012
<i>B. subtilis</i> KHS-1	60	37	72	Casca grão de bico verde	8848	Ramakrish et al., 2012
<i>Bacillus</i> <i>pumilus</i> SG2	60	60	72	Prensado <i>Pongonmia</i> <i>pinnata</i>	9840	Sangeetha et al., 2011
<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	50	40	48	Casca grão de bico vermelho	258	Rathakrish e Nagarajan, 2011

**Fonte:** O autor

### 3.6.1 Produção de Proteases por *Bacillus spp.* em Fermentação Submersa

Aproximadamente 90% de todos os biocatalisadores industriais são produzidos em SmF, utilizando meios especificamente otimizados. Usar uma técnica de produção por SmF proporciona várias vantagens, incluindo redução da contaminação devido ao período de crescimento relativamente curto, níveis de conversão mais elevados dos substratos devido ao período de crescimento controlado, menos trabalho de monitorização da produção e métodos de expansão escalonados bem desenvolvidos (GUPTA et al., 2002). O efeito das condições nutricionais e ambientais sobre a síntese de proteases desempenha um papel importante na repressão ou expressão da enzima (GUPTA et al., 2002). Além disso, cada microrganismo tem as suas próprias condições específicas para a produção máxima de protease. A parte mais difícil na otimização das

condições de cultura é a interação entre os componentes do meio e os fatores de condição de cultura (JISHA V N. et al., 2013).

As proteases são extensivamente produzidas durante a fase estacionária e, geralmente reguladas pelo estresse de carbono e nitrogênio. Elas estão associadas com o início da fase estacionária, pela transição do crescimento vegetativo para o estágio inicial de formação de esporos. Assim, a produção de protease está frequentemente relacionada com a fase de esporulação em muitos *Bacillus* (PALANIYANDI, YANG e SUH, 2013).

Por outro lado, com base em alguns relatos, pode-se concluir que a esporulação e a produção de proteases não estão relacionadas, uma vez que estirpes deficientes em esporos de *B. licheniformis* produziram proteases (FLEMING et al., 1995).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, o pH é um parâmetro muito importante para a produção de protease de *Bacillus sp.* sob SmF, considerando geralmente que o pH dos meios de cultura, afeta tanto as características morfológicas quanto as fisiológicas de um organismo e, além disso, afeta fortemente muitos processos enzimáticos e transporte de compostos através da membrana celular. Além disso, a produção das proteases pode ser influenciada pela agitação, devido à dificuldade de manter suficiente oxigênio dissolvido (OD) para o crescimento celular, como descrito no trabalho de JOO e CHANG (2006).

Tendo em conta que existem vários parâmetros que interferem na produção de proteases, MOORTHY e BASKAR, (2013) que estudaram a produção de proteases pela estirpe bacteriana *Bacillus sp. BGS*, a estirpe foi isolada do efluente de uma indústria de processamento de leite e algumas variáveis foram avaliadas para a produção de enzima. A secreção de protease extracelular é influenciada não só por fontes de carbono e nitrogênio, mas também por condições de cultura, por exemplo, pH, temperatura, concentração celular e densidade de inóculo. Melaço, peptona, pH e tamanho do inóculo foram selecionados como os mais importantes para a produção de protease, pelos autores. Usando um planejamento de Plackett-Burman a estirpe bacteriana escolhida para este estudo mostrou um aumento gradual no crescimento e produção de protease com um aumento no pH (7-11), indicando a natureza alcalófila da estirpe bacteriana. O tamanho do inóculo também foi importante, considerando que o tamanho elevado do inóculo pode atenuar a produção de enzimas devido à competição pelos nutrientes disponíveis, enquanto que o baixo tamanho do inóculo resulta numa menor secreção enzimática, devido a uma diminuição no número de células. Após a otimização

utilizando um sistema híbrido com superfície de resposta e um algoritmo genético, a concentração ótima de componentes de meios e condições de cultura encontrada foi de 16,82 g / L de peptona, 11,28 g / L de melão, pH de 11 e 2% (V / v) de inóculo. A atividade da protease aumentou significativamente com um meio otimizado (2.992,75 U / mL) em oposição ao meio basal antes da otimização (470,35 U / mL).

A protease de *B. amyloliquefaciens* B7 foi estudada por CHENG et al. (2012). As necessidades nutricionais para a produção de protease alcalina foram otimizadas inicialmente pelo “screening” dos nutrientes num experimento sem contar interação entre eles e, em seguida, um planejamento Plackett-Burman, pelo qual frutose e extrato de levedura foram identificados como as variáveis mais significativas. A produção de protease aumentou aproximadamente 3,92 vezes comparando a produção de protease utilizando o meio original (51,49 U / mL) ao meio otimizado (242,45 U / mL) composto por 54,14 g / L de frutose e 16 g / L de extrato de levedura. Após a otimização, os autores estudaram a produção de protease em cultivos em batelada num biorreator de 10 L, resultando em 3120,55 U / mL de atividade enzimática máxima.

O *Bacillus* sp. SW-2 foi estudado para produção de protease em fermentação em utilizando resíduos de baixo custo. O rendimento máximo de protease de  $2,69 \pm 0,19$  U / mL foi obtido às 72 h, pH inicial 9, a 45 ° C e utilizando 5% de inóculo e farinha de soja (10 g / L) e bagaço de cana (10 g / L) a 180 rpm. A produção de proteases utilizando os substratos de baixo custo foi significativamente mais elevada do que a obtida a partir de substratos dispendiosos (sacarose e peptona) (WELLINGTA e MEIRA, 2006).

A produção e as características de uma protease do *Bacillus clausii* I-52 foram estudadas por JOO e CHANG (2006). A enzima foi produzida sob SmF e os autores observaram que o pH inicial do meio desempenha um papel crítico para o crescimento celular e a produção de protease tendo em conta o rendimento da protease. O crescimento celular foi substancialmente reduzido em pH neutro indicando que *B. clausii* I-52 era um alcalófilo obrigatório. Os parâmetros ambientais ótimos para a produção de protease foram observados a uma velocidade de agitação de 700 rpm e uma taxa de arejamento de 1,5 vvm a 37 ° C. Deste modo, obteve-se a atividade enzimática máxima (137,020 U / mL) quando as células foram cultivadas nas condições a 37 ° C durante 48 h com uma taxa de arejamento de 1,5 vvm e uma velocidade de agitação de 700 rpm num meio (pH 10,6) contendo farelo de soja, farelo de trigo, maltose líquida, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaCl, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 4 %, 1 %, 0,1 %, 4%, 0,5 % e 6 % (P/V) respetivamente.

### 3.6.2 Produção de Proteases por *Bacillus* em Fermentação Sólida

A fermentação em estado sólido (SSF) envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, como farelo de trigo e outros resíduos agroindustriais em condições de umidade controlada. O substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (PANDEY, 2000). Apesar da grande importância industrial da SmF, a SSF apresenta algumas vantagens em relação à primeira, incluindo a simplicidade dos meios de cultivo, a economia de espaço para a fermentação, a não exigência de máquinas complexas, a compacidade do recipiente de fermentação devido ao menor volume de água, equipamentos ou sistemas de controle, rendimentos superiores, menor investimento de capital e despesas recorrentes e menor demanda de energia (LONSANE et al.2005). Adicionalmente, tais sistemas podem ser aplicados na gestão de resíduos sólidos, na conservação da energia da biomassa e na produção de metabolitos secundários.

No entanto, a SSF apresenta algumas limitações, incluindo o monitoramento de parâmetros como temperatura, pH, umidade e fluxo de ar e um número limitado de microrganismos capazes de crescer sob tais condições de umidade (PANDEY et al., 2000). Contrariamente à SmF a SSF oferece inúmeras oportunidades na transformação de resíduos agroindustriais e subprodutos. Parte disso é porque os processos de estado sólido requerem menos energia, e produzem menos águas residuais. Além disso, eles são ambientalmente amigáveis, tendo em conta que resolvem o problema da eliminação de resíduos sólidos.

Diferente da SmF, a SFF tem alguns outros parâmetros que devem ser estudados com muita cautela, como o tamanho de partícula do substrato sólido. A disponibilidade de área de superfície é de extrema importância para a adesão microbiana, transferência de massa dos vários nutrientes, composição dos substratos e, conseqüentemente, o crescimento microbiano e formação de enzimas. A disponibilidade de área de superfície depende verdadeiramente da relação do tamanho de partícula na matriz substrato / suporte. O teor de umidade / teor de água é também um dos fatores mais críticos, considerando o crescimento microbiano de SSF pois a formação do produto ocorre na superfície da partícula sólida do substrato com baixos teores de umidade (PANDEY et al., 2000).

### 3.6.3 Produção de Proteases por *Bacillus spp.* em Imobilização

As proteases de *Bacillus sp.* são normalmente obtidas a partir de células livres (SmF e SSF) ou imobilizadas. Neste último caso, as células são usualmente aprisionadas num polímero natural ou sintético. A técnica de imobilização tem que ser suave o suficiente para não inativar as células e manter o metabolismo ou até mesmo melhorá-lo. Diferentes aspectos das células imobilizadas devem ser avaliados, tais como concentração do gel, período de solidificação e  $\text{CaCl}_2$  para o caso da gelificação iônica, concentração celular, tamanho do aglomerado e porosidade. A imobilização de células inteiras apresenta várias vantagens quando comparada a sistemas de células livres, tais como maior rendimento da atividade enzimática, maior estabilidade operacional, maior resistência a perturbações ambientais, menor custo de enzima e uso repetido do biocatalisador (CARLA et al., 2005). Após a imobilização das células, a fermentação pode ser realizada em SmF. A matriz de imobilização mais utilizada são os polissacarídeos como alginato, k-carragenano, ágar, quitosana, levando em conta que a formação desses géis ocorre em condições muito suaves e caracteriza-se pelo baixo custo (BLADINO et al., 2001). A imobilização de células microbianas em alginato por gelificação iônica utilizando cátions divalentes tem sido amplamente aplicada para o aprisionamento de células viáveis para a produção de um grande número de enzimas (MRUDULA e SHYAM, 2012; KAR et al., 2008).

Kunamneni e Adinarayana (2005) produziram proteases alcalinas de *B. subtilis* PE-11, em diversas matrizes em comparação com o cultivo de células livres em fermentação submersa. Os autores reportam um aumento de 79.03 % de produção de proteases, 15 U/ mL/ hora, com o aprisionamento da célula em alginato de cálcio.

### 3.7 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Os microrganismos são cultivados para diversas finalidades na presença de um ambiente bioquímico e biofísico apropriado. O ambiente bioquímico é composto pelos nutrientes conhecidos como o meio de cultura. Dentro das bactérias cultiváveis e das necessidades especiais das mesmas, uma grande variedade de meios de cultura têm sido desenvolvidos para diferentes finalidades e usos (TODAR 2000). Genericamente existem dois tipos principais de meios de acordo da sua composição. Um meio quimicamente sintético definido, é aquele em que a composição química exata é conhecida. Um meio complexo ou indefinido é aquele em que a constituição química

exata do meio não é conhecida. Os meios definidos são geralmente compostos de bioquímicos puros. Um meio contendo glucose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e  $\text{MgCl}_2$  é um exemplo de um meio definido. Os meios complexos contêm geralmente materiais complexos de origem biológica tais como soja, extrato de levedura, peptona, melão ou licor de milho, cuja composição química exata é obviamente indeterminada.

Na indústria, os meios complexos são preferidos uma vez que a atividade enzimática atingível e os rendimentos celulares são muito mais elevados do que os meios definidos devido à presença de fatores de crescimento, vitaminas, hormônios e oligoelementos necessários. Também pelo seu custo, pois podem ser ou não resíduos industriais, e o seu valor será sempre inferior que um composto químico com um grau de pureza elevado ( $> 98.5\%$ ) (JISHA V. N. et al., 2013).

### 3.7.1 Otimizações do Meio

Para fins comerciais, a otimização da composição do meio é feita para conseguir determinar os melhores rendimentos, interações entre componentes nos valores da produção. A otimização ajuda também a minimizar a quantidade de componentes não utilizados no final da fermentação aumentando os rendimentos lucrativos de forma direta. Os esforços de pesquisa neste método têm prestado uma atenção principalmente para:

- I. Teste e comparação do efeito de diferentes nutrientes de carbono e nitrogênio como substratos no rendimento de enzimas;
- II. A necessidade de íons metálicos bivalentes no meio de fermentação;
- III. Otimização de parâmetros do processo fermentativo como pH, temperatura, aeração e agitação.

Uma vez que não existe um meio predefinido otimizado para a produção de proteases, devido às características diferenciadas entre os organismos produtores e os vários tipos de enzimas é necessária uma otimização para cada enzima e organismo.

#### 3.7.1.1 Efeitos das fontes de carbono

Os açúcares simples como a glicose são extensivamente utilizados nos bioprocessos para a produção de proteases, mas a sua concentração deverá ser ponderada ou pode ocorrer uma redução na produção de protease devido à repressão catabólica (FRANKENA et al., 2006). Um aumento dos rendimentos de proteases

alcalinas também foi observado na presença de outros açúcares como a lactose (MALATHI et al., 2001), maltose (TSUCHIYA et al., 2002), sacarose e frutose (PHADATARE et al., 2003). Como mencionado anteriormente elevadas concentrações de hidratos de carbono reprimem a produção de enzimas, por essa razão é preferível no processo industrial uma adição contínua ou em alíquotas ao longo da fermentação para suplementar o crescimento e manutenção das células e manter um volume mínimo de açúcares.

A obtenção de açúcares purificados embora seja um método bem estabelecido na indústria incorpora técnicas separativas e processos purificativos que aumentam os custos na produção das biomoléculas. Por esse motivo o uso de subprodutos tem sido largamente investigado. O soro de leite, um subproduto residual da indústria de laticínios contendo principalmente lactose e sais, foi demonstrado como um substrato potencial para a produção de protease alcalina (MC KAY et al., 2003). De forma semelhante, melão e celulose têm sido usados como fontes de carbono a secreção de protease alcalina máxima foi observada na presença de celulose pura (Solka-floc®) como principal fonte de carbono (GUSEK et al., 2004)

#### 3.7.1.2 Efeito das fontes de nitrogênio

Os microrganismos até agora conhecidos podem utilizar tanto formas inorgânicas como orgânicas de nitrogênio, requeridas para produzir aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, componentes da parede celular entre outras biomoléculas (BHUNIA et al., 2012). Relativamente à importância das fontes de nitrogênio estas são indispensáveis para os microrganismos por cada grama de bactéria cerca de 55 % são proteínas (SHULER e KARGI, 2008) já as proteases bacterianas são compostas por cerca de 15,6% de nitrogênio (KOLE et al., 1988). As fontes complexas de azoto são preferenciais para a produção de proteases bacterianas, já que a síntese enzimática é reprimida por fontes de azoto facilmente metabolizáveis, como os aminoácidos ou mesmo pela concentração de íon amônio no meio (CRUEGAR e CRUEGAR 1984, FRANKENA et al., 1986). O farelo de soja vêm sendo há bastante tempo referido como uma fonte de nitrogênio adequada para a produção de proteases (CHANDRASEKARAN e DHAR 1983, CHENG et al., 1995).

#### 3.7.1.3 Efeito de íons metálicos e sais

As proteases alcalinas requerem um cátion bivalente como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  ou uma combinação destes cátions, para atividade máxima. Estes cátions aumentam

também a estabilidade térmica de uma protease alcalina de *Bacillus*. Acredita-se que estes cátions protejam a enzima contra a desnaturação térmica e desempenhem um papel vital na manutenção da conformação ativa da enzima a altas temperaturas (KUMAR e TAKAGI, 1999). Em particular, verificou-se que os íons metálicos, tais como os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  individualmente ou em combinação, usualmente dão atividade máxima à enzima. Especialmente o íon metálico  $\text{Ca}^{2+}$  é relatado para aumentar a atividade e a estabilidade térmica da protease alcalina a temperaturas elevadas (KUMAR, 2002). Outros íons metálicos que são utilizados para estabilizar proteases incluem  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (JOHNVESLY e NAIK, 2001).

### 3.8 APLICAÇÕES DAS PROTEASES BACTERIANAS.

#### 3.8.1 Indústria de Detergentes

A indústria de detergentes é uma área no qual algumas enzimas, tais como proteases, lipases e amilases, são aplicadas para remover manchas de tecidos que são difíceis de remover com detergentes comuns. Estas manchas incluem proteínas, pigmentos e lipídeos. É possível remover a maioria dos tipos de manchas usando detergentes em altas temperaturas e agitação vigorosa, no entanto o custo de aquecimento da água é alto e a longa agitação ou danificar os tecidos. Neste contexto, a utilização de proteases para remoção de manchas de proteínas, permite utilizar temperaturas mais baixas e são necessários períodos mais curtos de agitação, muitas vezes após um período preliminar de imersão. As proteases de *Bacillus sp.* encontram na indústria dos detergentes um campo de aplicação muito importante. Isto é devido à natureza alcalófila destas enzimas e à notável estabilidade que elas apresentam em contato com tensoativos, detergentes e compostos oxidantes (LAGZIAN e ASOODEH, 2012; HMIDET et al., 2009)

Joshi e Satyanarayana (2013) clonaram e expressaram a protease do *Bacillus lehensis* em *Escherichia coli*. A enzima é uma proteína monomérica de 39 KDa com atividade ótima a pH 12,8 e 50 ° C. A atividade de protease teve um aumento na atividade com SDS,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , b-mercaptoetanol e inibida por Hg e fluoreto de fenilmetilsulfonilo. Além disso a enzima era compatível com detergentes comerciais tais como Surf, Excel, Safe, Wash, Rin, Tide, Ariel, Ezee e Condite.

Uma protease produzida por uma estirpe de *Bacillus sp.* isolada da água do mar foi descrita por Sinha e Khare (2012). A protease foi purificada e apresentou atividade ótima a pH 9,0 e 60 ° C. A protease foi completamente estável em Tween 80, Triton-X

100 e é compatível com detergentes comerciais tais como Wheel, Henko, Rin, Vim e Pril. A enzima foi aplicada na remoção da mancha de sangue e o tratamento das peças de tecido causando um aumento máximo no índice de reflectância e brancura em comparação com o controle.

### 3.8.2 Indústria Alimentar

As proteases de *Bacillus sp.*, que podem ser originárias de preparações comerciais ou obtidas a partir de estirpes nativas, encontram uma vasta gama de aplicações na indústria alimentar. Algumas destas aplicações podem ser consideradas em mais do que um campo industrial específico, por exemplo, os peptídeos bioativos podem ser aplicados na indústria alimentar e farmacêutica. Aqui estão descritos alguns trabalhos e aplicações relevantes de proteases de *Bacillus sp.* na indústria de alimentos.

