

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease  
produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10**

Roberta Cruz Silveira Thys  
Engenheira de Alimentos -UFRGS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre  
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil  
Janeiro, 2004

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho a todas aquelas pessoas que acreditaram em mim, em especial:

- Ao professor Dr. Adriano Brandelli, pela sua orientação e amizade;
- À professora Dr. Simone Flôres, pela sua ajuda com o experimento fatorial;
- À professora Dirce, do Departamento de Química Inorgânica, pela ajuda nos experimentos de espectroscopia;
- Aos colegas de laboratório, Delmar, Bacana, Amanda, Geruza, Ana, Fabi, Pati, Jaque , pela ajuda e amizade e especialmente à bolsista Samanta, pela força e auxílio nos momentos mais difíceis;
- À colega e amiga de sempre, Florencia Cladera, por tudo que tem feito por mim até hoje;
- Aos meus familiares que sempre acreditaram que o impossível pode se tornar possível, especialmente meus irmãos Inha e Caquinho e minha avó Maria;
- A Guilherme Muccillo, pela força, compreensão e incentivo;
- E, finalmente, aos meus pais, que durante estes dois anos agüentaram, minhas inseguranças e desabafos e, junto comigo, compartilham esta grande vitória. Obrigada por tudo!

# **Produção, Caracterização, Purificação e Aplicação de uma Protease Produzida pelo Microrganismo *Microbacterium* sp. kr10.**<sup>1</sup>

Autor: Roberta Cruz Silveira Thys

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

## **Resumo**

O uso de enzimas como agentes de modificação das propriedades funcionais de proteínas tem se tornado bastante difundido na indústria de alimentos. As proteases, apresentam inúmeras vantagens, principalmente, devido a sua atividade em baixas concentrações e a sua ausência de toxicidade, que faz com que se elimine a necessidade da sua remoção do produto final. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas de produção da protease de *Microbacterium* sp. kr10, caracterizar e purificar parcialmente a enzima, assim como verificar a sua utilização como agente de modificação das propriedades funcionais da proteína de soja. Através da metodologia de superfície de resposta foram determinadas as condições ótimas de produção da protease, pH de 7,0, temperatura de 25°C e 12,5 g L<sup>-1</sup> de farinha de soja (p/v). O padrão proteolítico da enzima tanto no extrato cru quanto na parcialmente purificada indicam que esta é uma metaloprotease, com pH e temperaturas ótimos nas faixas de 6,5 a 7,5, e 45 a 55°C, respectivamente. A atividade enzimática foi totalmente inibida por EDTA, fenantrolina, HgCl<sub>2</sub> e CuCl<sub>2</sub> e parcialmente inibida por ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> e SnCl<sub>2</sub>. A enzima foi parcialmente purificada através de cromatografia de gel filtração e troca iônica resultando num fator de purificação de 250. Um aumento gradativo do grau de hidrólise da proteína de soja foi observado à medida que se aumentou a razão enzima/substrato utilizada, assim como a redução da formação de espuma e o aumento da capacidade emulsificante de uma solução composta pelo hidrolisado de soja e óleo de soja, mesmo sob condições de alta temperatura e alta concentração de sal. Desta forma, esta protease apresenta potencial para aplicação como agente de modificação proteica de proteína de soja isolada.

1 / Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Microbiologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (100p.). Janeiro, 2004.

# **Production, Characterization, Purification and Application of a Protease Produced by *Microbacterium* sp. Kr10<sup>1</sup>**

Author: Roberta Cruz Silveira Thys  
Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

## **Abstract**

The expanded use of enzymes to modify protein functional properties has great promise for the food industry. The major advantages of using proteases include their specificity, their effectiveness at low concentrations and their general safety, thus eliminating the necessity for removing them from finished products. The objective of this work was to find the better conditions for protease production by *Microbacterium* sp.kr10, to characterize, to purify and verify its use as soya protein modification agent. The Response Surface Methodology was used for select optimum conditions for protease production, that were pH of 7.0, temperature of 25°C and 12.5 g L<sup>-1</sup> of feather meal (w/v) as substrate. The proteolytic behavior of crude extract and partial purified protease indicates that this is a metalloprotease, with optimum activity at pH and temperature value between 6,5 to 7,5 and 45 to 55°C, respectively. The enzymatic activity was totally inhibited by EDTA, phenanthroline, HgCl<sub>2</sub> and CuCl<sub>2</sub> and partially inhibited by ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> and SnCl<sub>2</sub>. The protease was partially purified by gel filtration and ion exchange chromatography and the purification factor was 250. The gradative increase of hydrolysis degree was observed when the enzyme to substrate ratio (E/S) was increased, as well the reduction of foaming and the improvement of emulsifying properties of soya hidrolisate and soya/oil solution. The same result was obtained at high temperatures and high salt concentration. Therefore, this protease presented potential for the use as modification agent of isolate soy protein products.

1/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology (Food Microbiology), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (100p.). January, 2004.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS .....	4
2.2 FONTES DE OBTENÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS .....	6
2.3 PRODUÇÃO DE PROTEASES BACTERIANAS .....	8
2.4 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) .....	11
2.5 INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FATORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES .....	12
2.5.1 <i>pH</i> .....	12
2.5.2 <i>Temperatura</i> .....	14
2.5.3 <i>Agentes inibidores de proteases</i> .....	15
2.6 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES BACTERIANAS .....	16
2.7 MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR HIDRÓLISE.....	19
2.8 USO DE PROTEASE BACTERIANA COMO AGENTE DE MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 MICRORGANISMO SELECIONADO .....	23
3.1.1 <i>Identificação do microrganismo</i> .....	23
3.1.2 <i>Verificação da atividade proteolítica do microrganismo selecionado</i> .....	24
3.1.3 <i>Manutenção e estoque do microrganismo</i> .....	24
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE NO EXTRATO CRU .....	24
3.2.1 <i>Meio de Cultura</i> .....	24
3.2.2 <i>Condições do Cultivo e Produção da enzima</i> .....	25
3.2.3 <i>Determinação da metodologia da análise enzimática</i> .....	25
3.2.4 <i>Determinação da especificidade da enzima ao substrato</i> .....	27
3.2.5 <i>Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática</i> .....	27
3.2.6 <i>Determinação do pH ótimo de atividade enzimática</i> .....	27
3.2.7 <i>Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática</i> .....	28
3.2.8 <i>Efeito de íons sobre a atividade enzimática</i> .....	28
3.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	29
3.3.1 <i>Meios de cultura</i> .....	29
3.3.2 <i>Seleção da melhor fonte de nutrientes</i> .....	29
3.3.2.1 <i>Condições do cultivo</i> .....	30
3.3.2.2 <i>Análise da produção da enzima</i> .....	31
3.3.3 <i>Determinação dos melhores valores de temperatura, pH e concentração de farinha de pena para a produção da enzima</i> .....	31
3.3.3.1 <i>Metodologia de superfície de resposta (MSR)/Desenho Experimental</i> .....	31
3.3.3.2 <i>Produção da Enzima</i> .....	35
3.3.4 <i>Contagem do número de células viáveis e produção enzimática nas condições ótimas determinadas</i> .....	35
3.3.5 <i>Efeito do aumento da concentração do inóculo na contagem de células viáveis e na produção enzimática</i> .....	36

3.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.....	37
3.4.1 <i>Precipitação fracionada com sulfato de amônio</i> .....	37
3.4.1.1 Determinação da proteína solúvel e da atividade enzimática das etapas da precipitação fracionada.....	38
3.4.1.2 Efeito de inibidores de protease sobre as enzimas precipitadas.....	38
3.4.2 <i>Purificação a partir do sobrenadante cru precipitado</i> .....	39
3.4.3 <i>Purificação a partir do extrato cru liofilizado</i> .....	40
3.4.3.1 Cromatografia de gel filtração.....	40
3.4.3.2 Cromatografia de troca iônica.....	41
3.4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	43
3.4.3.4 Determinação da presença dos íons $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ e $Mg^{2+}$ na protease parcialmente purificada.....	43
3.5 APLICAÇÃO DA ENZIMA PRODUZIDA COMO AGENTE DE MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA.....	44
3.5.1 <i>Obtenção da enzima</i> .....	44
3.5.2 <i>Avaliação do potencial proteolítico</i> .....	44
3.5.3 <i>Avaliação da utilização da enzima como agente modificador das propriedades funcionais da proteína isolada de soja</i> .....	44
3.5.3.1 Determinação do grau de hidrólise gerado.....	45
3.5.3.2 Avaliação da capacidade de formação de espuma.....	45
3.5.3.3 Avaliação da capacidade emulsificante.....	46
3.5.3.3.1 Avaliação da capacidade emulsificante em condições de alta concentração de sal.....	46
3.5.3.3.2 Avaliação da capacidade emulsificante em condições ácidas.....	47
3.5.3.3.3 Avaliação da capacidade emulsificante sob altas temperaturas.....	47
3.5.3.4 Avaliação da capacidade de absorção de óleo.....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	48
4.1.1 <i>Morfologia colonial e celular do microrganismo</i> .....	48
4.1.2 <i>Testes bioquímicos</i> .....	48
4.1.3 <i>Atividade proteolítica do microrganismo</i> .....	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE NO EXTRATO CRU E PARCIALMENTE PURIFICADA.....	51
4.2.1 <i>Metodologia de análise enzimática utilizada</i> .....	51
4.2.2 <i>Atividade enzimática em diferentes substratos</i> .....	51
4.2.3 <i>Temperatura ótima de atividade enzimática</i> .....	52
4.2.4 <i>pH ótimo de atividade enzimática</i> .....	54
4.2.5 <i>Efeito de inibidores na atividade enzimática</i> .....	56
4.2.6 <i>Efeito de íons sobre a atividade enzimática</i> .....	57
4.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	60
4.3.1 <i>Seleção do meio de cultivo</i> .....	60

4.3.2 Otimização das condições (pH, temperatura e concentração de farinha de pena) para a produção da protease através da metodologia de superfície de resposta (MSR) .....	63
4.3.3 Curva de crescimento e produção da enzima nas condições ótimas de crescimento.....	71
4.3.4 Efeito do aumento da concentração do inóculo na produção da enzima.....	72
4.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.....	73
4.4.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio .....	73
4.4.1.1 Perfil das proteases precipitadas fracionadamente .....	74
4.4.2 Purificação parcial a partir do sobrenadante cru precipitado.....	76
4.4.3 Purificação a partir do extrato cru liofilizado.....	77
4.4.3.1 Cromatografia de gel filtração.....	78
4.4.3.2 Cromatografia de troca iônica.....	79
4.4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	83
4.4.3.4 Determinação da presença dos íons $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ e $Mg^{2+}$ .....	84
4.5 APLICAÇÃO DA PROTEASE COMO AGENTE DE MODIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE SOJA....	85
4.5.1 Avaliação do potencial proteolítico da enzima .....	85
4.5.2 Determinação do grau de hidrólise da proteína de soja.....	86
4.5.3 Avaliação da capacidade de formação de espuma.....	87
4.5.4 Avaliação da capacidade emulsificante .....	88
4.5.5 Avaliação da capacidade de absorção de óleo.....	92
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>101</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>103</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Halo de proteólise apresentado pelo microrganismo em placa de agar leite. ....	50
FIGURA 2: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade enzimática no extrato cru em meio CFP, incubado a 30°C, pH 6.0 a 125 rpm. ....	53
FIGURA 3: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. ....	53
FIGURA 4 Efeito da variação do pH sobre a atividade proteolítica presente no extrato cru. ....	55
FIGURA 5: Efeito da variação do pH sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. ....	55
FIGURA 6: Efeito de substâncias químicas na atividade proteolítica presente no sobrenadante do cultivo do microrganismo (extrato cru), em meio CFP, incubado à 30°C, pH 6.0 a 125 rpm. . ....	59
FIGURA 7: Efeito de substâncias químicas sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. ....	59
FIGURA 8: Gráfico de pareto dos efeitos estimados padronizados das diferentes variáveis testadas no prospecto do experimento de produção da protease por <i>Microbacterium</i> sp. ....	64
FIGURA 9: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e pH, tendo a variável farinha de pena no ponto central, após 4 dias de incubação. ....	67
FIGURA 10: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e concentração de farinha de pena, tendo o pH inicial no ponto central, após 4 dias de incubação. ....	68
FIGURA 11: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis pH inicial e concentração de farinha de pena, tendo a variável temperatura no ponto central, após 4 dias de incubação. ....	68
FIGURA 12: Produção de metaloprotease durante o crescimento de <i>Microbacterium</i> sp em caldo farinha de pena ....	71
FIGURA 13: Produção de metaloprotease durante o crescimento de <i>Microbacterium</i> sp kr10 em caldo farinha de pena (CFP), pH 7.0 e 25°C. ....	72
FIGURA 14: Quantificação do teor de proteína solúvel e do teor de enzima de cada etapa da precipitação fracionada. ....	74
FIGURA 15: Valores de absorvância e de atividade enzimática para as frações obtidas da cromatografia de gel filtração. ....	79
FIGURA 16: Absorvância e atividade enzimática das frações coletadas da coluna de troca iônica (Q-Sepharose). ....	81