#### 3.8.2.1 Peptídeos bioativos

Diversos tipos de proteínas podem ser hidrolisadas, resultando em peptídeos, também chamados hidrolisados de proteínas com notáveis atividades biológicas, tais como atividades anti-hipertensivas, imune estimulantes, antimicrobianas e antioxidantes (DANQUAH e AGYEI, 2012). Estes peptídeos podem por exemplo, ser obtidos a partir da aplicação de proteases em proteínas do leite (caseína e soro de leite), ovo (albumina), soja, entre outros. Podem ser produzidos a partir de proteínas precursoras utilizando hidrólise enzimática por enzimas digestivas, fermentação de alimentos como leite com culturas iniciadoras proteolíticas, proteólise por enzimas derivadas de microrganismos ou plantas (KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

Existem vários relatos na literatura sobre a obtenção de peptídeos bioativos usando proteases de *Bacillus sp.* com resultados interessantes.

DAROIT et al., (2012), mostraram que ocorriam diferenças nas atividades antioxidantes e antimicrobianas do caseinato de sódio, após a utilização da protease de *Bacillus sp. P45* em leite de ovinos. Após a hidrólise observou-se a exposição de aminoácidos aromáticos para o meio aquoso, ocorrendo uma ligeira diminuição na hidrofobicidade superficial, indicando a exposição de grupos hidrofóbicos na superfície dos peptídeos gerados. O tempo da hidrólise criou diferentes propriedades funcionais dos peptídeos. Os peptídeos apresentaram um aumento nas propriedades antioxidantes, após três a sete horas de hidrólise. A inibição do crescimento de diferentes microrganismos, como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium fimi*,

*Listeria monocytogenes* ocorrem com hidrolisados de uma hora que também mostraram também atividade antifúngica.

Os bio-peptídeos de ostra produzidos por hidrólise proteolítica da protease de *Bacillus sp.* CM98011 foram estudados em diferentes concentrações por WANG et al., (2010). Os autores relataram atividade antitumoral e efeitos imune estimuladores dos hidrolisados de ostras em ratos e observaram que o crescimento do sarcoma-S180 transplantável foi plenamente inibido, o efeito ocorre em relação da dose suplementada do hidrolisado de ostra aos ratos. Neste caso, os roedores que receberam 0,25, 0,5 e 1 mg / g de hidrolisado por peso corporal, via oral tinham 6,8%, 30,6% e 48% menos de crescimento tumoral, respectivamente. Os coeficientes de peso do timo e do baço, a proliferação dos linfócitos no baço e a taxa fagocitária dos macrófagos em ratos com o sarcoma aumentaram significativamente após a administração dos peptídeos. Concluiu-se no estudo que os hidrolisados de ostra produziram efeitos imune estimuladores fortes, o que pode resultar na sua atividade antitumoral.

#### 3.8.2.2 Processamento de alimentos

As proteases vêm sendo progressivamente utilizadas no processamento de vários alimentos, tais como queijos, preparação de hidrolisado de soja, amaciamento de carnes entre muitos outros. As proteases utilizadas nas indústrias transformadoras de queijo proveem de três fontes que são: retalhos animais, coagulantes microbianos e quimosina geneticamente modificada. Na fabricação de queijo, a função primária das proteases é hidrolisar a ligação peptídica específica (a ligação phe 105-Met 106) para gerar p-k Caseína e macro peptídeos. A quimosina é preferível porque têm uma alta especificidade para a caseína, é nesta proteína que é necessária uma ação hidrolítica para obter um ótimo desempenho na produção de queijo. (ZHENG-YI et al., 2016). Há um foco principal na utilização de proteinases e peptidases no processo de maturação de produtos lácticos. As proteínas são parcialmente hidrolisadas por proteases microbianas originando compostos de baixo peso molecular. Estes são ainda decompostos por peptidases em diversas substâncias nitrogenadas, tais como proteases, peptonas, aminoácidos e aminas que contribuem para o sabor do queijo (FOX et al., 1996).

Em 2012, OZCAN e KURDAL avaliaram os efeitos de uma protease *B. subtilis* e lipase de *Mucor miehei* sozinhos e combinados com a cultura inicial para o “amadurecimento” do queijo Mihalic tradicional turco. Eles relataram que quando a protease foi aplicada em sinergia com a lipase um sabor e textura mais apelativos foram

obtidos, com uma maturação acelerada face ao processo normal. As composições dos queijos foram alteradas pelo tipo de enzimas e tempo de amadurecimento. Quando a protease foi adicionada aos queijos, originou um sabor ligeiramente amargo e numa textura mais quebradiça; devido à intensa degradação da  $\beta$ -caseína, o mesmo efeito não foi tão intensamente visualizado em queijos onde ao cultivo inicial se adicionou lipase.

Uma protease comercial de *B. subtilis*, foi aplicada durante o amadurecimento de uma linguiça seca tradicional. Observou-se que quando a enzima foi aplicada, as proteínas mio fibrilares foram afetadas, resultando em maior perda de solubilidade do que a produzida nas proteínas sarcoplasmáticas. As linguiças tratadas apresentaram um aumento na fração de nitrogênio não proteico, comparativamente as linguiças sem tratamento enzimático. A fração de aumento de nitrogênio  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> nos peptídeos foi maior no produto com a enzima Neutrase (78,29%) já no produto sem enzima o nível permaneceu nos níveis normais (20,93%). Foram ressaltadas alterações nos parâmetros de textura foram após uma criteriosa análise sensorial e algumas delas impediram a aceitação do produto (ZAPELENA et al., 2007).

### 3.8.3. Industria Farmacêutica

A utilização de catalisadores sintéticos orgânicos, na síntese de peptídeos, possui vantagens na produção em larga escala e rendimentos elevados. No entanto, estes métodos químicos trazem alguns problemas pertinentes, como: quantidades excessivas de agentes de acoplamento, solventes, a necessidade de proteção de cadeias laterais de aminoácidos e o mais importante a necessidade de processos de purificação devido à formação de misturas racémicas. A utilização de enzimas entre as quais, as proteases e lipases microbianas têm múltiplas vantagens, como condições de reações suaves, um número diminuto de passos de reacionais são bastante atrativas a nível industrial. Reações que envolvem o uso de proteases são frequentemente realizadas em sistemas orgânicos, onde o equilíbrio da reação é favorável à síntese em vez de hidrólise (POPPE e NOVAK, 1992). Para além disso, as proteases têm uma elevada solubilidade, procedimentos simples da purificação e uma reduzida contaminação de solventes orgânicos.

A aplicação de uma protease alcalina imobilizada de *Bacillus subtilis* com propriedades terapêuticas foi já estudada para o desenvolvimento de fórmulas medicinais na base de um gel macio, composições de pomada, gaze, películas e novos materiais de sutura (DAVIDENKO, 1999). Está também relatada a degradação

fibrinolítica, onde a protease preferencialmente degrada a fibrina, o que sugere uma futura aplicação na terapia trombolítica e fármacos anticancerígenos (MUKHERJEE et al., 2011).

Uma protease estereosseletiva de *Bacillus amyloliquefaciens* KCCM 12091 foi já usada na a síntese enzimática estereosseletiva de um precursor do aspartame (SHIN et al., 2003)

A hidrólise seletiva do enantiómero R de 2-etoxi-carbonil-3,6-dihidro-2H-pirano produzindo S-2-etoxicarbonil-3,6-di-hidro-2H-pirano numa alta taxa reacional obtendo uma grande pureza óptica foi possível com o uso de uma protease de *Bacillus lentus*. Estes compostos são intermediários para a síntese da proteína a quinase C, que é um inibidor no tratamento de retinopatia e nefropatia em pacientes com diabetes mellitus (CAILLE et al., 2002). Da mesma forma a produção de vários intermediários quirais chave na síntese de agentes anti-inflamatórios, antivirais e anti-leucêmicos, utilizando enzimas tais como, uma protease serínica de uma estirpe de *Bacillus sp.* foi já realizado por Mahmoudian (2000).

Diversas biotransformações não convencionais, tais como processos de formação de ligações C-C, reações aldol, Henry e Mannich, foram possíveis usando uma protease comercial de *B. licheniformis* imobilizada de agregados enzimáticos reticulados (Alcalase-CLEA®) (LÓPEZ-IGLESIAS, 2011).

#### 3.8.4 Indústria Têxtil

As proteases com capacidade de hidrolisar a queratina, que é uma proteína fibrosa insolúvel, recebem uma atenção especial devido a ser um importante componente do cabelo, penas, lãs e unhas. A queratina tem uma estrutura muito estável maioritariamente com cadeias em  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -folha reticulada com pontes de cisteína, adquirindo assim uma grande estabilidade mecânica, dificilmente degradável por subtilisina, papaína e pepsina (BACH et al, 2012). A lã é uma fibra animal natural comumente usada em tecidos, mas requer tratamento de processamento físico e químico para tais aplicações. Por esse motivo, as queratinases são aplicadas na indústria têxtil, em diferentes etapas, a mais notável é a substituição dos métodos físico-químicos convencionais no processamento de têxteis criando desta forma um processo ambientalmente correto e sem poluição, atribuem também uma maior resistência ao encolhimento e melhoram as propriedades do manuseio (LV et al., 2010). A protease que atua sobre a fibra de lã pode ser um método alternativo para o processo tradicional de cloro-resina anti-encolhimento, o que resulta em poluição ambiental.

Uma protease de *Bacillus sp. O SJ-12* foi aplicada para tratar lã e seda. Observou-se que aumentando o tempo de tratamento da protease até 48 h, ocorreu uma melhoria no tingimento dos tecidos, as superfícies dos fios individuais dos tecidos tornaram-se mais suaves. No entanto, não foram detectadas alterações mecânicas nos tecidos (KIM et al., 2005). Cultivos de bactérias isoladas proteolíticas identificadas como *Bacillus thuringiensis* foram aplicados sobre fibras de lã e também tecidos. Durante o crescimento bacteriano, a fibra de lã perdeu peso, mas o diâmetro da fibra não mudou. Quando se utilizou tecido de lã em vez de perda de peso de tecido de fibra de lã, não foram encontradas diferenças significativas no encolhimento (INFANTE et al., 2010).

A confecção de peles é uma das atividades industriais mais impactantes no ambiente. Uma vez que a matéria-prima são os couros dos animais, são produzidos grandes quantidades de resíduos devido a necessidade de cortes específicos ou imperfeições no processo. Relativamente aos bovinos a pele representa 7% do seu peso e apenas 25% é efetivamente transformado em couro, os demais intermediários ou subprodutos do processo são resíduos de alto impacto ambiental (COOPER et al., 2011). O uso de cal, sulfureto e crômio são também poluentes em grande escala neste sector industrial. A remoção dos pelos do couro usando proteases vem sendo progressivamente mais utilizada, considera-se que esta é uma opção confiável ao processo convencional, evitando os problemas criados pela poluição por sulfetos. As principais vantagens do uso de um processo enzimático são a reutilização do pelo como um subproduto para a produção de: fibras sintéticas, biogás, agente espumante para extintores de incêndio e remoção total de cal e sulfureto do efluente, fertilizantes agrícolas, condicionadores de solo, compostagem, alimentos para animais / aves e também para a produção de cosméticos, produtos farmacêuticos e aminoácidos, como a cisteína (PALIWAL et al., 1994).

A aplicação de uma protease da estirpe de *B. subtilis* na produção de couro, nomeadamente na remoção dos pelos e raiz dos mesmo na derme foi aumentada até 6 vezes face ao processo convencional. As condições de reações ótimas foram com um pH entre 9 e 10 e uma temperatura de 37 – 55 ° C (DETTMER et al., 2012).

### 3.8.5 Outras Aplicações

O *Xanthomonas campestris* produz um polissacarídeo, que apresenta uma estrutura bastante singular e propriedades visco-elásticas e emulsificantes muito uteis, por essa razão a goma *Xantana* é comercializada com tanto sucesso. Este biopolímero é

utilizado como emulsificante ou agente de controlo da viscosidade em aplicações alimentares, farmacêuticas, agrícolas e entre outras. No entanto existe um grande problema relacionado ao uso desta goma, uma vez que as células bacterianas usadas para a produção da goma ficam envolvidas na malha do polissacarídeo e contaminam o produto final com uma turbidez. A separação das células bacterianas da goma não é sempre requerida, mas a sua remoção é essencial quando a transparência do produto é um requisito.

Entre os possíveis processos para retirar as células de *X. campestris* estão: a centrifugação, tratamento térmico e tratamento alcalino. Relativamente á centrifugação este processo é bastante simples, contudo devido à sua alta viscosidade, têm de ser diluído diversas vezes para poder-se sedimentar a biomassa, naturalmente ter-se-á posteriormente processos adjacentes para a remoção da água. A remoção de células por tratamento térmico ocorre a altas temperaturas, frequentemente a goma é degradada termicamente. O uso de um pH altamente alcalino como tratamento pode também resultar na degradação da goma. Em contraste, verificou-se que o tratamento enzimático é eficiente para obter polissacárido clarificado (SURESH e PRASAD, 2005). Os compostos das paredes celulares bacterianas, nomeadamente as peptido-glicanas, podem ser lisados por algumas enzimas tem-se utilizado proteases de diversas fontes para a deterioração de células *X. campestris*, para se obter um produto bastante incolor, incluindo *Trichoderma koningii* (TRIVENI e SHAMALA, 1999) *Pseudomonas sp.* (SHASTRY e PRASAD, 2002), *Lysobacter* (POLLOCK e YAMAZAKI, 1993), *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilis* (KOHLENER et al., 1984)

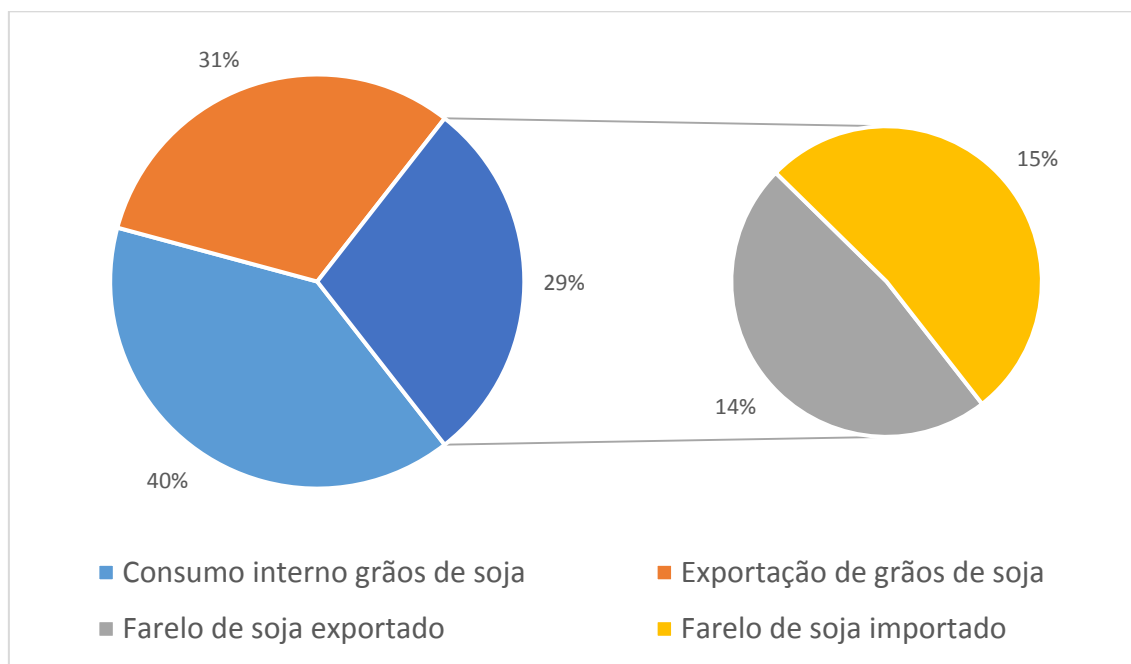
As proteases têm sido usadas para a obtenção de quitina mais pura, tradicionalmente este processo envolvia o uso de ácidos e/ou bases fortes, que podem causar uma hidrólise parcial do polímero (GAGNE e SIMPSON, 2003). Alguns artigos da literatura relatam resultados interessantes desta aplicação usando proteases de *Bacillus sp.* YANG et al. (2000) realizaram a desproteínização fermentando, casca de camarão, carapaça de caranguejo e resíduos de casca de lagosta com estirpes de *B. subtilis*. A remoção de proteína de 88%, 67% e 83%, respectivamente estes resultados são melhores do que os obtidos com os resíduos tratados com ácido que resultaram em 76%, 62% e 56%, respectivamente.

A prata é um dos metais mais preciosos e nobres usados em larga escala na indústria fotográfica. Cerca de 25% da necessidade mundial de prata é obtida através de prata reciclada, dos quais 75% são obtidos a partir de resíduos fotográficos (NAKIBOGLU et al., 2003). As proteases alcalinas de *Bacillus spp.* (FUJIWARA e YAMAMOTO, 1987) e fungos (INGALE et al., 2002, SHANKAR et al., 2010) têm sido utilizadas com sucesso para recuperar prata a partir de filmes fotográficos usados.

### 3.9 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE PROTEASES

De acordo com os dados da safra de grãos de soja de 2016, a Produção brasileira de soja 2015/2016 e os dados econômicos da Embrapa Soja, o Brasil continua a ser o segundo maior produtor desta espécie oleaginosa no mundo. Com um total de 33,109 milhões de hectares de área plantada, e 106,934 milhões de toneladas de grãos de soja, dos quais são produzidos 30,9 milhões de toneladas de farelo de soja, cerca de 29 % da produção. Segundo os dados do Agrosat (2017) o volume de negócios para a exportação do farelo de soja é de cerca de 5,8 bilhões de dólares americanos, para 14,8 milhões de toneladas de farelo de soja, cerca de 50 % da produção como se pode ver na figura 3.

**Figura 3-** Resumo econômico dos grãos de soja e farelo de soja para 2016



**Fonte:** Adaptado de CONAB e EMBRAPA 2017

O preço por tonelada do farelo de soja é de cerca de 391 dólares americanos, o que representa em reais cerca de 1,20 reais por kg de farelo. Obviamente este produto pelo seu custo torna-se já vantajoso, mas além disso o farelo de soja tem ainda uma composição muito interessante como se pode ver na tabela 4, compilada por PETERSSON D. e PONTOPPIDAN K. (2013).

**Tabela 4-** Composição do farelo de soja

Intervalo de valores		
(g / Kg em base seca)		
COMPONENTE	MENOR	MAIOR
Proteína bruta	490	540
Amido	0	27
Lipídeos	17	21
Açúcares de baixo peso molecular		
Monossacarídeos	5	8
Sacarose	55	81
Rafinose	53	67
Polissacarídeos de amido neutros		
Ramnose	3,7	5
Fucose	2,9	3,1
Arabinose	22	25
Xilose	15	18
Manose	9	13
Galactose	37	40
Glucose	50	59
Polissacarídeos de amido ácidos		
Ácido urónico	39	41

**Fonte:** Adaptado de PETERSSON D. e PONTOPPIDAN K. (2013).

Segundo os autores, de acordo com o local de origem e as condições de processamento os valores dos componentes podem divergir, por esse motivo na Tabela 4 se encontram os intervalos superiores e inferiores para esses componentes. A aplicabilidade do farelo de soja destina-se quase inteiramente à alimentação animal, principalmente bovinos, aves e suínos (ABDALLA et al., 2013).

Existe então uma oportunidade para aplicar este agro resíduo na indústria, Witek-Krowiak A. et al., (2013) modelaram e otimizaram o uso do farelo de soja para a absorção de  $Cr^{3+}$ , Hojilla-Evangelista. (2010) formulou uma cola para prensados de madeira com a incorporação de farelo de soja até 52 % da mistura mantendo propriedades semelhantes à formulação tradicional.

Porém o uso do farelo de soja como substrato à produção de biomoléculas tem tido uma aderência crescente devido ao seu preço e constituição. Gupta R. et al., (2003) otimizaram a produção de uma protease utilizando farelo de soja no meio até atingirem 3914 U/ mL.

Xiao Z. J. et al., (2006) através de otimização estatística usando como principais componentes do meio melaço e farelo de soja, conseguiram produzir 35,4 g/ L de acetoína por *B. subtilis* CICC 10025. A acetoína é um valioso aroma presente no vinho, mel, coco, manteiga, café, morango entre outros produtos, existem algumas vias químicas de síntese, mas todas com baixos rendimentos e processos dispendiosos (Xiao Z. J. et al., 2006). Andrade M. et al., (2013) utilizando o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa com farelo de soja e farelo de mamona destoxificado produziram 4820 U /g de lípases, demonstrando um novo método de produção com preços competitivos aos do mercado atual. Satbir S. e Bijender B. (2015) produziram do *B. subtilis* K-1 através de múltiplas otimizações com resíduos agroindustriais incluindo o farelo de soja, uma protease com temperatura de atividade ótima de 70 °C, e pH 9 com uma atividade de 712 U/ mL.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus amyloliquefacieans* M0.04b originalmente isolado do solo das imediações da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR) por Granzotto et al., (2012). A bactéria foi cedida pelo Prof. Dr. André Luís de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. Esta cepa foi mantida em tubos de ensaio contendo meio sólido de DYGS sob refrigeração a  $-4\pm 2^{\circ}\text{C}$  com repiques trimestrais.

### 4.2 MEIOS DE CULTIVO

#### 4.2.1 Meio de Manutenção (DYGS)

A tabela 5 descreve a composição do meio DYGS (“*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*”) (RODRIGUEZ NETO et al., 1986). Todos os reagentes foram adicionados ao balão volumétrico, o pH ajustado a 6.0 num volume total de 1L, para o meio sólido foi adicionado 15 gramas de Ágar-ágar

**Tabela 5-** Composição do meio DYGS

<b>Composição</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
<b>Extrato de Levedura</b>	2,0
<b>Fosfato monoácido de potássio</b>	0,5
<b>Glicose</b>	0,2
<b>Peptona</b>	1,5
<b>Sulfato de Magnésio</b>	0,5

**Fonte:** Rodriguez Neto, 1986

#### 4.2.2 Meio Mínimo de Sais Minerais

O Meio Mínimo de Sais Minerais foi preparado segundo Neto et al., (2008). (Tabela 6)

**Tabela 6-** Composição do meio mínimo de sais minerais

<b>Composição</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3,0
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	7,0
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,2
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,0

### 4.2.3 Resíduo Agroindustrial

O resíduo agroindustrial utilizado na fermentação foi o farelo de soja, cedido pela Granosul Agroindustrial-Cambé/PR. E cuja composição centesimal está na tabela 7.

**Tabela 7-** Composição centesimal dos resíduos agroindustriais

	<b>Umidade</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Farelo Soja</b>	24	4	5	47	14

Fonte: Adaptado de Massi, 2014

### 4.3 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 50 mL, que continham 9 mL da solução mínima de sais minerais e 1mL de glucose 2% previamente autoclavados a uma pressão 120 KPa ~121 °C, por 15 minutos. A bactéria foi transferida da cultura de estoque com o auxílio de uma alça em ambiente asséptico. Os Erlenmeyers foram então incubados por 24 horas a 37 °C com agitação de 180 rpm.

### 4.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

#### 4.4.1 Preparação dos Cultivos

A fermentação submersa ocorreu em Erlenmeyers de 50 mL contendo 9 mL do meio mínimo de sais, 1 mL de glicose a 2%, uma fonte de nitrogênio e 200 µL do inóculo (2% v/v). O tempo de fermentação foi de 24h, a 37 ° C e agitação de 180 rpm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas ou quadruplicatas para o caso da avaliação de enzimas no delineamento do composto central.

#### 4.4.2 Interrupção dos Cultivos

A fermentação foi interrompida por centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O extrato livre de células (ELC) obtido foi dialisado em água destilada por 36 h, com trocas de água a cada 12 h.

##### 4.4.2.1 Determinação do pH

Os ELC dos cultivos foram submetidos à determinação de pH através de um potenciômetro.

#### 4.4.3 Curva de Biomassa

Para a determinação da biomassa proveniente das fermentações foi necessário construir uma curva de calibração utilizando a seguinte metodologia: A partir da cultura estoque de *B. amyloliquefaciens* MO.04 com auxílio de uma alça em ambiente estéril foram retiradas pequenas amostras de material biológico; esse material foi transferido para 4 Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio DYGS cada. Os frascos foram incubados a  $37 \pm 2$  °C, 180 rpm e 24 horas. Após esse período, as células foram removidas por centrifugação a 6.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina 0,85 % (m/v) por três vezes para a remoção completa de resíduos do meio e foram ressuspensas em 5 mL de solução salina. A biomassa foi distribuída em triplicatas de 1,0 mL em cadinhos de alumínio, que foram deixados em estufa a 70 °C, durante 48 horas, ou até peso constante. Posteriormente, 1 mL da biomassa de células foi diluído várias vezes (1:50, 1:60, 1:79, 1:80, 1:90, 1:100) e a turbidez quantificada a 600 nm para a obtenção da curva de calibração da biomassa. A partir da curva, se obteve a equação da reta com a qual foi possível calcular da concentração celular em diferentes amostras.

#### 4.5 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04B

##### 4.5.1 Avaliação da Melhor Concentração de Farelo de Soja no Meio

Nesta etapa os cultivos foram realizados durante 24h a 37 °C e 180 rpm, onde foram adicionadas diferentes concentrações de farelo de soja, (0,2 %; 0,4 %; 0,8 %; 1,6 %; 2% e 4%, m/v) aos Erlenmeyers contendo o meio de sais mínimos, 0,2 % (m/v) glucose e 1 % (m/v) de Extrato de Levedura e o inóculo.

##### 4.5.2 Avaliação da Fonte de Nitrogênio

A produção de proteases com farelo de soja foi avaliada na presença de extrato de levedura ou peptona na concentração de 1 % (m/v), para diferentes concentrações de Farelo de Soja, em meio de sais mínimos com glucose a 0,2 % (m/v).

##### 4.5.3 Avaliação da Cinética de Produção

Após a seleção da fonte de nitrogênio e a melhor concentração de farelo de soja, foi avaliada a atividade da enzima em função do tempo de cultivo. O cultivo foi interrompido nos tempos de 4, 8, 12, 16, 24 e 36 horas.

#### 4.5.4 Planejamento fatorial e Análise por Metodologia de Resposta

Após selecionar as variáveis que influenciam na produção de proteases por *B. amyloliquefaciens* MO-04b, foi realizado um delineamento composto central  $2^3$  com três pontos axiais totalizando 19 experimentos. 5 níveis, de forma a obter a formulação para os melhores rendimentos. O delineamento foi realizado usando 2% de farelo de soja (m/v).

##### 4.5.4.1 Delineamento do composto central para a produção de proteases

Na otimização pretendeu-se usar a concentração de 2% (m/v) farelo de soja as variáveis usadas e os níveis são apresentados nas tabelas 8 e 9.

**Tabela 8-** Valores Codificados otimização

Ensaio	X1	X2	X3	X1 (g %)	X2 (g %)	X3 (g %)
1	-1	-1	-1	0,7	0,3	1,4
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>1,3</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>
3	-1	1	-1	0,7	1,1	1,4
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>
5	-1	-1	1	0,7	0,3	2,6
<b>6</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>1,3</b>	<b>0,3</b>	<b>2,6</b>
7	-1	1	1	0,7	1,1	2,6
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>2,6</b>
9	-1,68	0	0	0,5	0,7	2,0
<b>10</b>	<b>1,68</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,5</b>	<b>0,7</b>	<b>2,0</b>
11	0	-1,68	0	1	0	2,0
<b>12</b>	<b>0</b>	<b>1,68</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>	<b>2,0</b>
13	0	0	-1,68	1	0,7	1,0
<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,68</b>	<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>3,0</b>
15	0	0	0	1	<b>0,7</b>	2,0
<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>2,0</b>
17	0	0	0	1	<b>0,7</b>	2,0
<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>2,0</b>
19	0	0	0	1	0,7	2,0

**Tabela 9-** Codificação dos valores para a otimização

Variável	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Glucose	X1	0,5	0,7	1	1,3	1,5
Ex. Levedura	X2	0	0,3	0,7	1,1	1,4
Farelo Soja	X3	1	1,4	2,0	2,6	3,0

Fonte: O autor

#### 4.4.5 Determinação da Atividade Proteolítica

Alíquotas de 250 µL de ELC dialisado foram incubadas a  $37 \pm 2$  ° C por 1 hora com 250 µL do tampão glicina-NaOH 5 mM, (pH 9.5), 250 µL de soroalbumina bovina 5 mg/mL e 250 µL de água destilada. A reação foi interrompida com a adição de 250 µL de ácido tricloroacético 10 % (m/v) seguida de centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. A concentração de tirosina solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree (1970). 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. A equação utilizada para cálculo da atividade é descrita na equação 1.

$$U \cdot mL = [T] \times \frac{1}{\text{volume}} \times \frac{1}{t} \times Df \quad \text{Equação 1}$$

Onde [ T ] é igual à concentração de peptídeos na reta da equação da curva analítica, *t* indica o tempo de incubação (60 minutos) e *Df* é referente ao fator de diluição.

#### 4.4.6 Determinação das Proteínas Totais

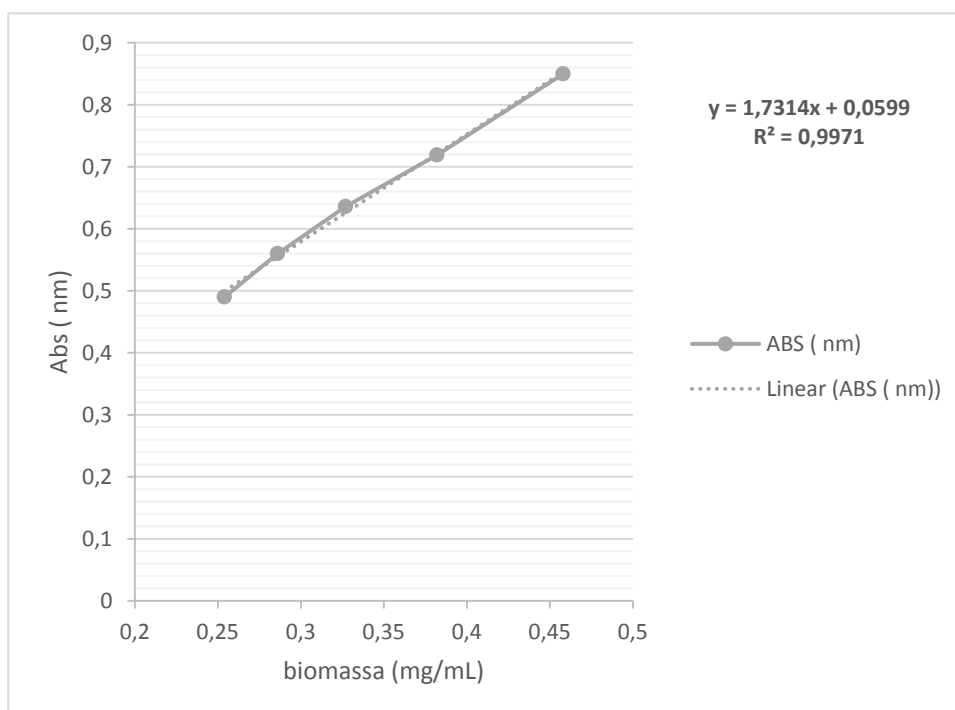
Para a determinação quantitativa das proteínas totais foi utilizado o método descrito por Hartree (1972), utilizando o padrão de soroalbumina bovina (200 µg/mL). A curva de calibração foi construída com base nas leituras espectrofotométricas a 595 nm, na faixa de sensibilidade de 20 a 250 µg/mL.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE BIOMASSA

A curva de calibração da biomassa foi obtida através da relação entre a absorbância e diferentes concentrações de biomassa. Por ser uma metodologia menos trabalhosa do que a determinação por plaqueamento e determinação das unidades formadoras de colônias por mL foi escolhida esta metodologia para determinar o crescimento bacteriano nos cultivos (Figura 4).

**Figura 4-** Curva da biomassa de *Bacillus amyloliquefaciens* M0-04b



**Fonte:** O autor

### 5.2 AVALIAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE SOJA NO MEIO

Averiguou-se qual o impacto do resíduo agroindustrial no cultivo bacteriano para a produção de proteases. Dessa forma utilizou-se um volume total de meio de 10 mL sais mínimos, com glucose a 0,2% (m/v) e extrato de levedura 1% (m/v) com diferentes concentrações de farelo de soja (0,2 %, 0,4%, 0,8%, 1,6 %, 2% e 4% m/v). Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 10.

**Tabela 10-** Atividade enzimática por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em diferentes concentrações de Farelo de soja

Farelo de soja (%)	Atividade enzimática (U / ml)
0,2	2,35 ± 0,530
0,4	3,62 ± 0,675
0,8	6,26 ± 0,804
1,6	16,13 ± 4,153
2,0	26,53 ± 4,452
4,0	18,23 ± 0,409

Fonte: O autor

Relativamente aos dados obtidos, obtêm-se a melhor atividade, 26,53 U/mL, com a adição de 2 % (m/v) de farelo de soja ao meio, os resultados obtidos são semelhantes para a literatura reportada onde se utilizam valores na faixa de 1 a 2% para a concentração de farelo de soja.

Han-Seung J. e Chung-Soon Chang (2005) utilizaram uma estirpe de *Bacillus* sp. I-312, para produção de proteases e a melhor atividade proteolítica, 10,5 U/ mL, foi obtida com a concentração de 1,6 % (m/v) de farelo de soja. No entanto a protease tinha uma atividade mais alcalina a pH=11 e uma temperatura de atividade ótima substancialmente maior, de 60 °C. Todas as condições de cultivo foram semelhantes as utilizadas, T = 37 °C, agitação de 200 r.p.m., apenas o meio tinha a adição de carbonato de cálcio o que presumivelmente indica um pH inicial mais elevado que o usado.

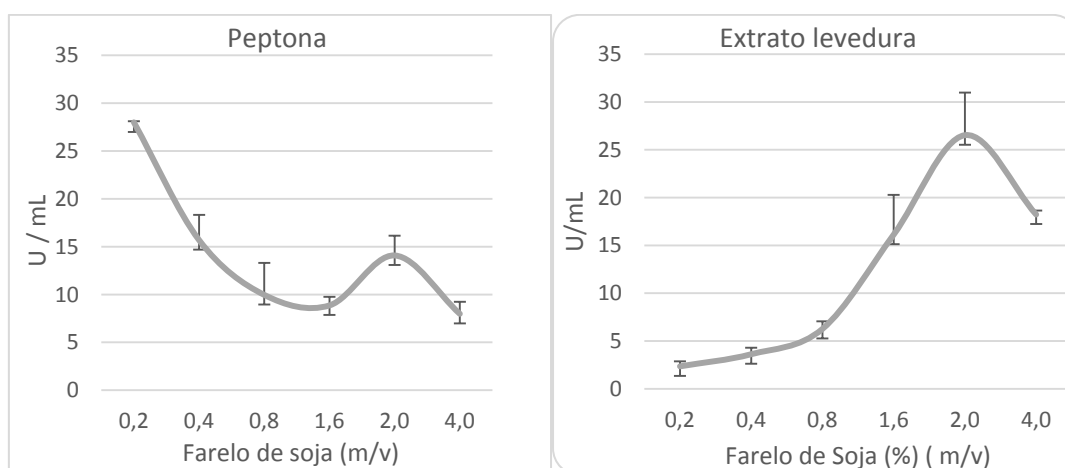
Já Seong-Jun Cho et al., (2004) purificaram duas proteases utilizando um meio bastante semelhante que se diferencia apenas pelo uso de lactose (1 %) e com cloreto de cálcio (0,03%), obtendo uma atividade máxima para a protease serínica de 17 U/mL com farelo de soja a 1% (m/v). Song Bo et al., (2013) isolaram uma estirpe de *B. amyloliquefaciens* de um mangue na China, deste microrganismo conseguiram um máximo de atividade de 10 U/mL, para um período de 36 h a 28 °C com o meio de *Luria-Bertani*.

Mukhtar H. e Haq I. (2013), avaliaram a atividade proteolítica de uma estirpe de *Bacillus subtilis* em presença de concentrações semelhantes as utilizadas e obtiveram um perfil muito semelhante ao apresentado com a maior atividade para a concentração de 2 % como valor máximo de 11 U/ mL.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE SOJA NA PRESENÇA DE PEPTONA E DE EXTRATO DE LEVEDURA

Foram avaliadas duas fontes de nitrogênios comumente usadas na literatura que são o extrato de levedura e a peptona ambas a 1 %, em diferentes percentagens de farelo de soja 0,2 %, 0,4 %, 0,8 %, 1,6 %, 2% e 4 % como se pode ser observado na figura 5.