FIGURA 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações retiradas da coluna de cromatografia de troca iônica (3) e do sobrenadante do cultivo (2). .....	83
FIGURA 18: Grau de hidrólise da proteína de soja tratada com diferentes proporções da enzima produzida. ....	86
FIGURA 19: Porcentagem da variação de volume na proveta dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima produzida após agitação. ....	88
FIGURA 20: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima produzida. ....	89
FIGURA 21: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H <sub>2</sub> ) tratado termicamente .....	90
FIGURA 22: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H <sub>2</sub> ) sob condições de alta concentração de sal. ....	90
FIGURA 23: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H <sub>2</sub> ) sob condições ácidas. ....	91
FIGURA 24: Capacidade de absorção de óleo da mistura formada pelos hidrolisados sob diferentes graus de hidrólise e óleo de soja, após 1 e 15 horas. 92	

## RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.....	8
TABELA 2: Principais inibidores específicos de proteases.....	16
TABELA 3: Diferenças entre as metodologias testadas.....	26
TABELA 4: Valores reais e codificados das variáveis independentes em diferentes níveis para o experimento fatorial completo $2^3$ .....	32
TABELA 5: Ensaio realizado no planejamento fatorial em estrela com três pontos centrais.....	33
TABELA 6: Testes bioquímicos do microrganismo em estudo.....	49
TABELA 7: Atividade da enzima sobre diferentes substratos.....	52
TABELA 8: Efeito de inibidores específicos na atividade enzimática da protease no extrato cru e parcialmente purificada.....	57
TABELA 9: Efeito do íon $Zn^{+2}$ em diferentes concentrações sobre a atividade enzimática.....	60
TABELA 10: Efeito das várias fontes de nitrogênio testadas na produção de protease por <i>Microbacterium</i> sp. após 24 e 48 horas a 30°C, sob agitação.....	62
TABELA 11: Desenho experimental e resultados do fatorial completo $2^3$ .....	65
TABELA 12: Coeficientes estimados por múltiplas regressões lineares (significância dos coeficientes de regressão).....	66
TABELA 13. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.....	67
TABELA 14: Atividade enzimática relativa (%) das enzimas precipitadas nas diferentes etapas da precipitação fracionada frente a inibidores específicos.....	75
TABELA 15: Teores de enzima, proteína solúvel e fatores de recuperação e purificação em cada etapa do sistema de purificação.....	76
TABELA 16: Teores de enzima, proteína solúvel e fatores de recuperação e purificação em cada etapa do sistema de purificação.....	82
TABELA 17: Atividade proteolítica da enzima produzida frente as enzimas comerciais tripsina e papaína.....	85

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AL: Ágar Leite

AN: Agar nutriente

BHI: Infusão de cérebro e coração

CFP: Caldo Farinha de Pena

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

HCl: Ácido clorídrico

MMM: Meio Mínimo Mineral

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

NaOH: Hidróxido de Sódio

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila

TCA: Ácido tricloroacético

UFC: Unidades formadoras de colônias

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço da biotecnologia tem imprimido expressivo impacto nos diversos segmentos industriais. Este processo iniciou com o advento dos antibióticos e, posteriormente, com a fabricação de outros produtos por processos fermentativos, envolvendo principalmente a indústria de alimentos.

Estima-se que 15% dos alimentos consumidos nos países industrializados são supridos por via biotecnológica. O setor de enzimas, cujo mercado mundial apresenta valor comercial superior a um bilhão de dólares anuais, com taxa de crescimento entre 8 e 10%, é o que mais tem contribuído para a indústria de alimentos, constituindo esta indústria, o mercado mais importante para as enzimas (Canto & Menezes, 1995).

O uso de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas têm se tornado bastante difundido na indústria de alimentos. As principais enzimas utilizadas para este fim são as proteases, que ocupam uma posição de destaque devido às suas aplicações comerciais e às inúmeras vantagens que apresentam em relação aos demais agentes utilizados

para este fim. Estas enzimas representam, atualmente, 60% do mercado mundial de enzimas, sendo 40% deste mercado referente às proteases de origem microbiana (Johnvesly & Naik, 2001).

As proteases bacterianas apresentam inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia e química. No segmento das indústrias de alimentação, são o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (Rao et al., 1998).

A hidrólise protéica é uma tecnologia bastante desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e ampliar o leque de aplicações para materiais de utilização pouco convencional, subprodutos e resíduos da indústria de alimentos.

Através da hidrólise de proteínas consegue-se modificar as propriedades físicas, químicas, biológicas e imunológicas das proteínas, o que resulta no incremento das características nutricionais dos produtos obtidos, assim como, da sua vida de prateleira, textura, solubilidade, capacidade de formação de espuma, de coagulação e de emulsificação e ainda, no auxílio da remoção de odores ou sabores desagradáveis e substâncias tóxicas ou antinutricionais (Soares et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi produzir, caracterizar e purificar a protease de *Microbacterium* sp. kr10, para sua posterior aplicação como agente de modificação protéica, através da hidrólise da proteína de soja.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Enzimas Proteolíticas**

As enzimas proteolíticas são divididas em exo e endopeptidases, sendo a sua principal função a catálise da clivagem de ligações peptídicas de proteínas (Wiseman, 1991). Estudos avançados demonstram que as proteases conduzem modificações seletivas e específicas em proteínas (Rao et al.,1998). Na maioria dos casos, a proteólise é direcionada e limitada à clivagem de ligações peptídicas específicas da proteína (Beynon & Bond, 1996).

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB), as enzimas proteolíticas se classificam em seis famílias de acordo com o tamanho molecular, com as suas propriedades elétricas e ainda, de acordo com a sua especificidade ao substrato. São elas: serina protease I (ex. tripsina, elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), aspartil protease (ex., pepsina, quimosina), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex.termolisina). Serina proteases, assim como as metalo proteases se subdividem em duas famílias, as proteases de mamíferos e as proteases microbianas. Cada

família de proteases possui resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (Beynon & Bond, 1996).

As proteases executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes. Estas proteínas possuem um papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, a coagulação do sangue, o crescimento e migração celular, crescimento de tumores e metástases, ativação de zimogênios e o transporte e secreção de proteínas através da membrana. De maneira geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para conseqüente absorção pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (Rao et al.,1998).

Estas enzimas constituem mais de 60% do mercado de enzimas utilizadas no segmento industrial (Johnvesly & Naik, 2001). No segmento das indústrias de alimentação, são reconhecidamente, o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (Rao et al.,1998).



## 2.2 Fontes de obtenção de enzimas proteolíticas

As plantas, os animais e os microrganismos são as principais fontes de obtenção de enzimas proteolíticas. As proteases originárias de plantas são dependentes de alguns fatores, como a disponibilidade de uma grande área para o cultivo e as condições climáticas para o ótimo crescimento. Além disto, o processo de obtenção de proteases por plantas é bastante demorado, devido ao período de espera para o total desenvolvimento de uma planta sadia. Algumas proteases originárias de plantas são papaína, bromelaína, queratinases e ficinas (Rao et al., 1998).

As proteases originárias de animais são preparadas em grandes quantidades. Sua produção geralmente depende da disponibilidade de gado para o abate, o que acaba tornando o processo bastante dispendioso. As principais proteases de origem animal são tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e quimosina (Rao et al., 1998).

As proteases de origem microbiana representam a principal fonte (40% do total das proteases comercializadas) devido à sua ampla diversidade bioquímica. De maneira geral, os microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço requerido para seu cultivo (Rao et al., 1998) e à grande variedade de atividades catalíticas que dispõem. Além disso, as proteases microbianas são em geral mais

estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1991).

Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo e obtenção da enzima (Bernardi et al., 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com freqüência termoestáveis (Wiseman, 1991).

A Tabela 1 apresenta algumas das proteases produzidas por plantas, animais e microrganismos e suas aplicações industriais.

TABELA 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.

Fonte de Obtenção	Enzima	Aplicação Industrial
Animal (Ovino, bovino e suíno)	Tripsina, quimotripsina, renina, etc.	Indústria farmacêutica e de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas, como do soro de queijo e a síntese de peptídeos, etc.
Vegetal ( <i>Papaya latex</i> , <i>Ficus carica</i> e <i>Bromus spp.</i> )	Papaína, Ficina, bromelaína, etc.	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos e processamento de alimentos para animais e humanos, incluindo o amaciamento da carne
Microrganismos ( <i>Aspergillus niger</i> )		Queijos, carnes, pescado, cereais, frutas, bebidas e panificação.
Microrganismos ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise protéica, no processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
Microrganismos ( <i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i> )		Manufatura de queijo (coagulação de leite).
Microrganismos ( <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i> )	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos
Microrganismos ( <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i> )	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

FONTE: Wiseman (1991).

### 2.3 Produção de proteases bacterianas

A grande maioria das proteases comerciais de origem bacteriana, geralmente neutras e alcalinas, é produzida por organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, principalmente pela sua facilidade de adaptação e crescimento tanto em meios complexos, quanto em meios sintéticos (Takami et al., 1989). De

uma maneira geral, a linhagem selecionada deve possuir algumas características, como: desenvolver-se em meio simples e barato, produzir o mínimo possível de metabólitos secundários, como os antibióticos, por exemplo, excretar a enzima de modo que esta seja facilmente separada e purificada, não conduzir a diferentes poluentes e ainda, não ser patogênica ou produzir compostos tóxicos (Scriban et al.,1985).

Para uma produção em escala industrial, outras propriedades são requeridas pelo microrganismo selecionado, tais como: a facilidade e rapidez de crescimento em fermentadores grandes e sem a necessidade de indutores, características fisiológicas estáveis e aceitabilidade pelas autoridades encarregadas de controlar alimentos e fármacos. Além disso, um alto grau de rendimento da enzima deve ser alcançado, de forma que esta seja facilmente purificada e concentrada (Wiseman, 1991).

Tradicionalmente, as proteases microbianas eram produzidas por cultura em superfície, em fina camada de meio líquido ou de meio semi-sólido. Esta técnica ainda é utilizada para algumas produções, em particular para as proteases de *Aspergillus* e de *Mucor*, entretanto os controles de temperatura, aeração e umidade apresentam dificuldades e é por isso que as culturas submersas são, agora, preferíveis a culturas em superfície. As culturas em meio líquido profundo, agitado, são mais bem adaptadas aos diferentes controles por métodos modernos e reduzem os riscos de contaminação. Além disso, elas se prestam melhor às operações de extrapolação e otimização necessárias para a

passagem do fermentador-piloto de laboratório ao fermentador industrial (Scriban et al.,1985).

Os meios de cultura utilizados para o cultivo do microrganismo produtor da protease devem conter todos os elementos de uma forma adequada para a síntese do material celular e para a produção de metabólitos, quais sejam, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e os principais fatores de crescimento necessários à linhagem microbiana. Alguns fatores podem ser acrescentados para encurtar a fase de latência e freqüentemente sais minerais são acrescentados para suplementar o meio em nitrogênio. Faz-se necessário levar em conta a necessidade de indutor, as repressões possíveis por um composto do meio e a repressão catabólica produzida pela glicose, podendo-se controlar esta última através da troca da glicose por outro glicídio lentamente fermentescível ou pelo amido parcialmente hidrolisado (Crueger & Crueger,1993; Scriban et al.,1985).

Em pesquisas laboratoriais com microrganismos é possível a utilização de produtos químicos definidos puros para a obtenção de meios de cultura, entretanto, em escala industrial, se utilizam, freqüentemente, por motivos econômicos, substratos complexos. Em muitos casos os ingredientes do meio são subprodutos (resíduos) de outras indústrias, sendo extremamente variados em composição (Crueger & Crueger, 1993). Isto se deve, principalmente, ao fato de que as matérias-primas perfazem 60 a 80% do preço de custo em uma produção de enzimas. Deste modo, a composição do meio deve, ser definida com cuidado e muitos trabalhos de pesquisa têm por objetivo a substituição dos compostos caros

por outros disponíveis em maior quantidade e de preço mais baixo. A composição do meio também deve levar em conta as etapas da fase de extração (Scriban et al., 1985).