**Figura 5-** Atividade da protease usando peptona (A), e extrato de levedura (B) em diferentes concentrações de farelo de soja no meio



**Fonte:** O autor

Relativamente aos valores obtidos observa uma inversão de valores em função da atividade para a concentração de farelo de soja. Para a concentração de 0,2 % de farelo de soja, obtém-se o maior valor de atividade usando 1% de peptona no meio. Contrariamente, ao suplementar com 1 % de extrato de levedura, obtém-se a maior atividade com 2% de farelo de soja. Existe uma diferença de 10% de massa de farelo de soja (m/v) entre os meios com extrato de levedura e peptona dessa forma poder-se-ia supor que seria mais vantajoso o uso da peptona. No entanto a peptona tem um valor comercial substancialmente maior que o extrato de levedura, o que aumentaria os custos da fermentação e inviabilizaria o processo de produção enzimática a partir dos resíduos agroindustriais. Portanto foram escolhidas para compor o meio de cultivo, extrato de levedura 1% e farelo de soja 2%.

Premkumar J. et al. (2014) relata sobre a produção e caracterização de uma protease alcalina de *B. amyloliquefaciens* do solo indicava que a peptona seria uma fonte mais estimuladora para a produção de proteases alcalinas. Os autores reportam uma diferença de atividade de cerca de 30 %, quando comparado o uso de peptona e

extrato de levedura. Como se pode ver na figura 5, ocorre um processo semelhante à literatura, no entanto no trabalho em questão apenas se variou a peptona e extrato de levedura. Dessa forma ao variar também o farelo de soja se obtém um espectro mais divergente de atividade enzimática. No entanto poder-se-á presumir que todas estas relações serão dependentes dos constituintes do meio.

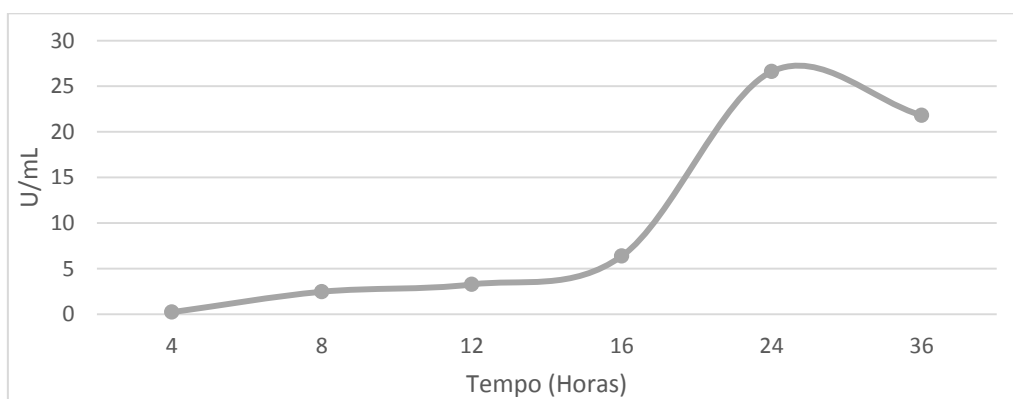
Agrebi R. et al., (2009) isolaram e purificaram uma serina protease fibrinolítica do *B. amyloliquefaciens* An6 usando como substrato a farinha do tubérculo de *Mirabilis jalapa*. Durante o estudo das fontes de carbono e nitrogênio, com a concentração de 0,4 % de peptona e extrato de levedura, obtiveram os valores de 140 e 448 U/ mL respectivamente.

Bijender B. e Satbir S. (2015) otimizaram a produção de uma protease com potencial aplicabilidade industrial. Com a otimização de substratos de carbono e nitrogênio de origem agrícola, concluíram também que a melhor concentração de farelo de soja é 2% e extrato de levedura 1% (m/v), com diversas otimizações de 25 substratos de resíduos agroindustriais conseguiram duplicar a atividade do meio de controle para cerca de 600 U/ mL.

#### 5.4 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b

Após se definir a composição do meio de cultivo para a produção da protease, foi realizado o estudo de cinética de produção de protease para averiguar qual o melhor tempo de fermentação.

**Figura 6-** Curva de tempo para a produção enzimática de proteases por *B. amyloliquefaciens* MO-04b cultivado em farelo de soja 2% (m/v) e extrato de levedura 1% (m/v)



**Fonte:** O autor

Como pode ser observado na Figura 6, a melhor produção enzimática foi no tempo de 24 horas. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, George S.

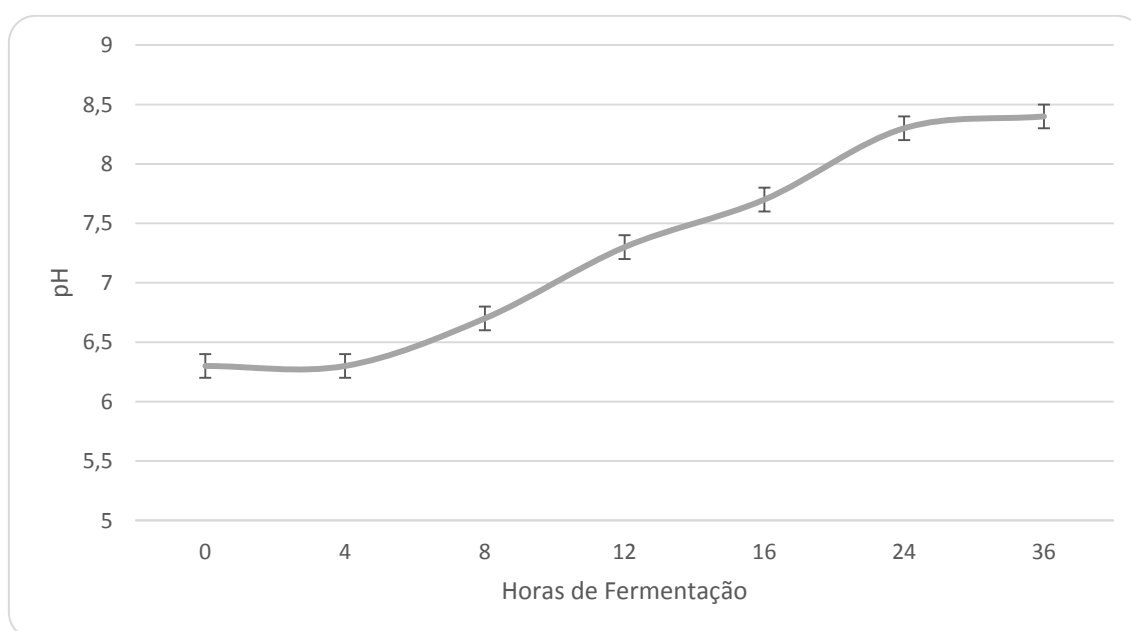
et al (1997) usando a estirpe de *B. amyloliquefaciens* ATCC 23844, onde na temperatura de 37 °C a curva de produção é exatamente igual ao trabalho apresentado atingindo o pico máximo de atividade nas 24h, após esse valor ocorre uma diminuição da atividade.

Resultados idênticos foram obtidos por Nassar et al., (2015) num estudo para a produção de proteases por *B. amyloliquefaciens* 35s onde para todos os 25 meios de resíduos agroindustriais se obtêm um perfil semelhante ao trabalho experimental realizado com o pico de atividade em 24 h e uma subsequente diminuição.

#### 5.5 AVALIAÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

As alterações nos valores de pH em função do tempo de cultivo são semelhantes à curva de produção da enzima (Figura 7), onde se atinge o pico máximo de produção nas 24 h a um valor próximo de 8,5. Segundo Santos (2015) esta cepa, tem a melhor atividade da protease em pH de 9,5. A alcalinização do meio pode ser uma forma de o microrganismo tornar as suas proteases mais reativas, e por essa forma o padrão do aumento de pH estar correlacionado com a produção de proteína. Perfis semelhantes de aumento de pH são encontrados em diversos trabalhos para *B. amyloliquefaciens* sp., (BIJENDER B e SATBIR S. 2015; GEORGE S. et al (1997); PREMKUMAR J. et al. 2014 e AGREBI R. et al., 2009).

**Figura 7-** Avaliação do pH em função das horas de fermentação



**Fonte:** O autor

## 5.6 DELINEAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA POR RESPOSTA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b

Na otimização optou-se por escolher a quantidade de farelo de soja proporcionou a maior produção de enzimas (2 % m/v). Desta forma é possível relacionar as fontes de carbono diretas como a glucose e de nitrogénio como o extrato de levedura, com o farelo de soja independentemente. O farelo, como mencionado anteriormente é um substrato bastante rico em proteínas, mas possui também outros microconstituintes como cálcio 0,003 %, fosforo 0,006 %, potássio 0,021 %, zinco 0,00005%, magnésio 0,003 %, e diversas vitaminas como Riboflavina, Tiamina, B6, B12 e A (USDA, 2016). A presença de íons de cálcio está diretamente correlacionada com a produção de proteases alcalinas (SUMANTHA A. et al., 2006; JISHA et al., 2013).

### 5.6.1 Delineamento Fatorial Para a Produção de Protease

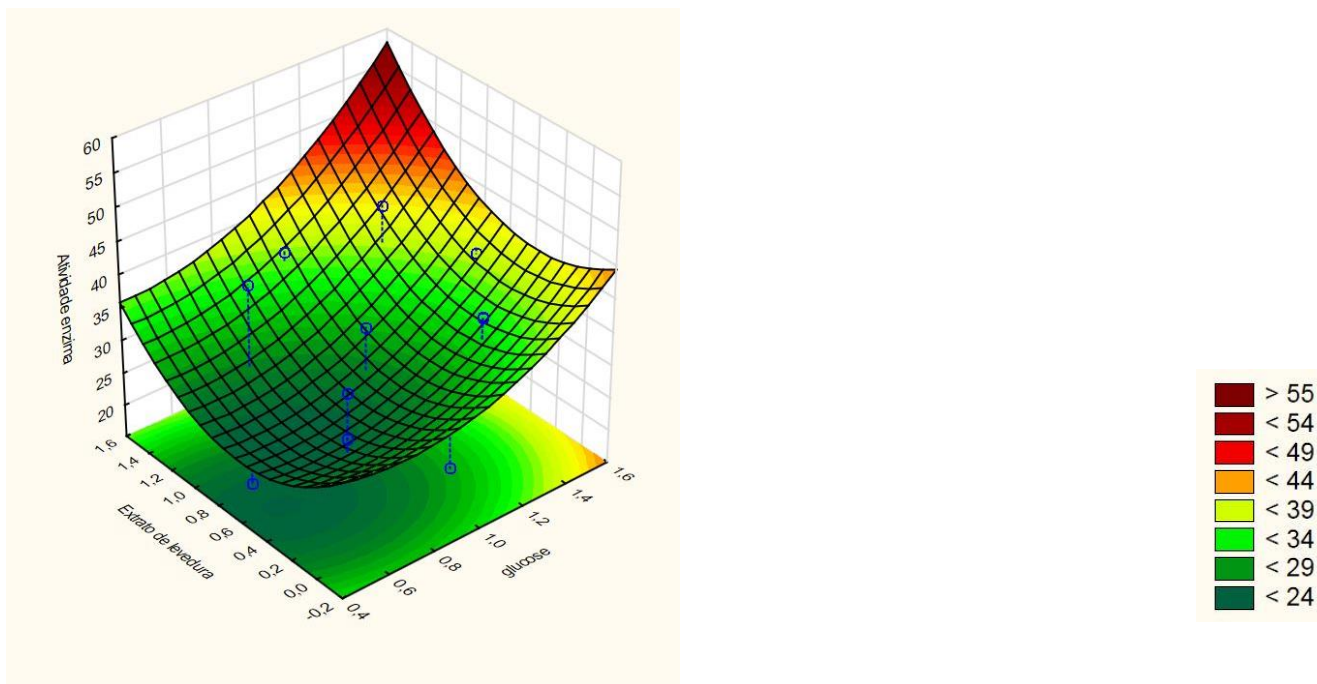
Na tabela 11 é possível observar a relação entre as variáveis e as respostas obtidas de atividade enzimática. Os valores foram quantificados após as 24 h do tempo de cultivo.

Tabela 11-- Delineamento do composto central para a produção de proteases

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis descodificadas			Resposta
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Glucose (g)	Extrato Levedura (g)	Farelo Soja (%)	Atividade (U/mL)
<b>1</b>	-1,00	-1,00	-1,00	0,7	0,3	1,4	27,03
<b>2</b>	-1,00	1,00	1,00	0,7	1,1	2,6	39,95
<b>3</b>	1,00	-1,00	1,00	1,3	0,3	2,6	35,69
<b>4</b>	1,00	1,00	-1,00	1,3	1,1	1,4	30,2
<b>5 (C)</b>	0,00	0,00	0,00	1,0	0,7	2,0	26,17
<b>6</b>	-1,00	-1,00	1,00	0,7	0,3	2,6	33,89
<b>7</b>	-1,00	1,00	-1,00	0,7	1,1	1,4	18,16
<b>8</b>	1,00	-1,00	-1,00	1,3	0,3	1,4	35,84
<b>9</b>	1,00	1,00	1,00	1,3	1,1	2,6	42,99
<b>10 (C)</b>	0,00	0,00	0,00	1,0	0,7	2,0	25,34
<b>11</b>	-1,67	0,00	0,00	0,5	0,7	2,0	18,13
<b>12</b>	1,67	0,00	0,00	1,5	0,7	2,0	37,54
<b>13</b>	0,00	-1,67	0,00	1,0	0,0	2,0	21,13
<b>14</b>	0,00	1,67	0,00	1,0	1,4	2,0	37,25
<b>15</b>	0,00	0,00	-1,67	1,0	0,7	1,0	19,65
<b>16</b>	0,00	0,00	1,67	1,0	0,7	3,0	33,84
<b>17 (C)</b>	0,00	0,00	0,00	1,0	0,7	2,0	25,78

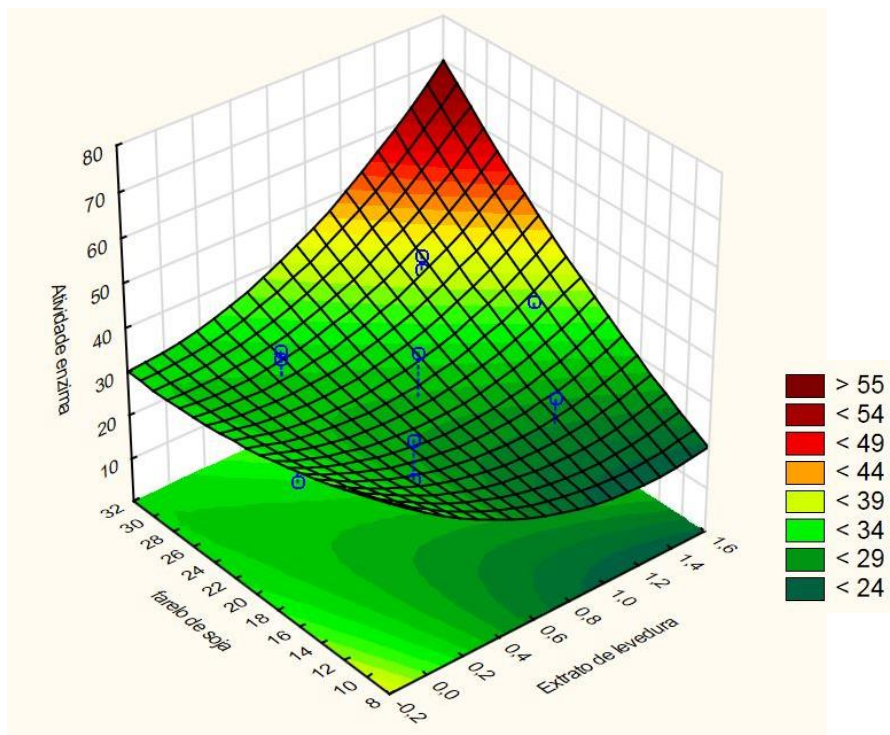
Fonte: O autor

**Figura 8** – Superfície de resposta para a produção de proteases utilizando extrato de levedura e glicose (U/ mL)



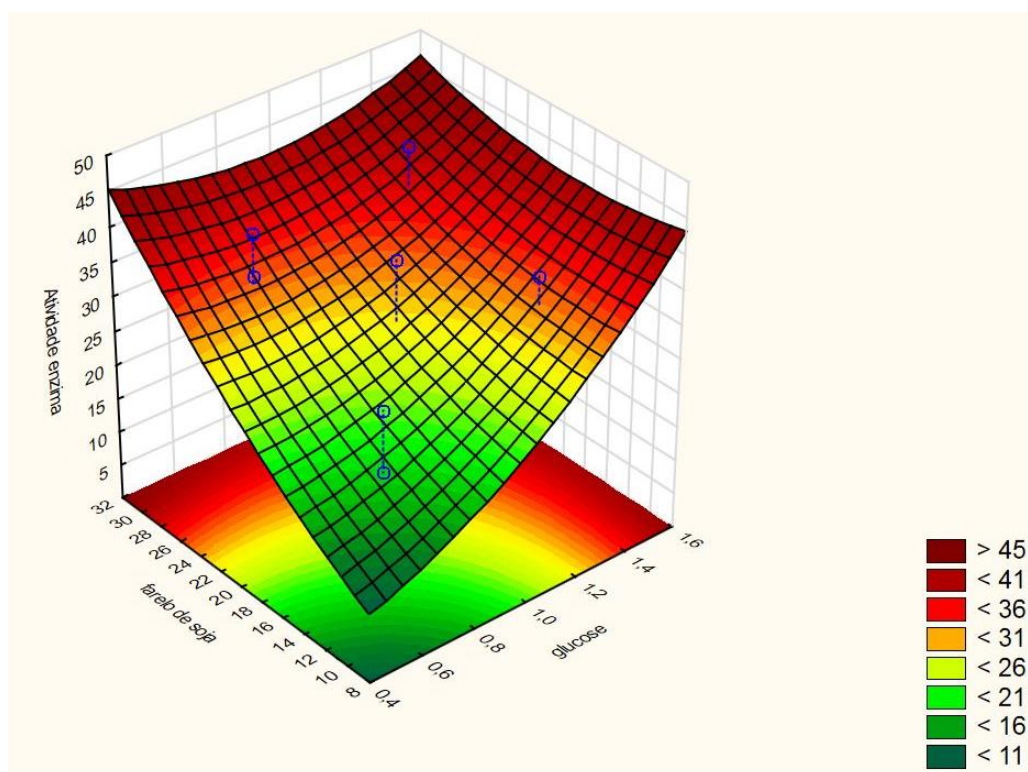
Fonte: O autor

**Figura 9** - Superfície de resposta para a produção de proteases utilizando extrato de levedura e farelo de soja (U/ mL)



Fonte: O autor

**Figura 10-** Superfície de resposta para a produção de proteases utilizando glucose e farelo de soja (U/ mL)



**Fonte:** O autor

Nas Figuras 8, 9 e 10 pode observar-se as superfícies de resposta obtidas, pela análise das mesmas constata-se que os valores ainda podem ter atividades proteolíticas superiores as obtidas uma vez que não foi possível atingir a região máxima. A tabela 11 mostra numericamente que os ensaios N° 12 e 14, que possuem os valores máximos de concentração 1,3 % e 1,1 % de glucose e extrato de levedura, face aos níveis basais obtêm valores de atividade de 37,54 e 37,25 U /mL. Comparativamente ao valor máximo obtido de 42,99 U /mL, a diferença é relativamente pequena o que indica que uma maior concentração destas variáveis poderia originar resultados mais apreciáveis.