#### **2.4 Metodologia de superfície de resposta (MSR)**

Um meio de cultivo otimamente equilibrado é obrigatório para que se consiga a máxima produção do metabólito desejado. Neste intuito, a otimização dos meios através de métodos estatísticos programáveis, torna-se uma importante ferramenta de trabalho (Crueger & Crueger, 1993).

A otimização do meio de cultivo pelo método clássico, envolvendo a mudança de uma variável independente (pH, nutriente, temperatura, etc.) e a fixação das demais em um determinado nível, é extremamente demorada e dispendiosa para um grande número de variáveis (Adinarayana et al., 2003), assim como pode resultar em conclusões falsas (Oh et al., 1995).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em uma coleção de técnicas estatísticas para desenhos experimentais, modelos Building, validação de efeitos dos fatores envolvidos e, acima de tudo, a pesquisa das condições ótimas dos fatores para as respostas desejadas (Li et al., 2001). Esta metodologia foi aplicada com êxito em diversas áreas da biotecnologia, como no aumento da produção de nisina e pediocina por *Lactococcus lactis* (Guerra & Pastrana, 2001), na otimização da produção de neomicina (Adinarayana et al.,

2003), na produção de enzimas (Bocchini et al., 2002) e na produção de bacteriocinas (Li et al., 2001).

Em relação à produção de protease, esta metodologia foi utilizada, por exemplo, para espécies de *Bacillus* (Beg et al., 2003; Puri et al., 2001) já que esta é fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de outros fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (Nehete et al., 1985, Varela et al., 1996; Kole et al., 1988; Johnvesly & Naik, 2001).

## **2.5 Influência de diversos fatores na atividade enzimática de proteases**

### **2.5.1 pH**

Todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração de  $H^+$  do meio. Existe uma zona de pH para qual a atividade enzimática é máxima. Usualmente cada enzima possui um pH ótimo porque, como outras proteínas, estas possuem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácido da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Isto pode levar a uma troca na velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ ), uma troca na afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$ ) ou uma alteração na estabilidade da enzima, sendo esta dependente, exclusivamente, do tempo em que a enzima se mantém exposta ao pH desfavorável. De forma similar, os grupos

ionizáveis do substrato podem ser afetados pelo pH, já que possuem estados de ionização diferentes, de acordo com o pH, influenciando a formação do complexo enzima-substrato.

Em geral, todos os efeitos ocorrem simultaneamente, assim como podem ser produzidos de forma desejada. A presença de uma grande amplitude da faixa de pH ótimo se deve ao fato do substrato em questão ser não-ionizável (Wiseman, 1991).

De acordo com a faixa de pH em que a atividade enzimática é máxima, as proteases são divididas em ácidas, neutras e alcalinas. As proteases bacterianas neutras são produzidas principalmente por *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. magaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*, *A. sojae* e *Pericularia oryzae* (Crueger & Crueger, 1993) e são ativas em uma faixa de pH que varia de 5 a 8, possuindo uma baixa termoresistência. De acordo com a natureza funcional no sítio ativo, algumas são classificadas como metalo proteases, e requerem íons metálicos divalentes para sua atividade enzimática, enquanto outras são pertencentes à classe das serina proteases, que tem como característica não apresentar nenhuma sensibilidade a agentes quelantes (Rao et al.,1998)

As proteases bacterianas alcalinas são caracterizadas pela sua alta atividade em pH alcalino, em torno de 10, pela sua alta especificidade ao substrato, pela sua resistência a altas temperaturas e pela sua capacidade de



resistir à ambientes com baixa atividade de água (Takami et al.,1989). As proteases produzidas por *Bacillus* sp. são o grupo mais importante (Anwar & Saleemuddin, 1997). Normalmente, este tipo de protease é utilizado para a indústria química, mais especificamente para a fabricação de detergentes (Rao et al., 1998).

As proteases ácidas, que possuem uma faixa ótima de pH entre 2 e 4, são produzidas principalmente por fungos e utilizadas principalmente na fabricação de queijos (Crueger & Crueger, 1993).

### **2.5.2 Temperatura**

De maneira análoga ao pH, existe uma zona de temperatura para qual a atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é resultado de duas tendências antagônicas. De um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e de outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A desnaturação da proteína leva mais tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade de reação se produza de maneira instantânea. Desta forma, a uma temperatura determinada, a atividade real, medida em unidades, irá diminuindo, à medida que se aumenta o tempo de incubação (Trevan et al.,1990 e Scriban et al., 1985).

Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a

uma conformação desprovida de atividade. De uma maneira geral, as baixas temperaturas não têm efeito desnaturante, entretanto, a repetição de transições sólido-líquido, congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas de atividade. Por outro lado, nos casos de tratamento térmico moderado de um produto alimentício, pode ocorrer, que a desnaturação da enzima não seja irreversível e que, no decorrer do tempo, a enzima possa se reativar, como observado entre as enzimas particularmente resistentes ao calor: peroxidases, lipoxigenases ou ainda a fosfatase alcalina do leite (Scriban et al.,1985).

### **2.5.3 Agentes inibidores de proteases**

Inibidor enzimático de proteases é todo o componente que reduz a medida da taxa de hidrólise de um dado substrato (Beynon & Bond, 1996). São conhecidos quatro tipos de inibição, uma irreversível e três tipos de inibição reversível. A inibição irreversível ocorre quando as moléculas de inibidor combinam-se, irreversivelmente, com a enzima, modificando quimicamente sua estrutura e anulando ou reduzindo muito sua atividade, como por exemplo, o DFP (di-isopropil flúor fosfato), que inibe serina proteases ou como os metais cromo e mercúrio, que interagem com os grupos -SH do sítio ativo enzimático. Por outro lado, as inibições reversíveis podem ser do tipo competitiva, que pode ser reduzida com o aumento da concentração de substrato, do tipo não competitiva, que não se reduz com o aumento deste e a inibição por excesso de substrato oriundo da formação de complexos que não conduz ao produto final. Este último

tipo pode ser diminuído através da diminuição da concentração de substrato utilizada (Wiseman, 1991).

Existem inúmeras substâncias que possuem propriedades inibitórias, como por exemplo as  $\alpha$ -macroglobulinas, os aldeídos peptídicos (leupeptina e antipaína), as clorometil-peptídeo-cetonas (TLCK, tosyl-lisina-clorometil-cetona), assim como os inibidores específicos de serina proteases, cisteína proteases, metalo proteases e aspartil proteases. Os principais representantes destes inibidores específicos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Principais inibidores específicos de proteases.

Tipo de Protease	Inibidores
Serina	Organofosfatos (DFP, di-isopropil-fosfo-fluoridrato), sulfonil-fluorido (PMSF), ácidos peptídicos borônicos, inibidores protéicos (aprotinina) e inibidores seletivos
Cisteína	Diazometanos peptídicos (Z-Phe-Arg-CHN <sub>2</sub> ), peptídeos epóxidos (E-64), cistatinas, inibidores seletivos
Metallo	Inibidores protéicos (TIMP), quelantes metálicos (EDTA e EGTA e 1-10-Fenantrolina)
Aspartil	Pepsatina A

FONTE: Beynon & Bond (1996) e Chaia et al. (2000)

## 2.6 Recuperação e purificação de proteases bacterianas

Para que se obtenha um bom esquema de purificação é necessário um conhecimento prévio das propriedades gerais da protease de interesse, especialmente os relacionados com a sua estabilidade, como a sensibilidade a

fatores como pH, temperatura, detergentes e solventes orgânicos e a influência de procedimentos específicos que podem ser usados e que devem ser evitados (Beynon & Bond, 1996).

A primeira consideração a fazer quando se inicia um processo de recuperação e purificação de um metabólito celular é a sua localização, que pode ser extracelular, não necessitando de um processo de extração, intracelular ou ainda ligada à membrana. A maioria das proteases bacterianas é extracelular, embora exista um considerável número de proteases intracelulares (Trevan et al., 1990).

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

precipitada pode ser ressuspendida em um pequeno volume de líquido, obtendo desta maneira a concentração, além da purificação. A purificação com sulfato de amônio é a mais utilizada, pois é um procedimento simples e barato que produz graus consideráveis de recuperação e purificação, além do fato de que altas concentrações deste sal podem aumentar consideravelmente a estabilidade de muitas enzimas (Trevan et al., 1990).

As etapas subseqüentes de um processo de purificação, normalmente são realizadas através de processos de cromatografia em coluna e consistem nas etapas mais caras deste processo (Crueger & Crueger, 1993). Estes processos podem ser realizados através de cromatografia de troca iônica, com a utilização de um gradiente linear de sal para eluição, cromatografia de gel filtração e ainda, cromatografia de interação hidrofóbica. Muitas proteases podem e são purificadas com uma combinação destas etapas convencionais (Beynon & Bond, 1996).

Secades & Guijarro (1999) purificaram, de maneira rápida e simples, uma protease extracelular de *Yersinia ruckeri* através de etapas de centrifugação, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. O peso molecular da protease purificada foi de 47 kDa.

Um processo mais complexo foi utilizado por Caldas et al. (2001) para a purificação da protease extracelular de 60 kDa de *Xenorhabdus nematophila*. Tal processo continha passos de concentração por ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose, com um gradiente linear de 0 a 1M de NaCl,

cromatografia de gel filtração, com objetivo de retirar o NaCl adicionado, cromatografia de troca iônica em Q- Sepharose, com gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl e finalizando com cromatografia de troca iônica em Mono-Q e um gradiente de 0,35 a 0,45 M de NaCl.

Tomaschová et al. (1998) purificaram, através de um procedimento alternativo, a protease extracelular de *Brevibacterium linens*. As etapas utilizadas foram de centrifugação, concentração por ultrafiltração, secagem em *spray-drier*, e cromatografia de troca iônica em uma DEAE-Sepharose CL-6B, com um gradiente linear de 0 a 0,5M de NaCl.

## **2.7 Modificação de proteínas por hidrólise**

Nos últimos anos notou-se uma carência mundial crescente de proteínas, na maioria dos casos em países em desenvolvimento. Uma das principais alternativas para solucionar este problema é o desenvolvimento de novas fontes alimentares ricas em proteínas através do aproveitamento de materiais tradicionais (Soares et al., 1998).

Grande parte das propriedades características das proteínas (solubilidade, atividade emulsificante, capacidade de retenção de água e gordura e elasticidade) pode se perder ou se reduzir muito no decorrer do processamento dos alimentos. Estas perdas são, em geral, muito importantes devido ao fato de que muitos alimentos requerem proteínas com um alto grau de funcionalidade (Wiseman, 1991).

Uma alternativa para contornar este problema consiste na hidrólise protéica, que modifica as propriedades físicas, químicas, biológicas e imunológicas das proteínas e pode ser gerada por enzimas proteolíticas (Cordle, 1994). Através dela pode-se conferir textura à proteína, aumentar sua solubilidade, alterar capacidade espumante, de coagulação e de emulsificação, evitar interações indesejáveis, além de remover odores ou sabores desagradáveis e substâncias tóxicas ou antinutricionais (Soares et al., 1998).

As proteínas hidrolisadas possuem alta funcionalidade, digestibilidade e são facilmente absorvidas pelo organismo, estando prontamente disponíveis no alimento que as contém (Webb, 1990).

Além disso, a modificação de proteínas através da hidrólise é uma tecnologia bastante desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e ampliar o leque de aplicações para materiais de utilização pouco convencionais, como subprodutos e resíduos da indústria alimentícia (Donald et al., 1994).

Guerard et al. (2002) utilizou a hidrólise enzimática, através de protease comercial, para a produção de um hidrolisado de resíduo de atum, com o objetivo de solubilizá-lo para sua utilização como fonte protéica em rações animais.

## **2.8 Uso de protease bacteriana como agente de modificação de proteínas**

O extenso uso de enzimas proteolíticas para modificar as propriedades funcionais de proteínas provém das inúmeras vantagens oferecidas por estas quando comparadas aos demais agentes utilizados para este fim. As principais vantagens oferecidas são: sua especificidade, seu ótimo efeito quando utilizada a baixas concentrações e sua ausência de toxicidade, que faz com que se elimine a necessidade de sua remoção do produto final. Além disso, a hidrólise enzimática de proteínas não reduz o seu valor nutricional, sendo as diferenças ocorridas durante o processo decorrentes da maior ou menor especificidade da enzima pelo substrato utilizado (Bernardi et al., 1991).

Lima et al. (1998) relataram o efeito da adição de proteases na massa do *cracker*. Os resultados demonstraram um aumento da solubilidade dos extratos protéicos das massas, após 12 horas de fermentação das esponjas, de 36 para 41%. Este aumento foi atribuído à proteólise do glúten, que também teve efeito benéfico para o processo à medida que diminuiu a consistência da massa do *cracker*, diminuindo seu tempo de mistura e de fermentação da esponja.

Uma das aplicações mais promissoras das proteases bacterianas é a hidrólise de proteína de soja, de maneira a torna-la solúvel para a sua utilização em bebidas refrescantes, principalmente nos países tropicais, agregando valor nutritivo a estas (Wiseman, 1991).



Bernardi et al. (1991) avaliaram a modificação enzimática de proteína de soja concentrada através da adição de proteases produzidas por *Bacillus subtilis*. Observou-se um aumento significativo na solubilidade da proteína (no pH neutro), na capacidade de formação de espuma, assim como na estabilidade desta. Geralmente, as proteases produzidas por *Bacillus subtilis* solubilizam mais proteínas e geram produtos que espumam mais do que aqueles obtidos pelo tratamento com enzimas fúngicas.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Microrganismo Selecionado**

O microrganismo selecionado para este estudo foi isolado por Riffel (2002), através de coletas de amostras em depósitos de penas em decomposição do setor de processamento de resíduos de uma indústria de aves (Avipal,S.A).

#### **3.1.1 Identificação do microrganismo**

O microrganismo kr10 foi identificado a partir do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossômico. O sequenciamento foi realizado na Universidade de Lausanne (Suíça), após a extração do DNA genômico e amplificação por PCR (Osborn et al.,1999). A sequência de 1229 pares de base foi submetida ao GenBank (n° acesso AY238940). O algoritmo BLAST foi usado para localizar seqüências homólogas no GenBank.

Para complementar a identificação da linhagem em estudo, foram realizados alguns testes morfológicos e bioquímicos, dentre eles: coloração de gram, coloração de esporos, prova da gelatinase, prova do amido, prova da catalase, prova de produção de H<sub>2</sub>S, redução de nitrato, prova do indol e prova da

utilização do citrato, segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath et al., 1984).

### **3.1.2 Verificação da atividade proteolítica do microrganismo selecionado**

Foi utilizado o teste de formação de halos em placas de ágar leite (AL), para a determinação da atividade proteolítica do microrganismo e verificação da funcionalidade da enzima produzida. Neste teste, a bactéria foi inoculada com agulha em uma placa de agar leite (AL) e incubada na temperatura de 30°C, durante 24 horas. Após este período, verificou-se a capacidade desta em formar halos de proteólise, característica esta, anteriormente observada por Riffel (2002).

### **3.1.3 Manutenção e estoque do microrganismo**

A bactéria selecionada foi mantida em placas de agar leite (AL), sendo um novo cultivo realizado a cada 7 dias. O estoque foi feito através do cultivo em meio caldo BHI (Gibco), contendo 20% de glicerol (v/v) e armazenado na temperatura de -20°C. A composição dos meios utilizados encontra-se no apêndice. O pH dos meios foi ajustado conforme necessário com NaOH (1N) ou HCl (1N). A descrição dos componentes dos meios de cultura encontra-se no apêndice.

## **3.2 Caracterização da protease no extrato cru**

### **3.2.1 Meio de Cultura**

O meio de cultura utilizado para a realização da caracterização da enzima produzida foi o caldo farinha de penas (CFP), que constitui-se em 50 ml

de meio mineral mínimo (MMM), contendo 10g/l de farinha de pena (fonte de N,C,S), com pH ajustado em 6.0. A descrição dos componentes dos meios de cultura encontra-se no apêndice.

A farinha de penas utilizada foi obtida através de cocção sob pressão e moagem, e fornecida pela empresa Bunge Alimentos S.A. (Esteio, Brasil) e fornecida em lotes de 1 kg.

### **3.2.2 Condições do Cultivo e Produção da enzima**

O inóculo foi feito a partir de raspagem da cultura bacteriana mantida em placa de agar leite (AL), na temperatura de 4°C, sob condições estéreis.

A produção da enzima foi conduzida por incubação durante 48 horas em uma estufa com agitação (125 rpm) na temperatura de 30°C.

Uma amostra do cultivo foi centrifugada em tubos de 1,5 ml por 10000g/10min para a separação da biomassa celular e das substâncias insolúveis do sobrenadante. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzima para as análises de atividade enzimática sob diferentes condições.

### **3.2.3 Determinação da metodologia da análise enzimática**

Foram testadas as metodologias de determinação de atividade enzimática descritas por Riffel (2002) e Secades & Guijarro (1999), de maneira a verificar aquela que melhor se adequasse à enzima em estudo. Em ambas metodologias, a azocaseína (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) é suspensa em

tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, em concentração de 10 mg/ml e o controle é preparado através da adição do ácido tricloroacético (TCA) no tempo zero da reação entre enzima e substrato.

As diferenças entre as metodologias estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3: Diferenças entre as metodologias testadas.

Metodologia	Volume Sobrenadante	Volume Substrato a 1% em tampão	T / tempo de incubação	Volume / Concentração de Ácido Tricloroacético	Centrifugação
Riffel (2002)	100 ul	100 ul	37°C/40'	800 ul/30%	10000g/5'
Secades & Guijarro (1999) *	120 ul	480 ul	30°C/30'	600 ul/10%	10000g/10'

\* A metodologia descrita por Secades & Guijarro (1999) ainda comporta 30 minutos/4°C entre a adição de TCA 10% e a centrifugação. Após esta, 800 ul do sobrenadante são adicionados a 200 ul de NaOH, 1.8N, para que seja feita a leitura da sua absorbância.

A leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu U-1100), no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade de enzimática foi definida como a quantidade necessária de enzima para aumentar a absorbância em 0,01 à 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste.

### **3.2.4 Determinação da especificidade da enzima ao substrato**

A metodologia utilizada para a determinação da atividade da enzima em diferentes substratos é a de Secades e Guijarro (1999), detalhada no item 3.2.3 e com a preparação da enzima descrita no item 3.2.2.

Os substratos testados foram azocaseína, azogelatina, azoqueratina, azoalbumina, caseína, albumina e gelatina, dissolvidos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, na concentração de 10mg/ml.

### **3.2.5 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática**

Para a determinação da temperatura ótima de atividade enzimática, a preparação enzimática, cuja obtenção foi descrita no item 3.2.2, foi submetida à metodologia descrita por Secades & Guijarro (1999), detalhada no item 3.2.3, sob diferentes temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas foram 37, 40, 45, 55 e 70°C.

### **3.2.6 Determinação do pH ótimo de atividade enzimática**

O ensaio para pH ótimo foi realizado da mesma maneira descrita no item anterior, entretanto sob diferentes tampões onde a azocaseína, substrato da reação enzimática, foi dissolvida.

Os tampões utilizados foram: citrato de sódio 0,1M (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio 0,1M (pH 6,0 e 6,5) e tris-HCl 0,1M (pH 7,0, 7,5 e 8,0).

### **3.2.7 Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática**

O efeito de inibidores de protease sobre a enzima em estudo foi medido através da mesma metodologia descrita no item 3.2.3, exceto pela utilização dos inibidores nas concentrações indicadas abaixo e pela pré-incubação do conjunto enzima e inibidor por 10 minutos na temperatura de incubação utilizada pela análise enzimática. Os inibidores utilizados foram: EDTA (5 mM), PMSF (2 mM), pepstatina (1 $\mu$ M) e 1,10 Fenantrolina (1 mM). Um controle foi realizado através da realização da atividade enzimática sem a adição de inibidores. A atividade de cada protease foi calculada em relação à atividade relativa do controle (100%).

### **3.2.8 Efeito de íons sobre a atividade enzimática**

O efeito de substâncias químicas sobre a atividade enzimática foi verificado através da metodologia de Secades e Guijarro (1999), descrita no item 3.2.3, exceto pela adição de substâncias químicas em determinadas concentrações no meio reacional e pela suas pré-incubações com a enzima testada por 10 minutos à temperatura ambiente.

As substâncias químicas testadas foram: CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> e CoCl<sub>2</sub> na concentração final no meio reacional de 5mM.

A preparação da fonte de enzima encontra-se descrita no item 3.2.2.

### **3.3 Determinação das condições ótimas de produção da enzima**

#### **3.3.1 Meios de cultura**

Os meios de cultura utilizados para a determinação das condições ótimas de produção da enzima proteolítica e avaliação do seu crescimento foram: Agar Nutriente (AN), Agar Leite (AL), Meio Mineral Mínimo (MMM) com variadas fontes de nutrientes, C e N, e Caldo BHI. A descrição dos componentes dos meios de cultura encontra-se no apêndice.

As fontes de nutrientes, C e N testadas foram: farinha de pena, caseína, gelatina, soro de queijo, peptona, proteína de soja e extrato de levedura. Ainda foi testada a suplementação da farinha de pena com lactose, sacarose e glicose. O pH dos meios foi ajustado conforme necessário com NaOH (1N) ou HCl (1N).

O soro de queijo utilizado foi cedido pela empresa Parmalat (Porto Alegre, Brasil) e fornecido em pacotes de 1kg. A empresa Bunge Alimentos S.A (Esteio, Brasil) foi fornecedora da proteína de soja utilizada neste trabalho.

#### **3.3.2 Seleção da melhor fonte de nutrientes**

Para a determinação da melhor fonte de nutrientes (C,N) para a produção da enzima foram utilizados Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de Meio Mineral Mínimo (MMM) e 10g/l da fonte de nutrientes a ser testada.



O pH de todos os testes foi ajustado para 6.0 com HCl, 1N ou NaOH, 1N.

### **3.3.2.1 Condições do cultivo**

Para a realização do pré-inóculo foi preparado um caldo de farinha de pena hidrolisada com NaOH, 0,4N, durante 2 horas, neutralizada com HCl, filtrada e esterilizada em autoclave a 121°C, durante 40 minutos. O pré-inóculo foi realizado a partir do cultivo bacteriano mantido em placa de agar leite (AL), sob refrigeração e deixado a 30°C/24 horas em estufa com agitação (125 rpm).

O inóculo foi feito a 1%(v/v) a partir do pré-inóculo com a absorbância à 600nm ajustada com Caldo Farinha de Pena hidrolisada estéril de maneira a se obter uma absorbância de 0,350, que corresponde à, aproximadamente,  $1 \times 10^6$  UFC/ml, conforme análise da determinação do número de células viáveis.

A contagem do número de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) em meio sólido foi realizada segundo método de Miles & Misra (1938), modificado por Riffel (2002). A suspensão bacteriana foi diluída em tubos de ensaio de  $10^{-1}$  até  $10^{-8}$  em 8.75 g/l de NaCl. As amostras de cada diluição foram homogeneizadas e aplicadas em três repetições de 20 ul por quadrante em placas de agar nutriente (AN). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa (De Leo) à temperatura de 37°C . A contagem das colônias foi feita em contador de colônias (Phoenix CP 608) na diluição onde as colônias apresentavam-se isoladas entre o limite de 30 e 300 colônias.

O experimento foi realizado em uma estufa com agitação (125 rpm), à 30°C, durante 48 horas. A temperatura de incubação é, conforme a literatura, a ótima de crescimento do microrganismo em questão (Imai et al., 1984).

### **3.3.2.2 Análise da produção da enzima**

A determinação da produção da enzima após o período de incubação de 48 horas foi realizada através da análise da atividade proteolítica do sobrenadante do cultivo (obtido conforme item 3.2.2), descrita por Secades & Guijarro(1999) (detelhada no item 3.2.3) e modificada através dos resultados de temperatura e pH ótimos de atividade enzimática, encontrados no item 3.2.5 e 3.2.6.

### **3.3.3 Determinação dos melhores valores de temperatura, pH e concentração de farinha de pena para a produção da enzima**

#### **3.3.3.1 Metodologia de superfície de resposta (MSR)/Desenho Experimental**

A metodologia de superfície de resposta foi escolhida para a determinação dos valores ótimos das variáveis pH, temperatura e concentração de farinha de pena que otimizassem a produção da enzima em estudo, em um curto período de tempo.