Han-Seung J. e Chung-Soon (2004) otimizaram a produção de proteases por *Bacillus* sp. I-312, usando farelo de soja a 1,5 % (m/v), farinha de trigo 1 % (m/v) e frutose a 0,5 % (m/v), para além disso otimizaram também a concentração de carbonato de sódio 0,8 % os diferentes efeitos do açucars rapidamente metabolizáveis e obtiveram o valor de 42,52 U / mL.

Tari, C., Genckal, H., e Tokatli, F. (2005) otimizaram a produção de protease do *Bacillus* sp. L21 e obtiveram a atividade máxima de 300 U /mL no meio com farelo de soja 3 % (m/v), maltose 50 35 % (m/v) e tween80 a 0,35 % (m/v).

Zhu M. et al., (2013) otimizaram a produção de uma protease de *B. subtilis* DES-59 usando diversos resíduos agroindustriais com o intuito de avaliar as variáveis mais significativas, concluíram que para esta estirpe seriam a concentração de 37,78 g/L da polpa de mandioca, 15 g/L de farelo de soja e 6,5 % (v/v) volume do inoculo resultando num máximo de 4107 U/ mL.

Saran S. et al., (2006) otimizaram a produção de protease utilizando como melhores parâmetros amido 0,5 % (m/v), farelo de soja 2 % (m/v), CaCl<sub>2</sub> 4 mM agitação a 200 rpm e 2 % (v/v) de inoculo atingindo a produção de 2543 U /mL de protease.

A equação canônica apresentada em (2), representa o ajuste das variáveis independentes X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>, (Glucose, Extrato de levedura e Farelo de Soja respetivamente) à produção de Proteases (ψ). Os termos com \* são significativos num intervalo de confiança de 95 %.

$$\varphi = 37,1937*X_1 - 7,9106X_1 + 20,5722 X_1^2 - 49,3755*X_2 + 14,5964X_2^2 - 0,0731982X_3 + 0,000406171X_3^2 + 4,65625*X_1*X_2 - 0,111181*X_1*X_3 + 0,145156X_2X_3 \quad (2)$$

A análise de variância (Tabela 12) mostrou que o modelo proposto é possui um R<sup>2</sup> significativos em um nível de 5 %, indicando a explicação de 87,8 % do modelo indicando que o mesmo pode ser aplicado com repetibilidade para fins preditivos.

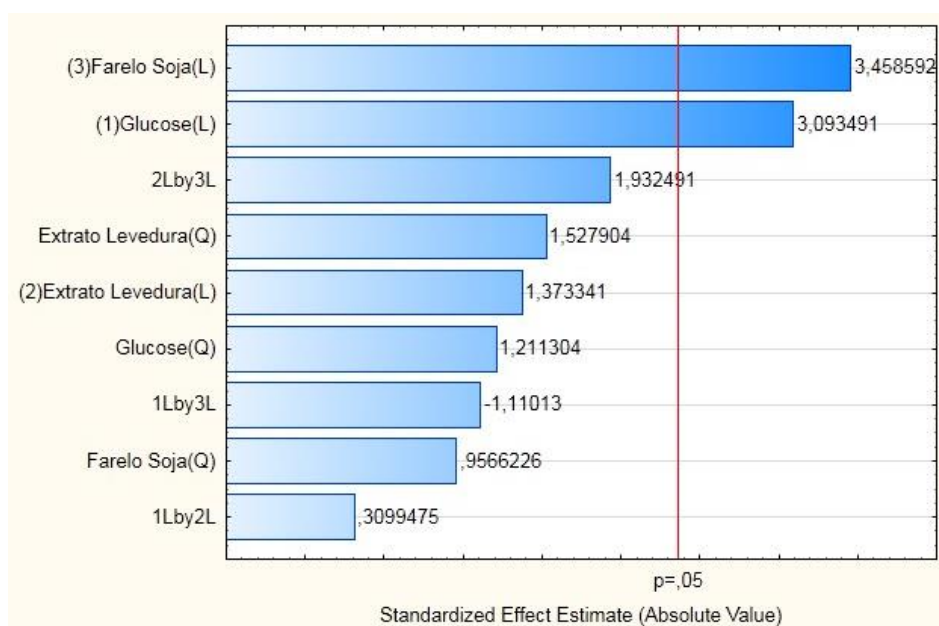
**Tabela 12** - Análise de variância dos dados obtidos pelo planejamento

	GL	SQ	QM	Fcalc.	Ftab.
<b>Modelo</b>	9	319,4672	51,0378	9,73643	4,96
<b>Falta de ajuste</b>	3	3,0012	0,8734	0,2495	5,74
<b>Erro puro</b>	5	18,5364	4,2101		
<b>Total</b>	17	343,5674			

Fonte: O autor

Na figura 11 está representado o gráfico de Pareto onde se encontram as variáveis do estudo organizadas pela sua ordem de significância. Como se pode constatar o Farelo de Soja, a Glucose foram significativos e influenciaram positivamente a produção de proteases por *B. amyloliquefaciens* MO-04b.

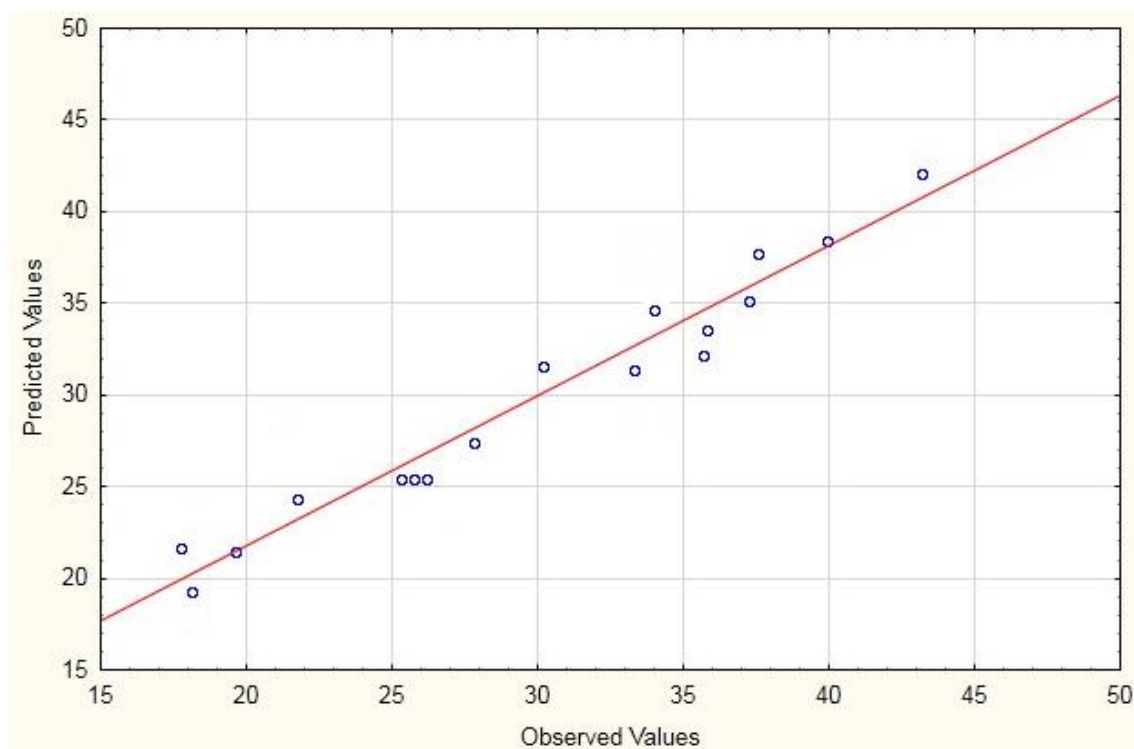
Figura 11 - Gráfico de Pareto representando a significância das variáveis independentes



Fonte: O autor

Relativamente aos valores preditivos e os observados pode ver-se na figura 12 que o ajuste para o  $p = 0,05$  demonstra que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais uma vez que estes se situam bem próximos à linha da reta.

Figura 122- Valores preditivos e observados



Fonte: O autor

Os dados obtidos para o delineamento fatorial para a produção de protease evidenciam que é ainda possível obter uma melhor resposta de atividade. Para ser possível atingir essa resposta seria necessário aumentar a quantidade de glucose, extrato de levedura e farelo de soja e assim obter a região ótima. A região ótima deverá estar com a concentração de farelo a cerca de 3 % e a concentração de extrato de levedura e glucose superior a 1%.

## 6 CONCLUSÃO

- O farelo de soja foi um substrato eficiente para a produção de proteases pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, indicando que a utilização deste resíduo tão produzido no nosso estado pode ser explorado para a produção de proteases;
- A adição de extrato de levedura, como fonte adicional de nitrogênio, contribuiu para o aumento da atividade proteolítica;
- A atividade máxima proteolítica foi atingida nas 24 h de cultivo, o que é uma vantagem devido ao curto tempo de produção;
- Os valores máximos obtidos, 42,99 U/mL em 24 h de cultivo, poderão ainda ser melhorados uma vez que o planejamento experimental aplicado não chegou ao ótimo de produção, mas indicou claramente a orientação para próximos experimentos, de forma que é ainda será possível encontrar as condições de cultivo e que levem à maior produção da enzima.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, ADIBE LUIZ, SILVA FILHO, JOSÉ CLETO DA, GODOI, ANTONIO ROBERTO DE, CARMO, CAROLINA DE ALMEIDA, & EDUARDO, JOSÉ LUIZ DE PAULA. (2008). Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37(spe), 260-268.

ADINARAYANA K e ELLAIAH P Investigations on alkaline protease production with *B. subtilis* PE-1 immobilised in calcium alginate gel beads. **Process Biochemistry** 39:1331-1339. 2004

ADULYATHAM P e OWUSU-APENTEN R Stabilization and Partial Purification of a Protease from Ginger Rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal Food Science** 70: C231-C234. 2005

ADVANCED ENZYMES, **Draft red herring prospectus**, 18 de Janeiro, 2016 pag 44

AGREBI, R., HMIDET, N., HAJJI, M., KTARI, N., HADDAR, A., FAKHFAKH-ZOUARI, N., & NASRI, M. (2010). Fibrinolytic serine protease isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An6 grown on *Mirabilis jalapa* tuber powders. **Applied biochemistry and biotechnology**, 162(1), 75-88.

AKCAN N e UYAR F Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. **Eurasia Journal of Biosciences** 5:64-72. 2011

ALP, S. e ARIKAN, S. . **Journal. Basic Microbiology**, 48: 1-7. 2008

ANDRADE, M. M., BARBOSA, A. M., BOFINGER, M. R., DEKKER, R. F., MESSIAS, J. M., GUEDES, C. L., DALL'ANTONIA, L. H. (2013). Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, 170(7), 1792-1806.

ANNAMALAI N, RAJESWARI MV, THAVASI R, VIJAYALAKSHMI S e BALASUBRAMANIAN T Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *Bacillus halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. **Bioprocess Biosystem Engineering**, 36(7), 873-883. 2012

ARMENTROUT R, HOMMA T, MUROFUSHI K e NAGURA S Process of purifying xanthan gum using an alkaline protease and lysozyme. **American Patent** No 5994107 A 1999

BACH E, SANT'ANNA V, DAROIT DJ, CORRÊA APF, SEGALIN J & BRANDELLI A (2012) Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, 47(12), 2455– 2462.

BANIK RM e PRAKASH M Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiol Resource** 159:135-140. 2004

BEG KB e GUPTA R Purification and characterization of an oxidation- table, thiol-dependant serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme Microb Technology** 32: 294 -304. 2003

BHUNIA, B., BASAK, B., & DEY, A. (2012). A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. **Journal of Biochemical Technology**, 3(4), 448-457.

BIJENDER B. KUMAR, SINGH, SATBIR, KHULLAR, MOWKSHI, SINGH, KAURAB, & BHARDWAJ, SHIKHA. (2014). Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(5), 653-662.

BLADINO A, MACIAS M, CANTERO D. Immobilization of glucose oxidase with calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, 36, 601-606. 2000

BOUGATEF A, BALTI R, HADDAR A, JELLOULI K, SOUISSI N, NASRI M . Protein hydrolysates from bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. **Biotechnol Bioprocess Engineering**, 17, 841-852. 2012

BRANDELLI A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, 1, 105–116. 2008

CAILLE J-C, GOVINDAN CK, JUNGA H, LALONDE J, YAO Y (2002). Hetero Diels -Alder-biocatalysis approach for the synthesis of (S)-3-[2-{{(methylsulfonyl)oxy}ethoxy]-4-(triphenylmethoxy)-1-butanolmethanesulfonate, a key intermediate for the synthesis of the PKC inhibitor LY333531. **Org Process Res Dev**, 6, 471-476

CHENG SW, WANG YF, WANG ML (2012). Statistical optimization of medium compositions for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. **Chem Biochem Eng Q**, 26, 225-231.

CORÎCI LN, FRISSEN AE, VAN ZOELLEN DJ, EGGEN IF, PETER F, DAVIDESCU CM, BOERIU CG (2011). Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. **J Mol Catal B: Enzym**, 73, 90–97.

CARLA J.S.M. SILVA , QINGHUA ZHANG , JINSONG SHENB, ARTUR CAVACO-PAULO, Immobilization of proteases with a water soluble-insoluble reversible polymer for treatment of wool,. **Enzyme and Microbial Technology** 39 634–640. 2006

CHAPLIN M e BUCKE C, “The large-scale use of enzymes in solution”, In *Enzyme Technology*, edited by M. Chaplin and C. Bucke, **Cambridge University Press**, 1990.

CHEN Q, GUOQING H AND JINLING W Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 and its elastase characterization evaluation. **Journal Food Engineering** 80: 490-496. 2007

COOPER M, GUTTERRES M, MARCÍLIO NR Environmental developments and researches in Brazilian leather sector. **Journal Society Leather Technology** Ch, 95, 243–49. 2011

CRUEGAR W, CRUEGAR A. 1984. **Biotechnology—A Textbook for Industrial Microbiology**, (Ed.) W.I.Madison, Science Tech Inc. London.

DAVIDENKO, T. I. (1999). Immobilization of alkaline protease on polysaccharides of microbial origin. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 33(9), 487-489.

DANQUAH MK, AGYEI D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. **OA Biotechnology**, 29, 1-7. 2012

DAROIT DJ, CORRÊA APF, CANALES MM, COELHO JG, HIDALGO ME, TICHOTA DM, RISSO PH, BRANDELLI A (2012). Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science Technology**, 92, 335-351.

DETTMER, A., CAVALLI, É., AYUB, M. A., & GUTTERRES, M. (2012). Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative. **Bioprocess and biosystems engineering**, 35(8), 1317-1324.

ENZYME ASSAYS: A PRACTICAL APPROACH, pag 216, 2002.

FEEDPEDIA FAO, Soyabean meal, disponível em:  
<http://www.feedipedia.org/node/674>, Acesso em: 25 mar. 2017

FLEMING AB, TANGNEY M, JORGENSEN PL, DIDERICHSEN B, PRIEST FG (1995) Extracellular enzyme synthesis in spore-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. **Appl Environ Microbiol**, 61, 3775– 3780.

FERREIRA L, RAMOS MA, DORDICK JS, GIL MH (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). **J Mol Catal B: Enzym**, 21, 189– 199.

FRANKENA J, KONINGSTEIN GM, VERSEVELD HW AND STOUTHAMER AH (1986) Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. **Appl Microbiol Biotchnol** 24:106-112

FOX PF, WALLACE JM, MORGAN S, LYNCH CM, NILAND EJ, TOBIN J (1996). Acceleration of cheese ripening. **Antonie van Leeuwenhoek**, 70, 271–297.

FUJIWARA, N., AND YAMAMOTO, K. 1987. Decomposition of gelatin layers on X-ray film by the alkaline protease of *Bacillus sp.*B21. **J. Ferment. Technol.**65: 531–534.

GAGNE N, SIMPSON BK (1993) Use of proteolytic enzymes to facilitate recovery of chitin from shrimp wastes. **Food Biotechnol**, 7, 253–263.

GEORGE, S., RAJU, V., SUBRAMANIAN, T. V., & JAYARAMAN, K. (1997). Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 16(6), 381-382.

GUPTA R, BEG QK e LORENZ P Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology** 59: 15–32. 2002

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K., & CHAUHAN, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process biochemistry**, 38(11), 1599-1616.

GUPTA R e RAMNANI P Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology Biotechnology** 70 (1):21–33. 2006

GUSEK TW, WILSON DR, KINSELLA JE (1988) Influence of carbon source on production of a heat-stable protease from *Thermomonospora fusca* YX. **Appl Microbiol Biotechnol** 28:80-84.

GRANZOTTO, G., MARCELINO, P. R. F., DE MELO BARBOSA, A., RODRIGUES, E. P., REZENDE, M. I., & DE OLIVEIRA, A. L. M. (2012). Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: identification of oil-eating *Bacillus* strains. **Annals of microbiology**, 62(4), 1681-1690.

HAN-SEUNGJOO, CHUNG-SOONCHANG, Production of protease from a new alkalophilic bacillus sp. i-312 grown on soybean meal: optimization and some properties, **Process Biochemistry** Volume 40, Issues 3–4, March 2005, Pages 1263-1270

HAKI G.D e RAKSHIT S.K. “Developments in industrially important thermostable enzymes: a review” **Bioresource Technology**, 89: 17-34. 2003

HAN-SEUNG JOO, CHUNG-SOONCHANG, Production of protease from a new alkalophilic bacillus sp. i-312 grown on soybean meal: optimization and some properties, **Process Biochemistry** Volume 40, Issues 3–4, March 2005, Pages 1263-1270

HELAL MMI, AMER H, ABDELWAHED NAM, GHOBASHY MOI Physiological and microbiological studies on production of alkaline protease from locally isolated *Bacillus subtilis*. **Austrian Journal Basic Applied Science**, 6, 193-203. 2012

HENRIETTA A. HEADLAM1, MICHELLE GRACANIN1, KENNETH J. RODGERS, MICHAEL J. DAVIES, Inhibition of cathepsins and related proteases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides, **Free Radical Biology and Medicine** Volume 40, Issue 9, 1 May 2006, Pages 1539–1548

HINDHUMATHI. M., VIJAYALAKSHMI. S., e THANKAMANI.V (2011)\_ Optimization and cultural characterization of alkalophilic protease producing *Bacillus* sp. GPA4. **Research in Biotechnology**, 2(4): 13-19, 2011.

HMIDET N, ALI NE-H, HADDAR A, KANOUN S, ALYA S-K, NASRI M (2009).

Alkaline proteases and thermostable amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochem Eng J**, 47, 71–79.

HUANG Q, PENG Y, LI X, WANG HF AND ZHANG YZ Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. **Current Microbiol** 46:169–173. 2003

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P. (2010). Adhesion properties of plywood glue containing soybean meal as an extender. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 87(9), 1047-1052.

INFANTE I, MOREL MA, UBALDE MC, MARTÍNEZ-ROSALES C, BELVISI S, CASTRO-SOWINSKI S. Wool-degrading *Bacillus* isolates: Extracellular protease production for microbial processing of fabrics. **World Journal of Microbiol Biotechnol**, 26, 1047-1052. 2010

INGALE, S., RELE, M. AND SRINIVASAN, M. C. **W J Microbiol Biotechnol**, 5: 403-408. 2002

JAIN D, PANCHA I, MISHRA SK, SHRIVASTAV A, MISHRA S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. **Bioresource Technology**, 115, 228-236. 2012

JAI K. KAUSHIK , SATOSHI IIMURA , KYOKO OGASAHARA , YURIKO YAMAGATA , SHIN-ICHI SEGAWA , e KATSUhide YUTANI , Completely Buried, Non-Ion-Paired Glutamic Acid Contributes Favorably to the Conformational Stability of Pyrrolidone Carboxyl Peptidases from Hyperthermophiles, **Biochemistry**, 2006, 45 (23), pp 7100–7112, DOI: 10.1021/bi052610n.

JASON CHRISTIANSEN, LANCE C. SEEFELDT AND DENNIS R. DEAN, Competitive Substrate and Inhibitor Interactions at the Physiologically Relevant Active Site of Nitrogenase November 17, 2000, **The Journal of Biological Chemistry**.

JING QIAN, DENG FU YAO, ZHIZHEN DONG, WEI WU, LIWEI QIU, NINGHUA YAO, SHANSHAN LI, YINZHU BIAN, ZHIWEI WANG, GONGSHENG SHI,; Characteristics of Hepatic IGF-II Expression and Monitored Levels of Circulating IGF-II mRNA in Metastasis of Hepatocellular Carcinoma, **American Journal of Clinical Pathology**, Volume 134, Issue 5, 1 November 2010, Pages 799–806

JISHA, V. N., SMITHA, R. B., PRADEEP, S., SREEDEVI, S., UNNI, K. N., SAJITH, S. & BENJAMIN, S. (2013). Versatility of microbial proteases. **Advances in enzyme research**, 1(03), 39.

JOO H-S, CHANG C-S (2006). Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. **Enzyme Microb Tech**, 38, 176– 183.

JOHNVESLY B AND NAIK GR (2001) Studies on production of Thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Proc Biochem** 57:139-144.

JOSHI S, SATYANARAYANA T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. **Bioresource Technology**, 131, 76-85. 2013

KALISZ MH, SCHULTZ, Microbial proteinases. **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology** 36:17-55. 2008

KAR S, ASISH M, DAS MOHAPATRA P, SAMANTA S, BIKASH RP, MONDAL K (2008). Production of xylanase by immobilized *Trichoderma reesei* SAF3 in Caalginate beads. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 35, 245–249.

KIM, J., KIM, J., CHANG, S., YUN, S. EP Patent 1,401,385, multiple layered patches for teeth whitening. 2004

KIRK O, BORCHERT TV, FUGLSANG CC. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, 13, 345-351. 2003

KITAMURA DENISE, Produção de Biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando melaço de cana-de-açúcar, **tese de mestrado**, UFPR, 2013

KOHLER N, MILAS M, RINAUDO M (1984). Enzymatic process for the treatment of xanthan gums to improve the filtrability of their aqueous solutions. US 4431734 A.

KORHONEN H, PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality. **Internacional Dairy Journal**, 16, 945–960. 2006

KUMAR CG e TAKAGI H, Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances** 17:561–594. 1999

KUNAMNENI, A., ELLAIAH, P. AND PRASAD, S. D. (2003). **AAPS Pharmatech**, 4 Article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>)

KOLE MM, DRAPER I, GERSON DF (1988) Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. **J Chem Technol Biotechnol** 41:197–206

LAGZIAN M, ASOODEH A. An extremely thermotolerant, alkaliphilic subtilisin-like protease from hyperthermophilic *Bacillus* sp. MLA64. **Internacional Journal Biology Macromolar**, 51, 960–967. 2012

LONSANE BK, GHILDYAL NP, BUDIATMAN S, RAMAKRISHNA SV. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, 7, 258–265. 1985

LÓPEZ-IGLESIAS M, BUSTO E, GOTOR V & GOTOR-FERNÁNDEZ V (2011) Use of protease from *Bacillus licheniformis* as promiscuous catalyst for organic synthesis: Applications in C-C and C-N bond formation reactions. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 353(13), 2345-2353.

LV LX, SIM MH, LI YD, MIN J, FENG WH, GUAN WJ, LI YQ (2010). Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. **nov. Process Biochem**, 45, 1236– 1244

MAHMOUDIAN M (2000). Biocatalytic production of chiral pharmaceutical intermediates. **Biocatal Biotransform**, 18, 105-118.

MALATHI S, CHAKRABORTY R (1991) Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Appl Environ Microbiol** 57:712-716.

MASSI, Juliana. **Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b**. 2014. 131 f. Dissertação(Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2014

MARKARYAN, A., MOROZOVA, I., YU, H. AND KOLATTUKUDY, P. E. **Infect Immunology**, 62: 2149-2157. 1994

MC KAY AM (1992) Production of an alkaline protease by *Fusarium graminearum* grown on whey. **Milchwissenschaft** 47:147-148.

MEDEIROS, Samantha. Improving the nutritional value of soybean meal through fermentation using newly isolated bacteria, **Tese Mestrado**, Guelph, Ontario, Canada, 2015

MELLON, J. E. e COTTY, P. J. . ) Expression of elastinolytic activity among isolates in *Aspergillus* **Mycopathology**, 131: 115-120.1995

MITAL S. DODIA; RUPAL H. JOSHI; RAJESH K. PATEL; SATYA P. SINGH ,Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of coastal Gujarat, India, **Brazil Journal Microbiology**. vol.37 no.3 São Paulo July/Sept. 2006

MOORTHY IMG, BASKAR R . Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* 58 species bgs using response surface methodology and genetic algorithm. **Preparative Biochemistry Biotechnology**, 43, 293-314. 2013

MUKHERJEE AK, BORAH M e RAI SK To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of  $\alpha$ -amylase in laundry detergent formulations. **Biochemistry Engineering Journal**, 43, 149–156. 2009

MUKHTAR, H., & HAQ, I. (2013). Comparative evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *Bacillus subtilis* in submerged and solid state fermentation. **The Scientific World Journal**, 2013.

MRUDULA S, SHYAM N (2012). Immobilization of *Bacillus megaterium* MTCC 2444 by Ca-alginate entrapment method for enhanced alkaline protease production. **Braz Arch Biol Technol**, 55, 135-144.

NADIA ZARAË JAOUADI , HATEM REKIK, ABDELMALEK BADIS, SAHAR TRABELSI, MOUNA BELHOUL, AMINA BENKIAR YAHIAOUI, HOUDA BEN AICHA, ABDESSATAR TOUMI, SAMIR BEJAR, AND BASSEM JAOUADI, Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities, **PLoS One**. 2013; 8(10): e76722.

- NADEEM M, BAIG S, SYED Q-U-A, QAZI JI Microbial production of alkaline proteases by locally isolated *Bacillus subtilis* PCSIR-5. **Pakistan Journal Zoology**, 38, 109-114., 2006
- NAKIBOGLU, N., TOSCALI, D. AND NISLI, G. (2003). Novel silver recovery method from waste photographic films with NaOH stripping. **Turk Journal Chemistry**.27: 127-133.
- NASSAR, F. R., ABDELHAFEZ, A. A., EL-TAYEB, T. S., & ABU-HUSSEIN, S. H. (2015). Purification, Characterization and Applications of Proteases Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 35s Isolated from Soil of the Nile Delta of Egypt. **British Microbiology Research Journal**, 6(5), 286.
- NETO, D. C., MEIRA, J. A., DE ARAÚJO, J. M., MITCHELL, D. A., & KRIEGER, N. (2008). Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied microbiology and biotechnology**, 81(3), 441.
- OLIVARES, I., MULKY, A., BOROSS, P.I., TÖZSÉR, J., KAPPES, J.C., LÓPEZ-GALÍNDEZ, C., MENÉNDEZ-ARIAS, L. HIV-1 protease dimer interface mutations that compensate for viral reverse transcriptase instability in infectious virions. **Journal Molecular Biology**. 372, 369-381. 2007
- OZCAN T, KURDAL E. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. **International Journal Dairy Technology**, 65 585–593. 2012
- ÖZLEM DOĞAN EKICI, MARK PAETZEL, e ROSS E. DALBEY, Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration, **Protein Science** 2008 Dec; 17(12): 2023–2037.
- ÖZTÜRK B. “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports”, **M.S. Thesis**, zmir Institute of Technology, Turkey. 2001
- PALANIYANDI, YANG e SUH, Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*., **Journal Applied Microbiology**. 2013 July
- PALIWAL N, SINGH SP, GARG SK. Cation induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. **Bioresource Technology**, 50, 209–211. 1994
- PANDEY A, SELVAKUMAR P, SOCCOL CR AND NIGAM P, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Journal Microbiology** 77: 149–162. 1999
- PANDEY A, SOCCOL CR, MITCHELL D, New developments in solid state fermentation: I—bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35, 1153–1169. 2000
- PARK PJ, LEE SH, BYUN HG, KIM SH AND KIM SK, Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicas*. **Journal Biochemistry Molecular Biology** 35: 576-582. 2002

PETTERSSON, D., & PONTOPPIDAN, K. (2013). Soybean meal and the potential for upgrading its feeding value by enzyme supplementation. In Soybean-Bio-Active Compounds. **InTech**.

PHADATARE SU, DESHPANDE VV AND SRINIVASAN MC (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme Microb Technol** 15:72-76.

POLLOCK, T.J. **Enzymatic clarification of polysaccharides**. 1994. US 5354671A.

POPPE L, NOVAK L., Selective Biocatalysis, Weinheim, Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992. XII, 319 S., geb. 168.00 DM. — ISBN 3-527-28372.1992

PRAKASHAM RS, RAO CS AND SARMA PN Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology** 97: 1449-1454. 2006

PREMKUMAR J, T SUDHAKAR, E.R. REETHA , VINITA GAUR, Production and Characterisation of an Alkaline Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Soil , **Int.J. ChemTech Res.**2014,6(7),pp 3860-3863.

PRIEST , F . G., Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* **Bacteriological Reviews**.41: 711-753. 1977

RAHMAN RNZA, RAZAK CN, AMPOM K, BASRI M, YUNUS WMZW AND SALLEH AB, Purification and characterization of a heat stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. **Applied Microbiology Biotechnology** 40:822-827. 1994

RAHMAN, R. N. Z. A., GEOK, L. P., BASRI, M., & SALLEH, A. B. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. **Bioresource technology**, 96(4), 429-436.

RAJKUMAR R, JAYAPPRIYAN KR, RENGASAMY R (2011) Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus subtilis* megaterium RRM2: Application in detergent and dehairing industries. **J Basic Microbiol**, 51, 614-624.

RAKSAKULTHAI e HAARD Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review.**Critical Review Food Science Nutrition.**;43(4):401-45. 2003

RAMAKRISHNA DPN, REDDY, NG, GOPAL, SVR., Solid state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* KHS-1 (MTCC No-10110) using different agro- industrial residues. **International Journal Pharmacy Sci**, 4, 512-517. 2012

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62:597–635, 1998.

RATHAKRISHNAN P, NAGARAJAN P., Red gram husk: A potent substrate for production of protease by *Bacillus cereus* in solid-state fermentation. **International Journal Chemistry Technical Resolutions**, 3, 1526-1533. 2011

RAWLINGS, N.D., AND A.J. BARETT., Evolutionary families of peptidases. **Journal of Biochemistry**.290: 205-218. 1993

REHM HJ AND REED J., Biotechnology. Vol. 7a . **Enzyme technology**. 10-203. 1987

RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JR, V. A., & VICTOR, O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathol**, 12(1-2), 32.

SANDHYA, C., SUMANTHA, A., SZAKACS, G., & PANDEY, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process biochemistry**, 40(8), 2689-2694.

SANGEETHA R, GEETHA A, ARULPANDI., *Pongamia pinnata* seed cake: A promising and inexpensive substrate for production of protease and lipase from *Bacillus pumilus* SG2 on solid-state fermentation. **Indian J Biochem. Biophys**, 48 435-439. 2011

SARAN, S., ISAR, J., & SAXENA, R. K. (2007). Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus* sp. and its scale-up in a bioreactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, 141(2), 229-239.

SECOR JRER, CARSON WF, CLOUTIER MM, GUERNSEY LA, SCHRAMM CM, WUCA AND THRALL RS. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular Immunology** 237: 68-75. 2005

SEKIZAKI H, TOYOTA E, FUCHISE T, ZHOU S, NOGUCHI Y AND HORITA K, Application of several types of substrates to ficin-catalyzed peptide synthesis. **Amino Acids** 34:149-153. 2008

SHANKAR S, MORE SV AND LAXMAN RS., Recovery of silver from waste x-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Kuset** 6(1):60-69. 2010

SHASTRY S, PRASAD MS (2002). Extracellular protease from *Pseudomonas* sp. (CL 1457) active against *Xanthomonas campestris*. **Process Biochem**, 37, 611–621

SHIKHA, SHARAN A, DARMWAL NS., Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresource Technology**, 98, 881-885. 2007

SHIN GH, KIM C, KIM HJ, SHIN CS., Stereoselective enzymatic synthesis of an aspartame precursor of N-CBZ-L-Asp-L-PheOMe. **Journal Molecular Catalyses Enzymatic**, 26, 201-208. 2003

SHIVASHARANA CT, NAIK GR., Production of alkaline protease from a thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 under solid state fermentation. **International Journal Pharmacy Biology Science**, 3, 571-587. 2012

SHULER ML, KARGI F. 2008. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2nd ed. Prentice Hall Pvt. Ltd.

- SILVA VANESSA, Extrato de levedura (*saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas, **Tese de mestrado UNESP**, 2006
- SINHA R, KHARE SK., Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. **Bioresource Technology**, 145, 357-361. 2012
- SONG, B., RONG, Y. J., ZHAO, M. X., & CHI, Z. M. (2013). Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. **Applied microbiology and biotechnology**, 97(16), 7141-7150.
- SOOKKHEO B, SINCHAIKUL S, PHUTRAKUL S, CHENS., “Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus tearothermophilus* TLS33” **Protein Expression and Purification**, 20, 142. 2000
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C., & PANDEY, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, 44(2), 211.
- SURESH e PRASAD, Aplicação tecnológica de uma enzima celulolítica para clarificação de goma xantana, **Brazil Journal Microbiology**, vol.36 no.1 São Paulo Jan/Mar. 2005
- TARI, C., GENCKAL, H., & TOKATLI, F. (2006). Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochemistry**, 41(3), 659-665.
- TOCHI, B. N., WANG, Z., XU, S. Y. AND ZHANG, W., **Pakistan Journal Nutrition**, 7: 513-520. 2008
- TODAR K. 2000. **Nutrition and Growth of Bacteria**, University of Wisconsin-Madison.
- TRIVENI R, SHAMALA, TR (1999). Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*. **Process Biochem**, 34, 49–53.
- TSUCHIYA K, SAKASHITA H, NAKAMURA Y ET AL (1991) Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. **Agric Biol Chem** 55:3125– 3127.
- USDA, **Full Report (All Nutrients): 16119, Soy meal, defatted, raw**. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=25&sort=c&qlookup=&offset=0&format=Full&new=&rptfrm=nl&ndbno=16119&nutrient1=203&nutrient2=&nutrient3=&subset=0&totalCount=386&measuraby=m>, revised May, 2016
- VERMELHO, A. B., MELO, A. C. N., SÁ, M. H. B., SANTOS, A. L. S., D’AVILA-LEVY, C. M., COURI, S., & BON, E. P. (2008). **Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, 273-287.

VIRGINIA MANDUJANO-GONZÁLEZA, LOURDES VILLA-TANACAB, MIGUEL ANGEL ANDUCHO-REYESA, YURIDIA MERCADO-FLORES, Secreted fungal aspartic proteases: A review Aspartil-proteasas secretadas por hongos: revisión, **Revista Iberoamericana de Micología** Volume 33, Issue 2, April–June 2016, Pages 76–82.

XIAO, Z. J., LIU, P. H., QIN, J. Y., & XU, P. (2007). Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74(1), 61-68.