Para este experimento de três fatores (pH, temperatura e concentração de farinha de pena) foi feito um planejamento em estrela, baseado em um experimento fatorial completo  $2^3$ , que consistiu em oito pontos, com três

repetições no ponto central (fatores no nível zero) e seis pontos em estrela, que são pontos onde um dos fatores fica distanciado do ponto central de  $\pm \alpha$ , enquanto os outros dois fatores ficam posicionados no nível zero. A distância axial  $\alpha$  foi escolhida como um valor de 1,68, para fazer com que o desenho experimental fosse ortogonal.

Foram realizados 17 experimentos. Os valores reais e codificados das variáveis experimentais investigadas encontram-se apresentadas na Tabela 4 e os ensaios realizados encontram-se na Tabela 5.

TABELA 4: Valores reais e codificados das variáveis independentes em diferentes níveis para o experimento fatorial completo  $2^3$ .

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
pH	$x_1$	5.0	5.8	7.0	8.29	9.0
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	$x_2$	25	30	37	45	50
Concentração de Farinha de Pena (g/l)	$x_3$	0.0	5.0	12.5	20.0	25.0

TABELA 5: Ensaio realizados no planejamento fatorial em estrela com três pontos centrais.

Ensaio	Níveis Codificados		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1.68	0	0
13	0	-1.68	0
14	0	0	-1.68
15	+1.68	0	0
16	0	+1.68	0
17	0	0	+1.68

Os valores centrais (nível zero) escolhidos para o desenho experimental foram: concentração de farinha de pena 12,5 g/l, temperatura, 37°C e pH, 7.0. Os valores de atividade enzimática foram determinados após 2, 4 e 6 dias de incubação. Entretanto, a equação da regressão foi feita a partir dos valores obtidos no quarto dia, devido aos maiores valores de produção de enzima, detectados através das análises de atividade enzimática, segundo a metodologia descrita por Secades & Guijarro (1999) modificada e detalhada no item 3.3.2.2.

A equação da regressão foi desenvolvida através da codificação dos fatores testados de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado da  $i$ -ésima variável independente,  $X_i$  é o valor não codificado (natural) da  $i$ -ésima variável independente,  $X_0$  é o valor não codificado da  $i$ -ésima variável independente no ponto central e  $\Delta X_i$  é a variação entre estes dois valores. Para um sistema de três fatores, a equação modelo é a seguinte:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1X_2 + b_{13} X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

Onde:

- $Y$  é a resposta predita,
- $b_0$  a intersecção,
- $b_1 b_2 b_3$  são coeficientes lineares,
- $b_{11} b_{22} b_{33}$  são os coeficientes quadráticos e,
- $b_{12} b_{13} b_{23}$  são os coeficientes da interação.

Os resultados foram analisados pelo Modelo de Desenho Experimental do software Statistica (StatSoft). Este modelo permite a avaliação dos efeitos lineares, quadráticos e interativos das variáveis independentes na escolha da variável dependente (resposta).

Gráficos tridimensionais foram plotados de maneira a ilustrar os efeitos principais e interativos das variáveis independentes na produção da protease. Os

valores ótimos das variáveis selecionadas foram obtidos pela resolução da equação de regressão, assim como, pela análise dos gráficos plotados das superfícies de resposta (Barros Neto et al., 1995).

### **3.3.3.2 Produção da Enzima**

O experimento foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio mineral mínimo (MMM), com as variáveis independentes pH e concentração de farinha de pena ajustada conforme o ponto (ensaio) em questão.

O meio de cultivo foi inoculado com 1% do pré-inóculo ( $A_{600nm} \sim 0.350$ ), realizado conforme item 3.3.2.1 e incubado sob diferentes temperaturas para cada ponto do desenho experimental, em estufa com agitação de 125 rpm.

Após o período de incubação, o cultivo foi centrifugado, segundo o item 3.2.2 e foi feita a análise de atividade enzimática do sobrenadante deste, segundo a metodologia detalhada no item 3.3.2.2.

### **3.3.4 Contagem do número de células viáveis e produção enzimática nas condições ótimas determinadas**

O cultivo foi realizado em estufa com agitação (125 rpm) e os pontos de análise foram coletados em intervalos de 24 horas, durante o período de seis dias. O inóculo e o pré-inóculo foram realizados conforme descrito no item 3.3.2.1.

A análise de atividade enzimática foi realizada segundo a metodologia modificada de Secades & Guijarro (1999), descrita no item 3.3.2.2.

A contagem do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) em meio sólido foi realizada segundo método de Miles & Misra (1938), modificado por Riffel (2002), detalhada no item 3.2.2.1.

Os experimentos descritos acima foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em U/mL (produção de protease) e UFC/mL (número de células viáveis).

### **3.3.5 Efeito do aumento da concentração do inóculo na contagem de células viáveis e na produção enzimática**

Foi testado o efeito do aumento da concentração do inóculo na curva de crescimento da bactéria, assim como na produção da enzima, durante um período de 6 dias, nas condições ótimas de produção desta, determinadas no item anterior. Os pontos de análise foram coletados em um intervalo de 24 horas.

O pré-inóculo do experimento foi realizado segundo o item 3.3.2.1. A análise de atividade enzimática foi realizada segundo a metodologia modificada de Secades & Guijarro (1999), descrita no item 3.3.2.2. A contagem do número de células viáveis foi conduzida conforme demonstrado no item 3.3.4.

As concentrações de inóculo testadas foram de 1% e de 3%, com a absorbância destes ajustada à 600nm, segundo o item 3.3.2.1. Os experimentos

foram realizados simultaneamente e em duplicata. Os resultados foram expressos em U/ml (produção de protease) e UFC/mL (número de células viáveis).

### **3.4 Purificação da Enzima**

#### **3.4.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio**

A bactéria foi cultivada nas condições ótimas de produção da enzima, determinadas no item anterior, sendo o volume do cultivo de 50 mL. O pré-inóculo e o inóculo do cultivo foram realizados segundo descrito no item 3.3.2.1.

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada com o sobrenadante do cultivo, obtido através de uma centrifugação deste em centrífuga refrigerada (4°C), durante 10 minutos a 10000 g.

As faixas de saturação utilizadas foram: 0 a 20%, 20 a 40% e 40 a 80%. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração e agitação. As quantidades de sulfato de amônio pesadas para cada precipitação foram calculadas com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação, segundo Scopes (1992).

Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para cada etapa da precipitação fracionada, a suspensão formada foi centrifugada nas mesmas condições da centrifugação do cultivo, citada anteriormente, e o precipitado foi ressuspendido em 1mL de tampão fosfato 0,01M, pH 6.0. O



sobrenadante resultante foi conduzido para a etapa de precipitação posterior, até a última etapa (40 a 80%).

Amostras de cada etapa da precipitação foram armazenadas para posterior determinação da concentração de proteína solúvel e atividade enzimática.

#### **3.4.1.1 Determinação da proteína solúvel e da atividade enzimática das etapas da precipitação fracionada**

O material obtido em cada etapa foi submetido a análises para a determinação da concentração de proteína solúvel e da atividade enzimática. As metodologias utilizadas foram a de Lowry (1951) e de Sedades & Guijarro (1999) modificada, descrita no item 3.3.2.2, para as análises de proteína solúvel e de atividade proteolítica, respectivamente.

#### **3.4.1.2 Efeito de inibidores de protease sobre as enzimas precipitadas**

Para verificar se a atividade enzimática obtida nos diferentes precipitados (0-20, 20-40 e 40-80%) era devida à mesma enzima, anteriormente caracterizada (item 3.2) foram realizados testes de atividade enzimática na presença de inibidores de protease, conforme descrito no item 3.2.7. Os inibidores utilizados foram EDTA (inibidor de metaloprotease) e PMSF (inibidor de serina protease), que são, segundo Rao et.al, (1998), as duas famílias que uma protease neutra, como a caracterizada, pode pertencer.

### **3.4.2 Purificação a partir do sobrenadante cru precipitado**

Foi estipulado um processo rápido de purificação visando um bom fator de recuperação da protease, para que se obtivesse um perfil (caracterização) da enzima no seu estado parcialmente puro de modo a compará-lo com o perfil desta, quando presente no extrato cru.

Para isso, a bactéria foi cultivada nas condições ótimas de produção da enzima, determinadas no item 3.3, sendo o volume do cultivo de 50 ml. O pré-inoculo e o inoculo do cultivo foram realizados segundo descrito no item 3.3.2.1.

Após transcorrido o tempo ótimo determinado para a produção da enzima, o cultivo foi centrifugado sob refrigeração (4°C), durante 10 minutos, a 10000 g. O sobrenadante desta centrifugação foi então, submetido à precipitação com sulfato de amônio, na faixa de 0 a 20% de saturação.

Uma segunda etapa de purificação consistiu na passagem do material por uma coluna de cromatografia de gel filtração, eluída com tampão fosfato 0,01M, pH 6.0. A faixa de exclusão da coluna utilizada é de 4000 – 150000 Da.

Da coluna de gel filtração, foram coletadas 20 frações de 1ml, que tiveram sua absorbância lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm. As frações que formavam o pico do cromatograma foram agrupadas e sua atividade enzimática foi medida, segundo metodologia modificada de Secades & Guijarro (1999), detalhada no item 3.3.2.2.

Após a realização da análise de atividade enzimática, foi realizada a caracterização da enzima, conforme descrito nos itens 3.2.4 a 3.2.8.

### **3.4.3 Purificação a partir do extrato cru liofilizado**

O cultivo bacteriano foi realizado em frascos do tipo erlenmeyer de 500 ml, contendo 200 ml de caldo farinha de pena (CFP), nas condições ótimas determinadas no item 3.3. O pré-inoculo e o inoculo do cultivo foram realizados segundo descrito no item 3.3.2.1.

O cultivo foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C, por um período de 10 minutos a 10000 g. Após a centrifugação, este foi congelado, liofilizado e mantido sob refrigeração.

#### **3.4.3.1 Cromatografia de gel filtração**

O sobrenadante liofilizado foi ressuspendido em 3 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 6.0 e submetido à cromatografia de gel filtração. Esta técnica é baseada na separação das moléculas em solução decorrente das diferenças de tamanho destas, através da sua passagem pelo matriz cromatográfica. A resina escolhida para esta etapa de purificação foi a Sephadex G-100 (exclusão de 4000 a 150000 Da), que foi hidratada durante um período de 72 horas e acomodada em uma coluna de 19 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro.

Nesta etapa um volume de 1ml do extrato cru liofilizado e ressuspendido foi aplicado à coluna, eluída com tampão fosfato 0,01M, pH 6.0. O experimento foi feito em triplicata.

Um total de 20 alíquotas de 1ml foi coletado de cada coluna de gel filtração e sua absorbância foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm. As frações que formaram o pico de absorbância foram submetidas a análises para a determinação da proteína solúvel e do teor de enzima existente, conforme item 3.3.2.2.

As frações positivas para atividade enzimática foram agrupadas e, novamente analisadas quanto à concentração de enzima e proteína solúvel, conforme descrito anteriormente e submetidas à etapa posterior.

#### **3.4.3.2 Cromatografia de troca iônica**

O conjunto das frações com atividade enzimática da gel filtração foi submetido a uma coluna de cromatografia de troca iônica. A separação em cromatografia de troca iônica depende da adsorção reversível de moléculas de soluto carregadas a um grupo imobilizado de moléculas de cargas opostas. A matriz cromatográfica consiste em uma matriz porosa insolúvel onde um grupo carregado fica covalentemente ligado. Este grupo é associado a íons, que podem ser reversivelmente trocados com outros íons de mesma carga, sem alterar a matriz. O grupo carregado escolhido para esta etapa foi a amônia quaternária (Q), que consiste em uma coluna aniônica, e a matriz utilizada foi a Sepharose. A

matriz foi acomodada em uma coluna de 8,5 cm de comprimento e 3cm de diâmetro.

Inicialmente, a coluna foi eluída com tampão fosfato, 0,01M, pH 6.0 e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl, formado através da combinação gradual do tampão fosfato, 0,01M, pH 6.0 e deste contendo 1M de NaCl. Este experimento foi conduzido através da conexão da coluna de troca iônica a um registrador de absorbância das frações coletadas, à temperatura ambiente.

Foram coletadas 60 frações de 2 ml e aquelas que apresentaram um pico de absorbância foram submetidas à análise de atividade enzimática. As frações que supostamente continham a enzima em questão (alta atividade enzimática frente às demais) foram agrupadas e dializadas em sacos de diálise, previamente ativados, contra tampão fosfato 0,01M, pH 6.0, sem NaCl, durante 24 horas, sob agitação e refrigeração.

Após a diálise das amostras agrupadas, foi determinado seu teor de proteína solúvel, assim como sua atividade enzimática. As metodologias utilizadas foram a de Lowry (1951) e de Sedades & Guijarro (1999) modificada, descrita no item 3.3.2.2, para as análises de proteína solúvel e de atividade proteolítica, respectivamente.

As amostras foram congeladas em frações de 1 ml, liofilizadas e mantidas sob refrigeração (4°C).

### 3.4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A pureza da amostra liofilizada retirada da coluna de cromatografia de troca iônica e o seu peso molecular foram determinados por eletroforese. Alíquotas de 1mL da fração retirada da coluna de troca iônica, assim como do sobrenadante do cultivo, foram liofilizadas e ressuspendidas em 50 µl de tampão tris-HCl, 0,125M, pH 6.8, contendo 2% de SDS e 10% de glicerol. À cada uma das alíquotas foi adicionado 10% de 2-mercaptoetanol e estas foram colocadas em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7% e a eletroforese foi realizada utilizando um sistema Mighty Small (Moefer Scientific) com uma corrente de 20mA.

### 3.4.3.4 Determinação da presença dos íons $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$ na protease parcialmente purificada

A protease purificada, conforme item anterior, foi submetida a uma análise de espectroscopia de emissão atômica, de maneira a verificar a presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .

Esta análise foi realizada no Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através do espectrômetro de emissão com fonte de plasma, ICP-OES (OPTIMA 2000 DV, Perkin Elmer).

### **3.5 Aplicação da enzima produzida como agente de modificação de proteína de soja**

#### **3.5.1 Obtenção da enzima**

A obtenção da enzima para a utilização como agente modificador de propriedades funcionais de proteínas se deu conforme descrito no item 3.4.1, entretanto somente a precipitação na faixa de saturação de 0 a 20% foi realizada, devido ao fato de que nesta faixa encontrou-se a melhor relação entre enzima precipitada e quantidade de sulfato de amônio adicionado. Após a precipitação com o sulfato de amônio, o material precipitado foi submetido a uma diálise contra tampão fosfato, 0,01M, pH 6.0, sob agitação e refrigeração, para a retirada do sal (sulfato de amônio), durante 24 horas e a posterior liofilização.

#### **3.5.2 Avaliação do potencial proteolítico**

Para a avaliação do potencial proteolítico da enzima produzida frente a enzimas comerciais, uma miligrama da enzima liofilizada e ressuspendida em 1 ml de água destilada foi submetida à análise de atividade enzimática, segundo a metodologia descrita por Secades & Guijarro (1999) modificada e detalhada no item 3.2.2.1. A mesma análise foi feita com as enzimas comerciais, papaína (Sigma), tripsina (Sigma), alcalase (Novo Nordisk) e pronase V (Sigma).

#### **3.5.3 Avaliação da utilização da enzima como agente modificador das propriedades funcionais da proteína isolada de soja**

Uma solução de 6% de proteína isolada de soja (Bunge Alimentos) em tampão fosfato 10 mM, pH 7.0 foi preparada e a partir desta foram feitos

hidrolisados com diferentes concentrações de enzima. O preparo dos hidrolisados foi feito através da incubação da solução de proteína de soja (6%) com a enzima em diferentes concentrações a 50°C, durante 60 minutos e, em seguida, a 75°C por 10 minutos. As relações enzima/substrato utilizadas para o preparo destes foram: 0,0/100 (controle), 0,1/100 (H1), 0,5/100 (H2), 1,0/100 (H3) e 1,5/100 (H4).

Os hidrolisados foram, então, submetidos a distintos testes de avaliação das possíveis modificações geradas pela enzima nas propriedades funcionais da proteína de soja.

#### **3.5.3.1 Determinação do grau de hidrólise gerado**

Ácido tricloroacético (50%) foi adicionado aos hidrolisados, obtidos conforme descrito no item anterior, com a concentração final ajustada a 10%. Esta solução permaneceu a 4°C, durante 24 horas e após foi centrifugada (10000g/8 min) para posterior avaliação do grau de hidrólise obtido.

O grau de hidrólise gerado foi medido a partir do teor de proteína solúvel do sobrenadante obtido via centrifugação, através do método de Lowry.

#### **3.5.3.2 Avaliação da capacidade de formação de espuma**

Para a determinação da capacidade de formação de espuma, 10 ml dos hidrolisados (obtidos conforme item 3.5.3), diluídos a 3% em tampão fosfato 10mM, pH 7.0 foram agitados em uma proveta, durante 3 minutos, através de um



misturador, à aproximadamente 6000 rpm. O aumento de volume na proveta foi medido através da fórmula:

$$\% \text{ aumento Volume} = ((V_f - V_i)/V_i) \times 100$$

A estabilidade da espuma também foi determinada, através da medida do volume na proveta, 10 minutos após a agitação, segundo Kato et al. (1993).

### **3.5.3.3 Avaliação da capacidade emulsificante**

A capacidade emulsificante foi medida a partir dos hidrolisados (obtidos conforme item 3.5.3) diluídos a 1% (v/v) em tampão fosfato, 10 mM, pH 7,0. Para isto, 1 ml de óleo de soja foi adicionado aos hidrolisados e a mistura formada foi agitada durante 1 minuto, no vórtex. A partir desta, alíquotas de 100 µl foram diluídas em 5 ml de SDS 0,1%, a cada 2 minutos, começando pelo tempo zero (término da agitação da mistura) até 20 minutos. A absorbância das alíquotas foi medida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 500 nm. O hidrolisado que apresentou melhor capacidade emulsificante foi submetido aos testes complementares seguintes.

#### **3.5.3.3.1 Avaliação da capacidade emulsificante em condições de alta concentração de sal**

Para a avaliação da capacidade emulsificante em condições de altas concentrações de sal, o mesmo procedimento descrito no item 3.5.3.3 foi realizado, com a diferença de que o hidrolisado a 1% foi diluído em tampão fosfato, 10mM, pH 7,0, contendo 0,2 M de NaCl.

#### **3.5.3.3.2 Avaliação da capacidade emulsificante em condições ácidas**

O mesmo procedimento do item 3.5.3.3 foi realizado, entretanto o hidrolisado a 1% foi diluído em tampão citrato, pH 3,0.

#### **3.5.3.3.3 Avaliação da capacidade emulsificante sob altas temperaturas**

Para a avaliação da capacidade emulsificante em altas temperaturas, a mistura do hidrolisado e óleo de soja, após agitação por 1 minuto, permaneceu por 3 minutos a temperatura de 100°C.

Após o mesmo procedimento descrito no item 3.5.3.3 foi realizado.

#### **3.5.3.4 Avaliação da capacidade de absorção de óleo**

Para a determinação da capacidade de absorção de óleo, 3 ml dos hidrolisados (obtidos conforme item 3.5.3) diluídos a 1% em tampão fosfato, 10 mM, pH 7,0, foram adicionados a 1 ml de óleo de soja. A mistura formada foi agitada durante 1 minuto.

A absorção de óleo foi medida 1 e 15 horas após da formação da emulsão, através do volume não miscível de óleo de soja na proveta

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização do microrganismo**

#### **4.1.1 Morfologia colonial e celular do microrganismo**

A morfologia colonial do microrganismo foi observada após 48 horas de crescimento em meio agar leite (AL), em estereomicroscópio. As colônias apresentaram forma circular, consistência mucóide, bordos inteiros, superfície lisa e coloração amarelo-parda.

As observações realizadas, através da coloração de Gram, em microscópio, permitiram a caracterização do microrganismo como bastonete circular Gram positivo, não produtor de esporos.

#### **4.1.2 Testes bioquímicos**

Os resultados dos testes bioquímicos realizados estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Testes bioquímicos do microrganismo em estudo.

Teste Bioquímico	Resultado
Gelatina	Positivo
Amido	Negativo
Catalase	Positivo
Produção de H <sub>2</sub> S	Negativo
Indol	Negativo
Citrato	Negativo
Nitrato	Negativo

Os testes acima realizados e a comparação com os dados do Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática (Sneath et al.,1984), indicam que o microrganismo em estudo pertence ao gênero *Microbacterium* sp.

O sequenciamento do gene 16S do DNA ribossômico indicou que a cepa isolada é uma Actinobacteria, pertencente à família *Microbacteriaceae*, gênero *Microbacterium*. A seqüência do gene da cepa kr10 mostrou 99,7% de similaridade com o microrganismo *Microbacterium arborescens* DSM20754, diferindo deste em 3 pares de base, e 99,6% de similaridade com o *Microbacterium imperiale* DSM20530, com uma diferença de 4 pares de base para com este microrganismo.

Dados os resultados genotípicos e fenotípicos, o microrganismo isolado foi identificado como *Microbacterium* sp. kr10.

#### 4.1.3 Atividade proteolítica do microrganismo

A atividade proteolítica do microrganismo em estudo foi verificada em placas de agar leite (AL), após um período de 24 horas à temperatura de 30°C.

O microrganismo produziu halo de proteólise de aproximadamente 4 mm (distância entre o halo e a colônia), após as 24 horas de crescimento (Figura 1).



FIGURA 1: Halo de proteólise apresentado pelo microrganismo em placa de agar leite.

O halo formado confirmou a característica proteolítica do microrganismo detectada por Riffel (2002).

## **4.2 Caracterização da protease no extrato cru e parcialmente purificada**

### **4.2.1 Metodologia de análise enzimática utilizada**

Através da comparação entre as metodologias de Sedades & Guijarro (1999) e de Riffel (2002), obteve-se melhores resultados em termos de atividade enzimática do extrato cru, quando a primeira foi utilizada. Sendo assim, a metodologia descrita por Sedades & Guijarro (1999) foi adotada durante o desenvolvimento deste trabalho.

### **4.2.2 Atividade enzimática em diferentes substratos**

A atividade da enzima, no extrato cru e desta parcialmente purificada (precipitação com sulfato de amônio e gel filtração), por diferentes substratos, esta apresentada na Tabela 7. A enzima em estudo apresentou, tanto quando presente no extrato cru, quanto quando parcialmente purificada, maior atividade sobre o substrato azocaseína (Sigma). A atividade relativa da enzima em diferentes substratos demonstra uma baixa especificidade da enzima em questão a um substrato específico, o que ocorre tipicamente com enzimas extracelulares, cuja principal função é a degradação de proteínas exógenas para posterior assimilação

em rotas catabólicas. O contrário do que acontece para as enzimas intracelulares, que possuem alta especificidade por um substrato por serem associadas com a regulação de mecanismos metabólicos, como a modificação de enzimas regulatórias e a modificação de proteínas (Rao et.al., 1998).

TABELA 7: Atividade da enzima sobre diferentes substratos. Os substratos foram usados a 10mg/mL em Tris-HCl, pH 7.0. Cada ponto representa uma média de três repetições.

Substrato	Atividade Relativa (%)	
	Extrato Cru	Parcialmente Purificada
Azocaseína	100	100
Azogelatina	26,5	0
Azoalbumina	46,0	70,3
Azoqueratina	5,0	5,0
Caseína	66,7	30,9
Gelatina	50,4	15,2
Albumina	7,4	11,0

#### 4.2.3 Temperatura ótima de atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima no extrato cru e parcialmente purificada encontra-se nas Figuras 2 e 3, respectivamente. A atividade, em ambos os casos, variou de 45 a 65°C, com um ótimo em torno de 50°C. Resultado semelhante foi descrito para proteases extracelulares, produzidas por *Microbacterium arborescens* (Boguslawski et al., 1982) e *Brevibacterium linens* (Ratray et al., 1995).

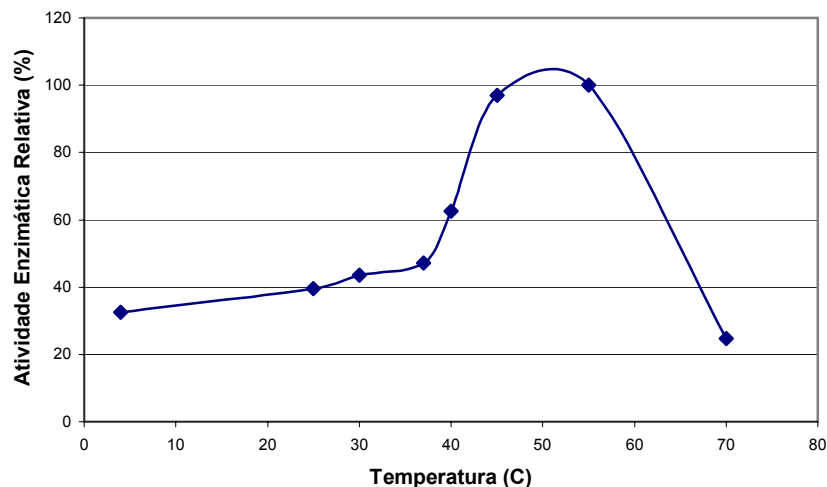


FIGURA 2: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade enzimática no extrato cru em meio CFP, incubado a 30°C, pH 6.0 a 125 rpm. Cada ponto representa uma média de três repetições.