WANG Y-K, HE H-L, WANG G-F, WU H, ZHOU B-C, CHEN X-L, ZHANG Y-Z. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. **Marine Drugs**, 8, 255-268. 2010

WELLINGTA e MEIRA, Production of proteases by *Bacillus* sp. SMIA-2 grow on whey and corn steep liquor and compatibility of the enzyme with commercial detergents, **Ciência Tecnologia Alimentos** vol.26 no.3 Campinas July/Sept. 2006

WITEK-KROWIAK, A., & REDDY, D. H. K. (2013). Removal of microelemental Cr (III) and Cu (II) by using soybean meal waste–unusual isotherms and insights of binding mechanism. **Bioresource technology**, 127, 350-357.

YANG J-K, SHIH I-L, TZENG Y-M, WANG, S-L., Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme Microbiology Technology**, 26, 406–413. 2000

ZAPELENA MJ, ZALACAIN I, DE PEÑA MP, ASTIASARÁN I, BELLO J (1997). Effect of the addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (Neutrase) on nitrogen fractions and texture of spanish fermented sausage. **J Agric Food Chem**, 45, 2798-2801a.

ZAREENA MUSHTAQ, MUHAMMAD IRFAN 2, MUHAMMAD NADEEM, MAMMONA NAZ, QURATULAIN SYED , Kinetics Study of Extracellular Detergent Stable Alkaline Protease from *Rhizopus oryzae*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**. vol.58 no.2 Curitiba Mar./Apr. 2015

ZBIGNIEW GRZONKA, ELIBIETA JANKOWSKA, FRANCISZEK KASPRZYKOWSKI, REGINA KASPRZYKOWSKA, LESZEK ANKIEWICZ, WIESAW WICZK, EWA WIECZERZAK, JERZY CIARKOWSKI, PIOTR DRABIK, ROBERT JANOWSKI, MACIEJ KOZAK, MARIUSZ JASKÓLSKI, and Anders Grubb , **Acta biochimica polonica**, vol 48, n° 1, 2001

ZHENG-YI WEI, YU-YING ZHANG, YUN-PENG WANG, MING-XIA FAN, XIAO-FANG ZHONG, NUO XU, FENG LIN e SHAO-CHEN XING , Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants, **International Journal Molecular Science**.17(5), 624; doi:10.3390/ijms17050624 .2016

ZHU, M. J., CHENG, J. R., CHEN, H. T., DENG, M. C., & XIE, W. H. (2013). Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial

residues as substrates and response surface methodology. **Biotechnology and applied biochemistry**, 60(3), 336-342.

**ANEXO**

Primeira versão do artigo a ser submetido à revista Agronomy Science and  
Biotechnology

# Production of protease from *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b grown on soybean meal in submerge fermentation

Ramos A. S. F. T<sup>1</sup>, Rezende M.<sup>1\*</sup>, Moreira-Gasparin F. G.<sup>1</sup>, Baldo C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, CP 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding Author, E-mail: [mirezende@uel.br](mailto:mirezende@uel.br)

## ABSTRACT

In the last decades, there's been an extensive use of chemical insecticide which can be a threat to humans and other animals like herbivores, pollinators insects and the ecosystem. Newer formulations should diminish this hazard, proteases could be included since evidences suggest their benefic properties to plants and the environment. The aim of this study was to produce those biomolecules in a cost-effective agriculture residue by a simple and inexpensive process. In this work the cultures were grown in 50 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of mineral salts medium KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L plus glucose 10 g/L. Different concentrations of soybean meal 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 2.0 and 4.0% (w / v) were tested for the production of proteases, pH and production over time were recorded. An

optimization was conducted using as significant variables glucose, yeast extract and soybean meal, resulting in 42,99 U/mL as the greater proteolytic activity. Despite the fact of the suitability to extracellular proteases can be produced using soybean meal, further research should be conducted to maximize the production.

**Keywords:** Protease Soybean meal, Insecticide, Submerge fermentation, *Bacillus amyloliquefaciens*, Optimization Soybean meal

## INTRODUCTION

According to Embrapa Soja (2016) Brazil occupies the second position in the soybean world rank producers, with a total of 113 926 million tons of soybean originating 30,9 million tons of soybean meal. Traditionally this agroindustry residue is used as an animal feed due to its ratio of proteins and carbohydrate (Grandis et al., 2016), although new utilizations have been described. Among them the ones receiving more attention is as culture medium to obtain biomolecules from microbial fermentation. There are plenty of biomolecules that can be produced like, enzymes, vitamins, organic acids, antibacterial antifungal compounds (Andrade et al., 2014, Chen et al., 2014). Within these, proteases occupy one of the largest biomolecules produced with an estimated business volume of 1760 US million dollars for 2017 according to Advanced Enzymes. Although the proteases are well known as a bactericidal agent (Taufik et al., 2016; Stapels et al., 2015), and also as an antifungal (Yue-Horng et al., 2006), they may also be applied as insecticidal agent. In the last decades, there's been an extensive use of chemical insecticide which can be a threat to humans and other animals like herbivores, pollinators insects and the ecosystem. (Harrison and Bonning, 2010). Proteases can be applied with no hazard to the environment, when sprayed in leaves stimulate the plant defense system with the creation of the protease inhibitors naturally occurring when the

insect is feeding on the plant like Kunitz trypsin and Bowman-Birk well know in soybean (Gillman et al., 2015). Despite that fact the proteolytic mechanism is also able to attack the insect cuticle (Dias et al., 2008; Dhar and Klaur, 2010; Page et al., 2014) and the hemocoel (14, 15). Providing a reduce defense in those membranes allowing the contamination of other natural field microbes and fungus resulting in death or delay in insect growing and metamorphose (Min et al., 2016, Jeffers et al., 2014). In this paper we report the production of proteases from *B. amyloliquefaciens* MO-04b from inexpensive medium containing soybean meal and a simple fermentation process with feasible applications in a non-hazard agriculture.

## **MATERIALS AND METHODS**

The microorganism utilized was isolated from the refinery Getúlio Vargas in Parana State, Brazil, a heavy contaminated site by large hydrocarbons. The isolate was maintained in DIG'S culture medium and store at -4 °C. The minimum salt culture medium for the cell growth and activation contained (g l<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 0,2. To properly evaluate the protease production was added to the medium previously described : yeast extract 1 (g l<sup>-1</sup>) and soybean meal at five different concentrations (Figure 1). The medium was inoculated with 0,2 mL of a 24-hour-old seed culture, and incubated at 37 °C with shaking at 180 rpm for 24 h. To study the protease production over time was added to the minimum salt culture yeast extract and soybean meal, 1 and 2 (g l<sup>-1</sup>) respectively, the pH changes were also recorded and presented in Figure 3. In order to optimize the culture medium components for the maximum protease production the different combined concentrations of glucose, yeast extract and soybean meal were added to the minimum

salt medium, the fermentation lasted 24h at 180 rpm. A statistical Central Composite Design was used as a model, coded levels ( -1,682, -1, 0, +1, +1,682) for the analyzed variables can be seen in Table 1. A total of 60 experiments were conducted counting the repetition to minor the statistical error interference. Table 2 presents the actual and coded values of the full experiment plan, where the response values (Y) in each trial were the average of the triplicates. The protease assay activity was determined using bovine serum albumin 5mg /mL as a substrate, glycine-NaOH buffer (pH 9.5) with the dialyzed protease and water. All the constituents of the incubation system had a volume of 250  $\mu$ L and the reaction last for an hour at 37 °C, stopped with TCA and centrifuged. One unit of enzyme activity is defined as the amount the enzyme resulting in the release of 1  $\mu$ g of tyrosine quantified by Hartree methodology.

**Table 1.** Variable code and levels applied in protease optimization by response surface methodology.

Variables	Unit	code	-1,682	-1	0	1	1,682
Glucose	g/L	$X_1$	0,5	0,7	1	1,3	1,5
Yeast extract	g/L	$X_2$	0	0,3	0,7	1,1	1,4
Soybean meal	g/L	$X_3$	1	1,4	2,0	2,6	3,0

**Table 2.** Central composite design matrix for the experimental design and responses for the protease activity.

<b>Run order</b>				<b>Response</b>
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Protease Activity (U/mL)
<b>1</b>	-1	-1	-1	27,03
<b>2</b>	-1	1	1	39,95
<b>3</b>	1	-1	1	35,69
<b>4</b>	1	1	-1	30,2
<b>5</b>	0	0	0	26,17
<b>6</b>	-1	-1	1	33,89
<b>7</b>	-1	1	-1	18,16
<b>8</b>	1	-1	-1	35,84
<b>9</b>	1	1	1	42,99
<b>10</b>	0	0	0	25,34
<b>11</b>	-1,682	0	0	18,13
<b>12</b>	1,682	0	0	37,54
<b>13</b>	0	-1,682	0	21,13
<b>14</b>	0	1,682	0	37,25
<b>15</b>	0	0	-1,682	19,65
<b>16</b>	0	0	1,682	33,84
<b>17</b>	0	0	0	25,78

## RESULTS AND DISCUSSION

Among the five different concentrations of soybean meal three concentrations had an appreciable value, 1,6 %, 2% and 4 %. The concentration of 2 % was the one with highest level of the extracellular protease activity with 26,53 U/mL (Figure 1). Due to that this concentration of soybean meal was prior used in the following experiments. Although the comparison with different *Bacillus* sp. and culture medium can't be exactly correlated, a tendency can be observed for the best activity values in this concentration gama (Han-Seung and Chung-Soon, 2005; Song et al., 2013; Mukhtar H. and Haq I, 2013).

The protease production over time is shown in Figure 2, a maximum of 48 h of fermentation time was establish. At 24h was achived the maximum extracelular protease production with 26,82 U/ mL. After that the protease activity tends to slowly diminiush the activity. The results are similar to Guleria et al., (2016); Sai-Ut et al., 2015) where the 24 h time interval proved to be the one with the most apreciable protease activity and because of that was choose as a basal fermentation parameter to the optimization.

During the 48h fermentation time changes were recorded the in pH from the initial 6.3 to the 8.5, at end of submerge fermentation. The pattern observed is characteristic from the *Bacillus* sp. (Satbir and Bijender, 2017; Premkumar et al., 2014; Satbir and Bijender, 2015). In previous and unpublsh work was determined that the greater proteolytic activity has pH equals to 9.5, so presumable augmentation of the alkaline characteristics of the medium can be associated with the better protease activity.

A medium culture optimization was done and the best obtained proteolytic value obtained was 42,99 U/mL in 24h, 37 °C at 180 rpm. Figures 4-6 show the relative effects of three different sets of factors while conserving other variables at their central points: yeast extract and glucose (Figure 4), yeast extract and soybean meal (Figure 5) and soybean meal and glucose (Figure 6). Figure 4 indicates that yeast extract and glucose have a significant interaction to the protease yield, although its observed some independence in variable relation. The proteolytic activity seems to be more dependent on the glucose than yeast extract, a variation of glucose concentration results in a greater range of proteolytic activity aside from the yeast extract. Figure 5 exhibits a similar trend to Figure 4. However, yeast extract accounts more for protease production when compared to the soybean meal. Figure 6 indicates a dependent association between soybean meal and the glucose, where with a concentration increment of both medium components, results linearly in a protease activity augmentation.

The ANOVA parameters concerning this optimization were very appreciable since a  $R^2$  of 0,87 was obtained and thus indicating that 87% could be explained by the model.

Demonstrating a possible reproducibility of the experiments in wider volume ranges, all the other statistical parameters can be seen in Table 3.

**Table 3.** Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model for the Box-Behnken design.

	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Sum Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b><i>F-Value</i></b>	<b><i>F-tab.</i></b>
<b>Model</b>	9	319,4672	51,0378	9,73643	4,96
<b>Lack of fit</b>	3	3,0012	0,8734	0,2495	5,74
<b>Pure error</b>	5	18,5364	4,2101		
<b>Total</b>	17	343,5674			

The validation of the model can be proved by the adjust of the predictive values versus the obtained ones in Figure 7. The model is well adjusted, indicating that experimental values obtained were quite close to the predictive ones, validating the proposed model.

## CONCLUSIONS

*Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b a recently isolated bacterium that can produce extracellular proteases on an agroindustry residue. A successful improvement (1.1 fold) in the enzyme production (60 %) was accomplished, although further studies need to be conducted in order to maximize the production and also assess others important parameters.

## REFERENCES

Advanced Enzymes (2016) DRAFT RED HERRING PROSPECTUS, pag 44-  
[http://www.sebi.gov.in/sebi\\_data/attachdocs/1453372309087.pdf](http://www.sebi.gov.in/sebi_data/attachdocs/1453372309087.pdf), accessed 21 July 2017

Andrade, M., Barbosa, A., Dekker, R., Rezende, M., Messias, J., & Dall'antonia, L. (2014). Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean meal supplemented with amino acids, and some physicochemical properties of the enzyme. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, 6(3), 169-177

Chen jie-mei; Zhang Can-hui; Ai T ian; Study of the antibacterial peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* kn-bl-1 and its fermented soybean meal. *Journal of China Biotechnology*, 2014, 34(10) 61-66

Dias, B. A., Neves, P. M. O. J., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M. C. (2008). Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 301–306.

Dhar, P., & Kaur, G. (2010). Cuticle-Degrading Proteases Produced by *Metarhizium anisopliae* and Their Induction in Different Media. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 449–455.

Embrapa (2017), Soja em números (safra 2016/2017) junho de 2017, <https://embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>, accessed 21 July 2017.

Grandis, Fernando Augusto, Ribeiro, Edson Luis de Azambuja, Mizubuti, Ivone Yurika, Bumbieris Junior, Valter Harry, Prado, Odímári Pricila Pires do, & Pinto, Andréa Pereira. (2016). Características de carcaça e qualidade da carne de cordeiros alimentados com diferentes teores de torta de soja em substituição ao farelo de soja. *Ciência Animal Brasileira*, 17(3), 327-341.

Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A. and Shirkot, C. K. (2016), Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. *J. Basic Microbiol.*, 56: 138–152. doi:10.1002/jobm.201500341

Han-Seung Joo, Chung-SoonChang, Production of protease from a new alkalophilic bacillus sp. i-312 grown on soybean meal: optimization and some properties, *Process Biochemistry* Volume 40, Issues 3–4, March 2005, Pages 1263-1270

Jason D. Gillman, Won-Seok Kim, and Hari B. Krishnan, Identification of a New Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Mutation and Its Effect on Bowman–Birk Protease Inhibitor Content in Soybean Seed, *J Agric Food Chem.* 2015 Feb 11;63(5):1352-9.

Jeffers Laura A, Hongyan Shen, Brooke W. Bissinger, Sayed Khalil, T. Brent Gunnoe, R. Michael Roe, Polymers for the stabilization and delivery of proteins topically and per os to the insect hemocoel through conjugation with aliphatic polyethylene glycol, *Pesticide Biochemistry and Physiology* Volume 115, October 2014, Pages 58-66

MinShu, DingzeMang, Gege SunFu, ShihoTanaka, HarukaEndo, ShingoKikuta, RyoichiSato, Mechanisms of nodule-specific melanization in the hemocoel of the silkworm, *bombyx mori*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* Volume 70, March 2016, Pages 10-23

Mukhtar, H., & Haq, I. (2013). Comparative Evaluation of Agroindustrial Byproducts for the Production of Alkaline Protease by Wild and Mutant Strains of *Bacillus subtilis* in Submerged and Solid-State Fermentation. *The Scientific World Journal*, 2013, 538067.

Page, A. P., Stepek, G., Winter, A. D., & Pertab, D. (2014). Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 133–141.

Premkumar J, T Sudhakar, E.R. Reetha , Vinita Gaur, Production and Characterization of an Alkaline Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Soil , *Int.J. ChemTech Res.*2014,6(7),pp 3860-3863.

Robert L. Harrison 1 and Bryony C. Bonning, Proteases as Insecticidal Agents, *Toxins* 2010, 2(5), 935-953;

Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P. and Kishimura, H. (2015), Purification and Characterization of Extracellular Gelatinolytic Protease from *Bacillus Amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 119–128. doi:10.1111/jfbc.12114

Satbir Singh, Bijender Kumar Bajaj, Agroindustrial/forestry residues as substrates for production of thermoactive alkaline protease from *Bacillus licheniformis* k-3 having

multifaceted hydrolytic potential, Waste and Biomass Valorization, March 2017, Volume 8, Issue 2, pp 453–462

Satbir Singh & Bijender Kumar Bajaj, Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* k-1, Chemical Engineering Communications Vol. 202 , Iss. 8,2015

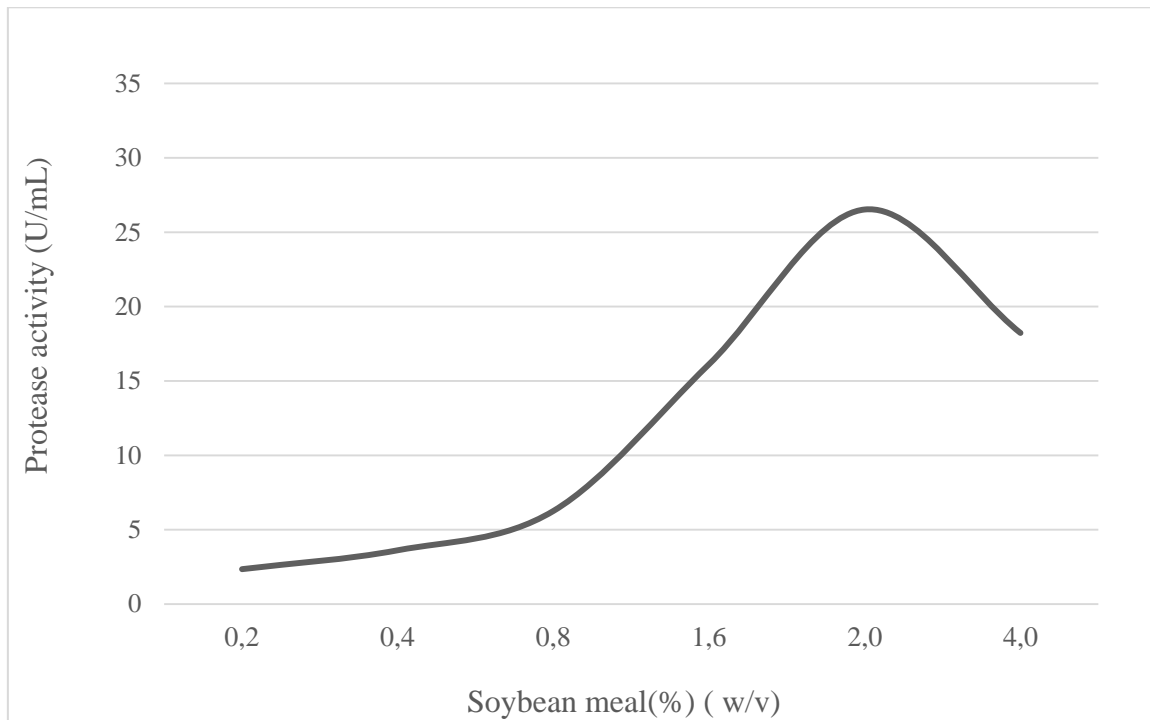
Song, B., Rong, YJ., Zhao, MX, Zhen M. C. Antifungal activity of the lipopeptides produced by bacillus amyloliquefaciens anti-ca against *Candida albicans* isolated from clinic Appl Microbiology Biotechnology (2013) 97: 7141.