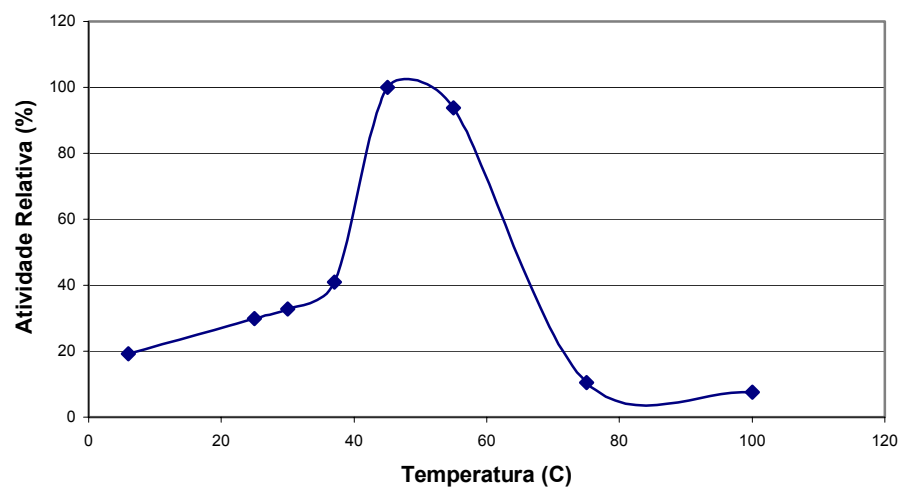


FIGURA 3: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Cada ponto representa uma média de três repetições.



#### 4.2.4 pH ótimo de atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática tanto da enzima no extrato cru, quanto da enzima parcialmente purificada estão apresentados nas Figuras 4 e 5. Em ambos os casos, a enzima teve atividade em meio neutro, entre o pH 6,5 e 7,5, com atividade máxima em pH 7,0. A atividade caiu drasticamente quando valores mais alcalinos de pH foram empregados. Este comportamento é típico de proteases bacterianas neutras, que são ativas em uma faixa de pH de 5,0 a 8,0. Este tipo de protease, normalmente gera um menor amargor em proteínas alimentares hidrolisadas quando comparada às proteases de origem animal, sendo, portanto, bastante valiosas para o uso na indústria de alimentos (Rao et al., 1998).

Proteases com distintos valores de pH ótimo têm sido apresentadas: pH de 6,5 para *Flavobacterium psychrophilum* (Secades et al., 2001), 7,5 para *Streptomyces albidoflavus* (Bressollier et al., 1999), 7.8 para *Streptomyces* sp. (Bono et al., 1996), 8,0 para *Yersinia ruckeri* (Secades & Guijarro, 1999) e 9,0 para *Aspergillus fumigatus* (Santos et al., 1996).

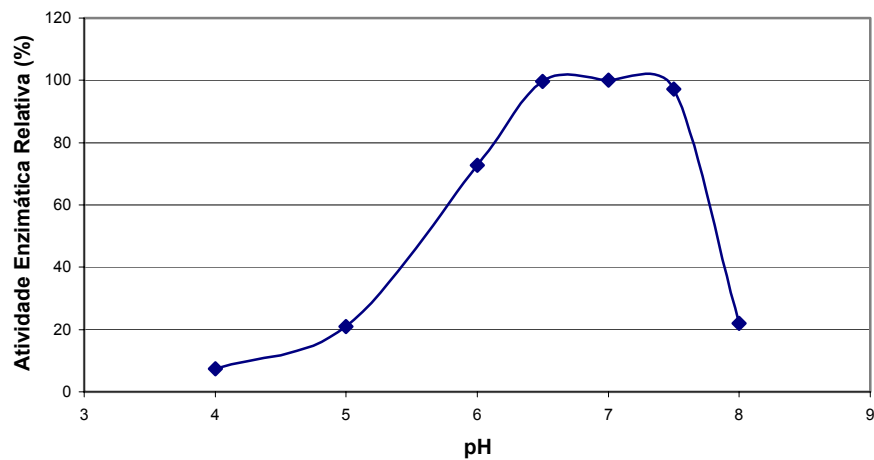


FIGURA 4 Efeito da variação do pH sobre a atividade proteolítica presente no extrato cru. Cada ponto representa uma média de três repetições.

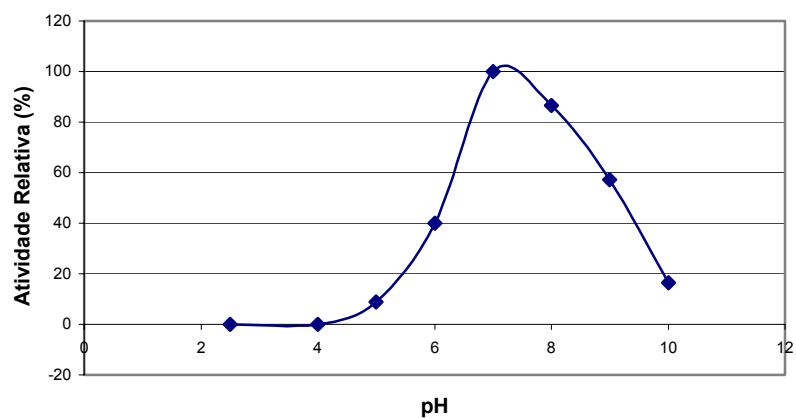


FIGURA 5: Efeito da variação do pH sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Cada ponto representa uma média de três repetições.

#### 4.2.5 Efeito de inibidores na atividade enzimática

O perfil da enzima (no extrato cru e parcialmente purificada), determinado através da hidrólise do substrato azocaseína na presença de inibidores específicos está apresentado na Tabela 8. Em ambos os casos, a enzima foi significativamente inibida pelo agente quelante EDTA (98% de inibição) e completamente inibida pela 1,10-fenantrolina, tanto em concentração de 1mM, quanto na concentração de 10mM. Este quelante é específico para caracterizar a presença de  $Zn^{2+}$  no sítio ativo da enzima (Beynon & Bond, 1996).

O inibidor de serina protease, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), não suprimiu a atividade enzimática da enzima, tendo o mesmo efeito, para a enzima no extrato cru, a pepstatina (inibidor de cisteína protease).

Sedades & Guijarro (1999) descreveram resultado similar, onde o agente quelante EDTA inibiu significativamente a protease extracelular produzida por *Yersinia ruckeri*, não surtindo o mesmo efeito nesta quando da utilização do inibidor de serina protease (PMSF). O mesmo também foi descrito por Secades et.al (2001). Riffel (2002) descreveu perfil semelhante para a protease produzida por *Flavobacterium* sp., que apresentou 67% de atividade de metaloprotease.

A queratinase produzida pelo *Vibrio* sp. kr2, pelo contrário das anteriormente citadas, mostrou inibição frente a PMSF, apresentando, assim, um perfil de serina-protease (Sangali & Brandelli, 2000).

A grande maioria das proteases neutras é pertencente à família das serina- proteases e das metaloproteases (Sangali & Brandelli, 2000; Tomaschová et al.,1998; Bono et al.,1996; Caldas et al.,2001). As serina proteases não se afetam por agentes quelantes e as metaloproteases, normalmente requerem um íon metálico divalente para sua atividade (Rao et.al, 1998).

TABELA 8: Efeito de inibidores específicos na atividade enzimática da protease no extrato cru e parcialmente purificada através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Cada ponto representa uma média de três repetições.

Inibidor	Atividade Relativa (%)	
	Extrato Cru	Parcialmente Purificada
Controle	100	100
EDTA	1,84	0
PMSF	91,74	93,43
1,10-Fenantrolina 1mM	0	0
1,10-Fenantrolina 10mM	*	0
Pepstatina	100	*

\* Análise não realizada

#### 4.2.6 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

O efeito de íons metálicos na atividade enzimática tanto da enzima quando no extrato cru, quanto da enzima parcialmente purificada, encontra-se nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Tanto para a enzima no extrato cru, quanto para esta parcialmente purificada, a atividade enzimática se manteve estável na presença dos íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Li^{2+}$ .

Quando estavam presentes os íons  $\text{Sn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  a enzima teve sua atividade reduzida em 50%, aproximadamente. Os íons  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  suprimiram a atividade enzimática consideravelmente. A inibição por íons  $\text{Hg}^{2+}$  tem sido não apenas relacionada com a ligação a grupos sulfidril (-SH), presentes no sítio ativo da enzima ou próximo deste, mas também pode ser resultante de interações com resíduos de triptofano ou com grupos carboxil de amino ácidos da enzima (Lusterio, 1992).

O  $\text{Zn}^{2+}$  gerou uma redução na atividade enzimática tanto da enzima no extrato cru, quanto desta parcialmente purificada, quando este foi utilizado na concentração de 5 mM. Entretanto, nenhum efeito foi observado, na enzima presente no extrato cru e nesta parcialmente purificada, quando o íon foi adicionado em concentrações menores (0,05 e 0,5mM), conforme apresentado na Tabela 9.

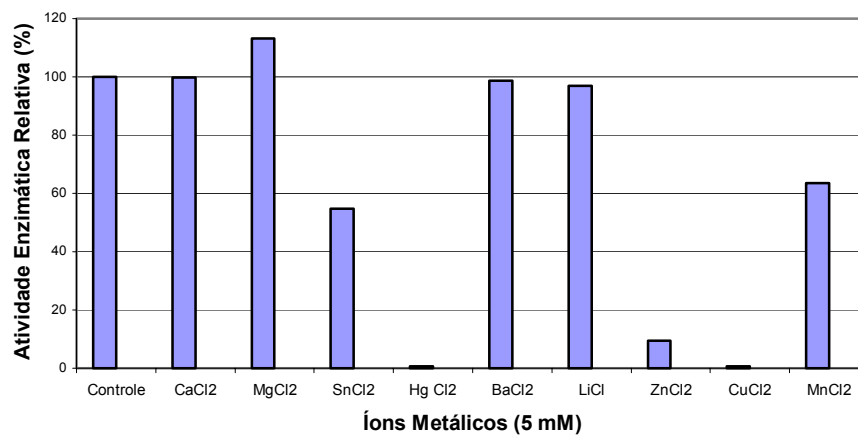


FIGURA 6: Efeito de substâncias químicas na atividade proteolítica presente no sobrenadante do cultivo do microrganismo (extrato cru), em meio CFP, incubado à 30°C, pH 6.0 a 125 rpm. Cada ponto representa uma média de três repetições.

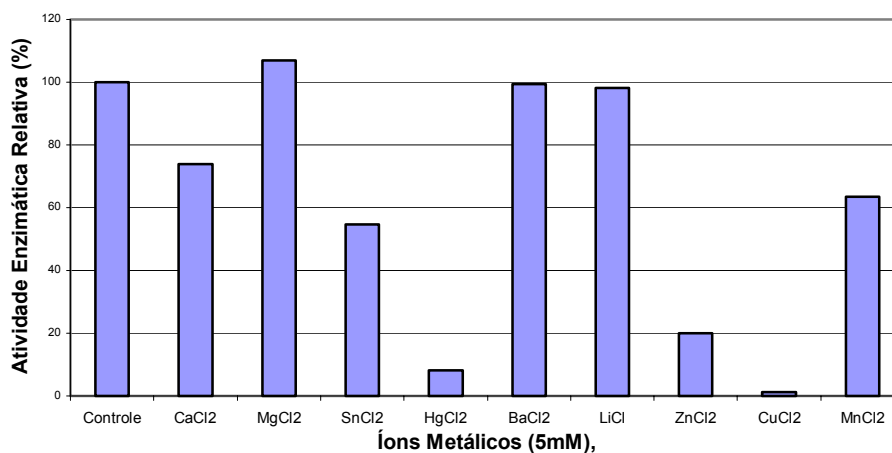


FIGURA 7: Efeito de substâncias químicas sobre a atividade proteolítica presente na enzima parcialmente purificada, através das etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Cada ponto representa uma média de três repetições.