Stapels DAC, Geisbrecht BV, Rooijackers SHM. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. Journal of Current opinion in microbiology. 2015;0:42-48..

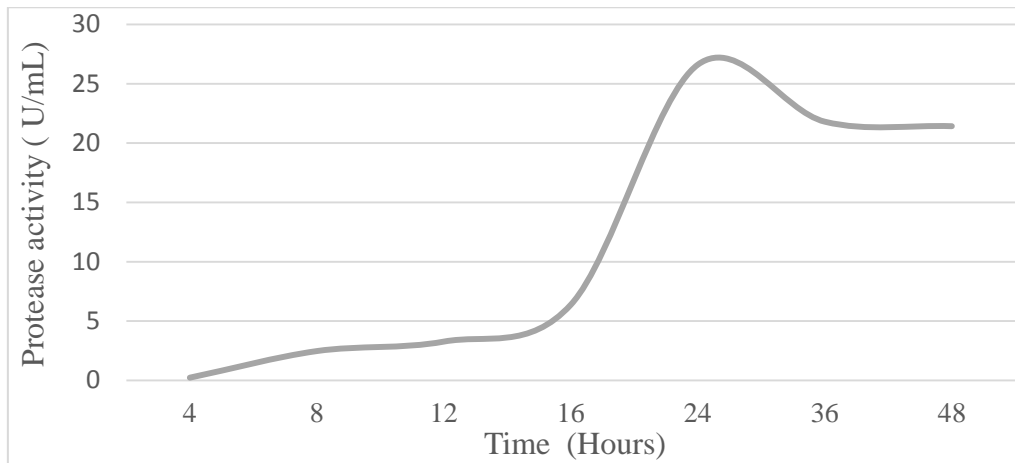
Taufik Indarmawan, Apon Zaenal Mustopa, Bugi Ratno Budiarto, Kustiariyah Tarman, Antibacterial Activity of Extracellular Protease Isolated From an Algicolous Fungus KT30 Against Gram-Positive Bacteria, HAYATI Journal of Biosciences, Volume 23, Issue 2, 2016, Pages 73-78,

Yue-HorngYen, Pei-LingLi.Chuan-LuWangb..San-LangWang, An antifungal protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 with shrimp and crab shell powder as a

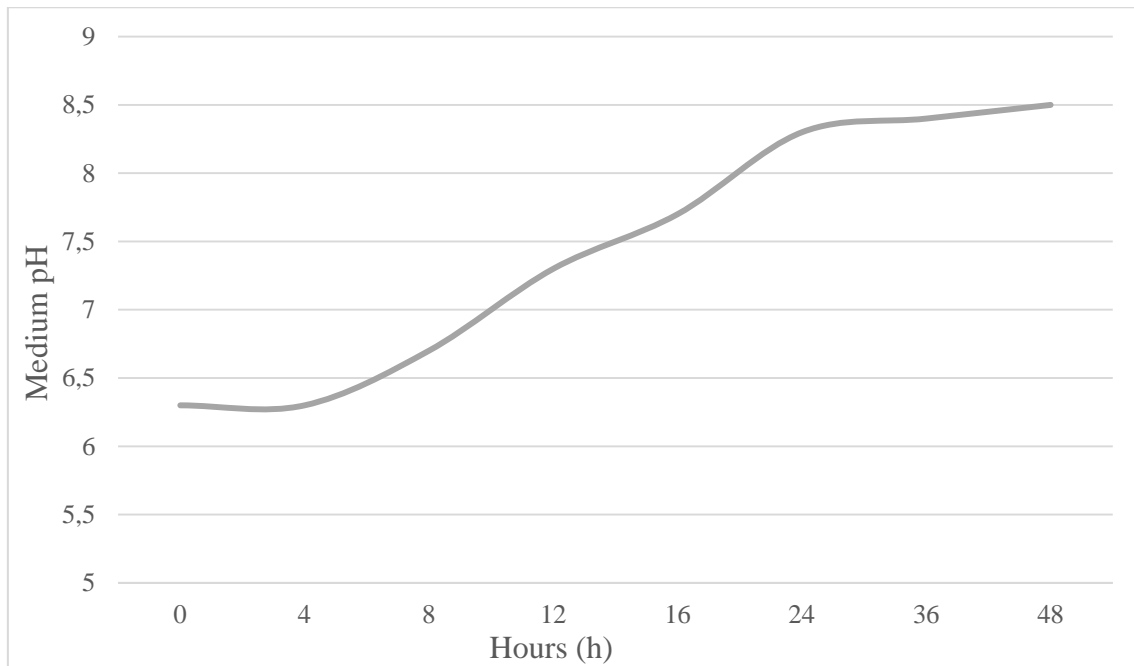
carbon source, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 39, Issue 2, 26 June 2006,  
Pages 311-317



**Figure 1.** Production of extracellular protease by *B. amyloliquefaciens* MO-04b at different soybean meal concentrations in 24 h

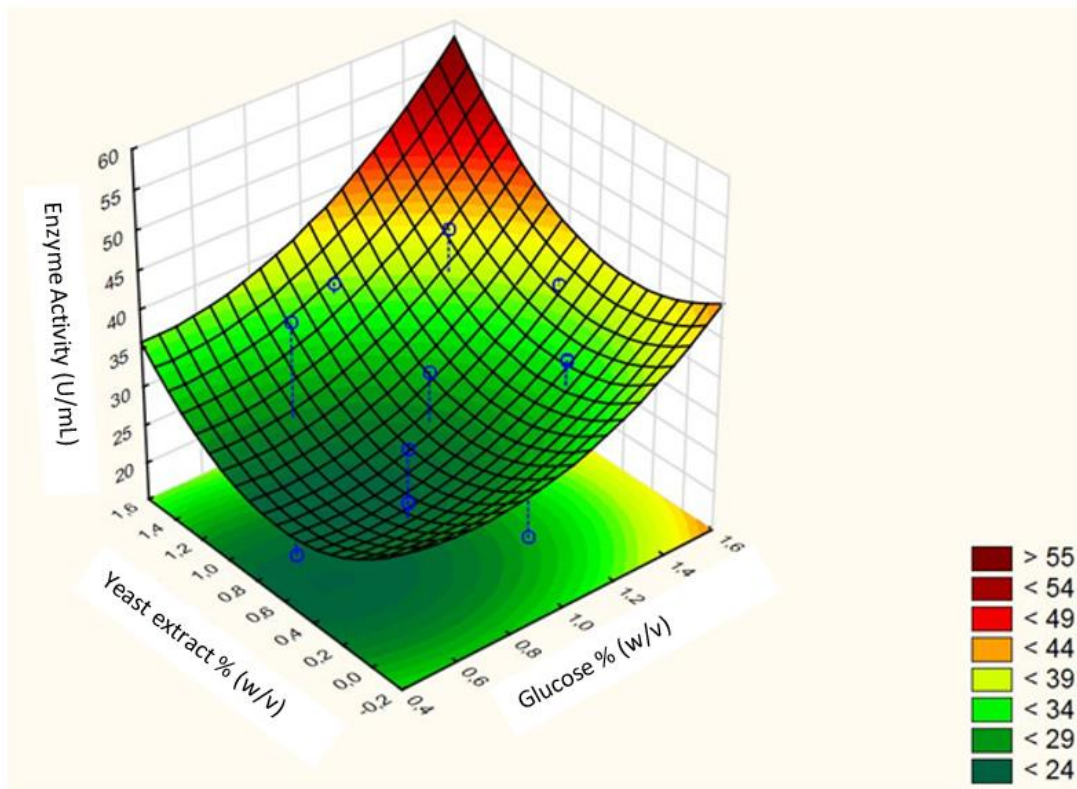


**Figure 2.** Production of extracellular protease by *B. amyloliquefaciens* MO-04b in distinct time intervals between 48h

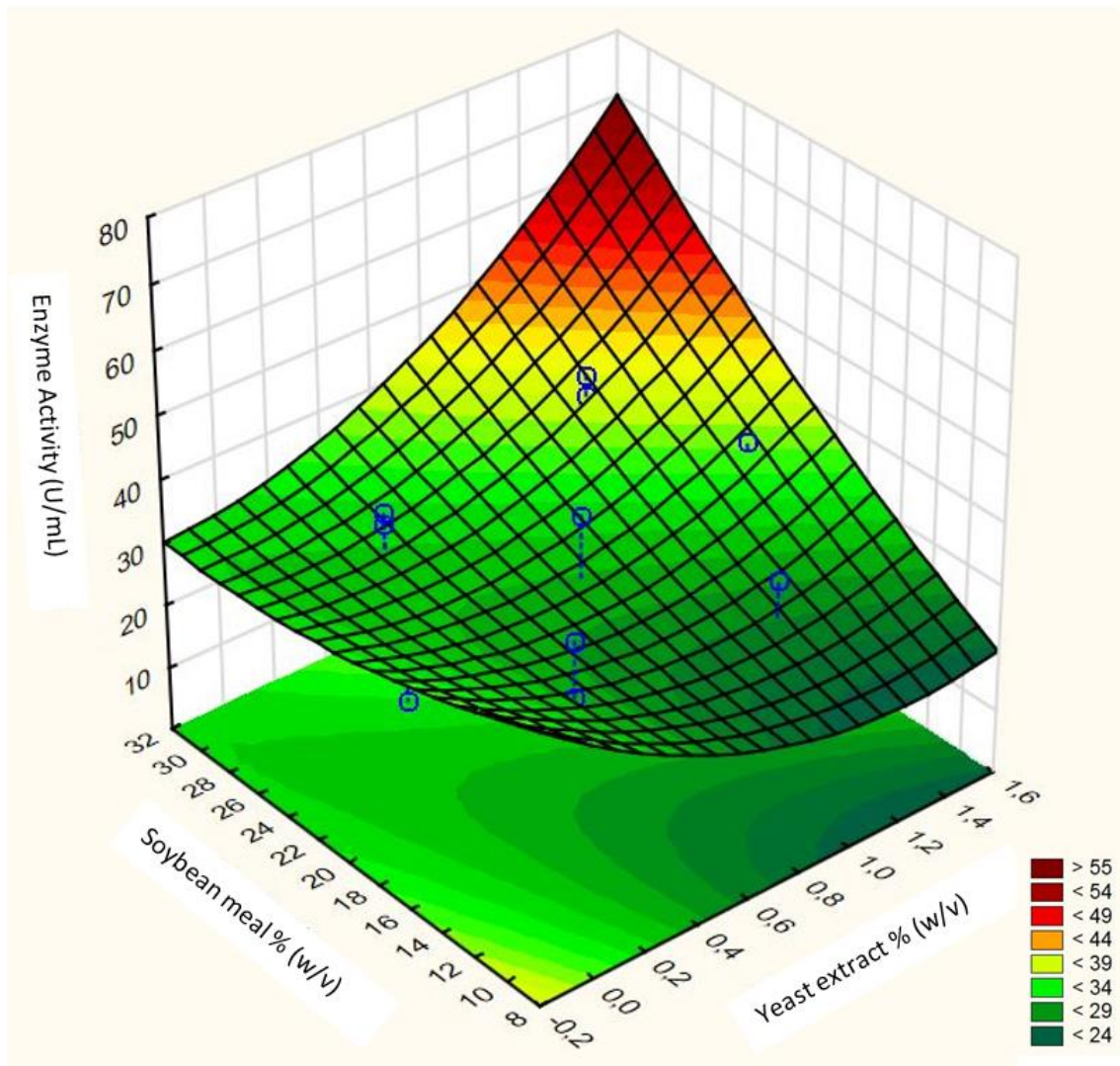


**Figure 3.** Medium pH alterations in submerge fermentation by *B. amyloliquefaciens*

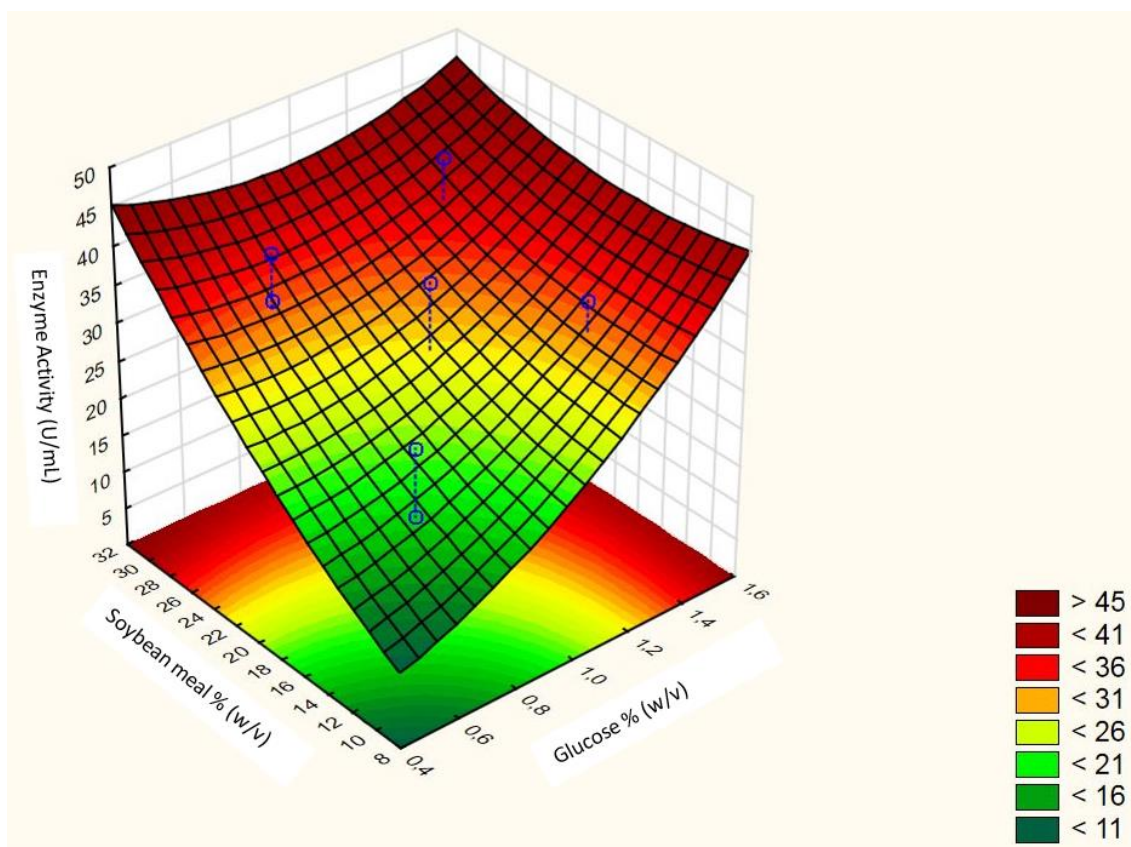
MO-04b between 48h



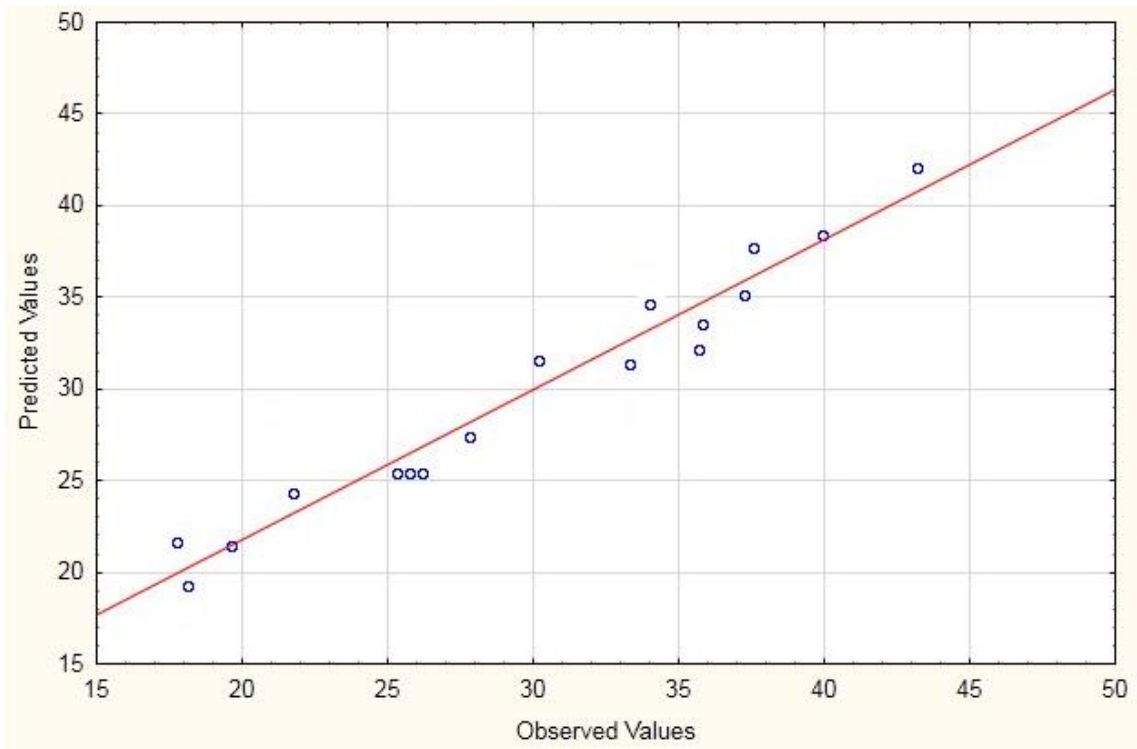
**Figure 4.** Response surface of an extracellular protease activity with respect to the interaction of the glucose and yeast extract



**Figure 5.** Response surface of an extracellular protease activity with respect to the interaction of the yeast extract and soybean meal



**Figure 6.** Response surface of an extracellular protease activity with respect to the interaction of the soybean meal and glucose



**Figure 7.** Interaction between the predicted and observed values