TABELA 9: Efeito do íon  $Zn^{+2}$  em diferentes concentrações sobre a atividade enzimática.

	<b>Concentração</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
ZnCl <sub>2</sub>	0,05 mM	97,4
ZnCl <sub>2</sub>	0,5 mM	107,25
ZnCl <sub>2</sub>	5 mM	20,00

A diferença do efeito do íon  $Zn^{2+}$  sobre a atividade enzimática, apresentada pela Tabela 9, pode estar relacionada ao fato de que muitas proteases zinco dependentes são inibidas na presença deste quando em altas concentrações (Auld, 1995). Esta inibição é devido a formação de monohidróxido de zinco, que liga-se ao íon  $Zn^{2+}$  catalítico de um lado da cadeia no sítio ativo da enzima, causando uma competição com o substrato (inibição competitiva) (Beynon & Bond, 1996).

Resultado similar foi obtido por Chaia et al. (2000) para a protease produzida por *Brevundimonas diminuta*, que tratava-se de uma metaloprotease zinco dependente.

### **4.3 Determinação das condições ótimas de produção da enzima**

#### **4.3.1 Seleção do meio de cultivo**

A seleção do melhor meio de cultivo para a produção da enzima foi realizada através da análise da atividade enzimática após 24 e 48 horas de cultivo do microrganismo em meio CFP, com 10g/l da fonte de nutrientes (C e N), a 30°C,

pH de 6,0 e agitação de 125 rpm. Os valores da produção da protease para as diferentes fontes de C e N testadas estão apresentados na Tabela 10.

Após 24 horas de cultivo, o microrganismo teve uma produção máxima de protease quando o cultivo foi feito com extrato de levedura (348,75 U/mL), seguido de caseína (123,75 U/mL) e farinha de pena (122,08 U/mL).

A produção máxima da protease, após 48 horas de cultivo, foi em farinha de pena (137,91 U/ml), seguido de proteína de soja (115,83 U/mL) e caseína (63,33 U/mL).

A redução da produção da protease observada (Tabela 10), de 24 para 48 horas de cultivo, quando se utilizou as fontes de nutrientes caseína, extrato de levedura e peptona pode indicar a instabilidade da enzima produzida, assim como a existência de mais de uma protease que gere a hidrólise de uma delas, catalizada pela outra.

Tanto em 24 horas de cultivo, quanto em 48 horas , a produção da protease caiu drasticamente quando o meio de cultivo utilizado continha peptona e gelatina.

O extrato de levedura e a caseína, mesmo gerando valores maiores, em U/ml, de protease produzida, em menor tempo (24 horas) não foram as fontes de nitrogênio selecionadas para a otimização do processo de produção da protease, através da metodologia de superfície de resposta. Isto se deve ao fato



de que as matérias-primas perfazem 60 a 80% do preço de custo em uma produção de enzimas. Deste modo, a composição do meio deve, ser definida com o objetivo de substituir os compostos caros por outros disponíveis em maior quantidade e de preço mais baixo, como os resíduos industriais, por exemplo (Scriban et al.,1985).

Desta forma o meio de cultivo composto por farinha de pena, resíduo da indústria avícola, foi o selecionado, pois teve a melhor relação custo e benefício, já que produziu o maior valor de protease em 48 horas de cultivo, tendo o menor preço em relação ao extrato de levedura e à caseína.

TABELA 10: Efeito das várias fontes de nitrogênio testadas na produção de protease por *Microbacterium* sp. após 24 e 48 horas a 30°C, sob agitação

Fonte de Nitrogênio (1%)	Produção da Protease (U ml <sup>-1</sup> ) em 24 horas	Produção da Protease (U ml <sup>-1</sup> ) em 48 horas
Farinha de Pena	122,08	137,91
Proteína de Soja	72,91	115,83
Gelatina	32,91	36,25
Caseína	123,75	63,33
Extrato de Levedura	348,75	58,33
Soro de Queijo	59,16	60,41
Peptona	37,91	30,83

Quando foi testada a suplementação da farinha de pena com carboidratos (10mg/ml), entre eles, glicose, lactose e sacarose, a produção enzimática caiu em cerca de 90%. Este resultado ressalta, a principal função da produção das proteases, descrita por Secades & Guijarro (1999), de prover nutrientes (peptídeos) para proporcionar o desenvolvimento do microrganismo, já

que na presença de açúcares, nutrientes disponíveis, a produção enzimática caiu drasticamente.

Além disso, este resultado retrata a repressão catabólica por açúcares, normalmente observada na produção de proteases extracelulares (West & Sample, 1994 e Moon et al.,2000).

#### **4.3.2 Otimização das condições (pH, temperatura e concentração de farinha de pena) para a produção da protease através da metodologia de superfície de resposta (MSR)**

Os valores de atividade enzimática foram obtidos após 2, 4 e 6 dias de incubação. Os melhores valores foram obtidos após 4 dias de incubação, sendo assim, estes valores foram selecionados para o desenvolvimento da equação de regressão do experimento.

A análise estatística dos resultados mostrou que, na faixa estudada, a temperatura teve um forte efeito na produção da protease, assim como a interação entre o pH inicial e a concentração de farinha de pena (Figura 8). O pH inicial (linear) e a concentração de farinha de pena (quadrática) ficaram no limite de significância ( $p = 0,05$ ) para uma significância de 95%.

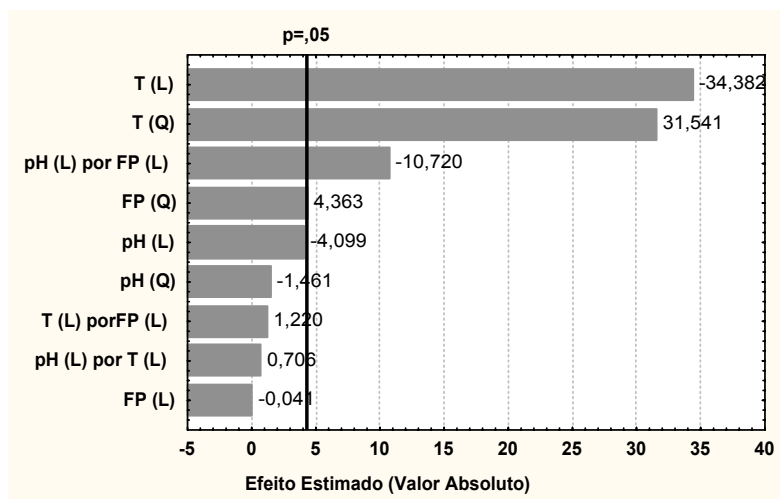


FIGURA 8: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados padronizados das diferentes variáveis testadas no prospecto do experimento de produção da protease por *Microbacterium* sp. Variáveis testadas: temperatura (T), pH inicial (pH) e concentração de farinha de pena (FP). O ponto onde os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ( $P = 0,05$ ) está indicado pela linha vertical.

Os resultados do experimento fatorial  $2^3$  para o estudo dos efeitos das três variáveis independentes, pH inicial, temperatura e concentração de farinha de pena, na produção da protease estão apresentados na Tabela 11, incluindo os valores preditos pelo modelo e as respostas observadas experimentalmente.

TABELA 11: Desenho experimental e resultados do fatorial completo  $2^3$ 

Ensaio	Níveis (Valores reais)			Atividade Enzimática (U mL <sup>-1</sup> )			
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Valores observados			Valores Preditos
	pH	T(°C)	FP(g/L)	2° dia	4° dia	6° dia	4° dia
1	5,8	30	5,0	74.2	49.2	45.0	88.2
2	8,29	30	5,0	51.7	70.8	93.3	112.8
3	5,8	45	5,0	12.5	10.8	23.3	2.8
4	8,29	45	5,0	22.5	27.5	103.3	27.4
5	5,8	30	20	186.7	106.7	152.5	123.0
6	8,29	30	20	55.8	49.2	111.7	78.0
7	5,8	45	20	36.7	66.7	10.0	37.5
8	8,29	45	20	25.0	23.3	10.0	0.0*
9	7,0	37	12,5	20.0	13.3	0.0	7.5
10	7,0	37	12,5	30.8	4.2	4.2	7.5
11	7,0	37	12,5	16.7	9.2	1.7	7.5
12	5,0	37	12,5	11.7	15.8	5.8	16.0
13	7,0	25	12,5	179.2	270.8	90.0	202.7
14	7,0	37	0	47.5	62.5	25.0	26.0
15	9,0	37	12,5	11.7	11.7	10.8	0.0*
16	7,0	50	12,5	7.5	11.7	0.0	59.2
17	7,0	37	25	13.3	10.0	10.0	26.0

A equação de regressão obtida após análise de variância (ANOVA) indicou um valor de  $r^2$  de 0,7748 (um valor de  $r^2 > 0,75$  indica a validação do modelo utilizado).

Este valor garante um ajuste satisfatório do modelo quadrático aos dados experimentais e indica que 77,48% da variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo proposto. Através do Módulo de Desenho Experimental, pertencente ao software Statistica, foram calculados os coeficientes da equação de regressão que deram origem a equação de regressão abaixo (os coeficientes com menos de 95% de significância não foram incluídos):

$$Y = 7.451181 - 5.09532.x_1 - 42.7196.x_2 + 43.76328.x_2^2 + 6.560895.x_3^2 - 17.3958.x_1x_3$$

Onde:

- Y é a resposta obtida, isto é, a produção da protease;
- $x_1$ , o pH;
- $x_2$ , a temperatura e,
- $x_3$ , a concentração de farinha de pena.

A significância de cada coeficiente foi determinada através dos valores de p, que estão listados na Tabela 12. Quanto menor o valor de p, maior é a significância do coeficiente correspondente (Barros Neto et al., 1995).

TABELA 12: Coeficientes estimados por múltiplas regressões lineares (significância dos coeficientes de regressão).

Fator	Coefficiente	Valor de p
Interseção	7.451181	0.064288
pH (linear)	-5.09532	0.054671
Temperatura (linear)	-42.7196	0.000845
Temperatura (quadrática)	43.76328	0.000892
Concentração de Farinha de Pena (quadrática)	6.560895	0.037533
Interação pH inicial (linear) e concentração de farinha de pena (linear)	-17.3958	0.008589

Os resultados do modelo de superfície de resposta de segunda ordem na forma de análise de variância (ANOVA) estão listados na Tabela 13. Segundo

Barros Neto et al.(1995), o teste de Fischer ( $F_{c(5,11)}=7.57 > F_{t(5,11)}=3,2$ ) demonstra significância para o modelo de regressão.

TABELA 13. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	51399.59	5	10279.92	7.57
Resíduo	14939.38	11	1358.126	
Total	66338.97	16		

A curva tridimensional da superfície de resposta esta apresentada na Figura 9 e as curvas de superfície estão apresentadas nas Figuras 10 e 11.

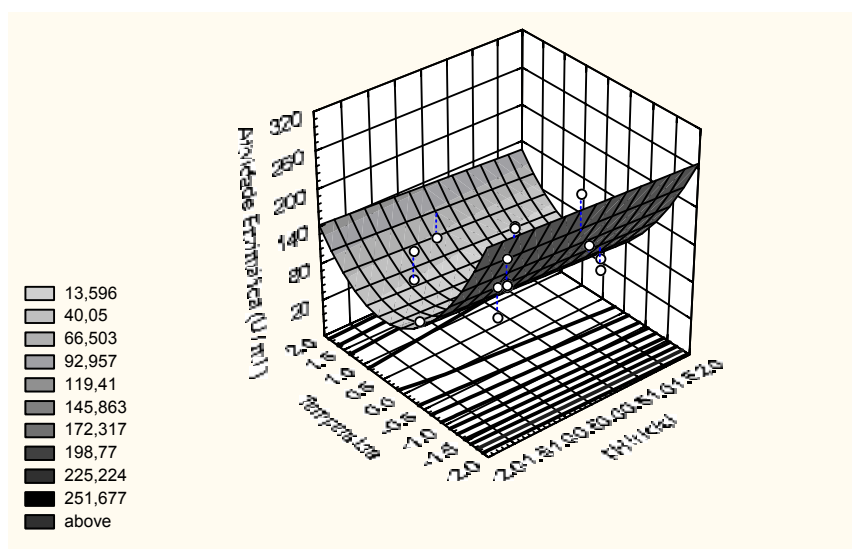


FIGURA 9: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e pH, tendo a variável farinha de pena no ponto central, após 4 dias de incubação.

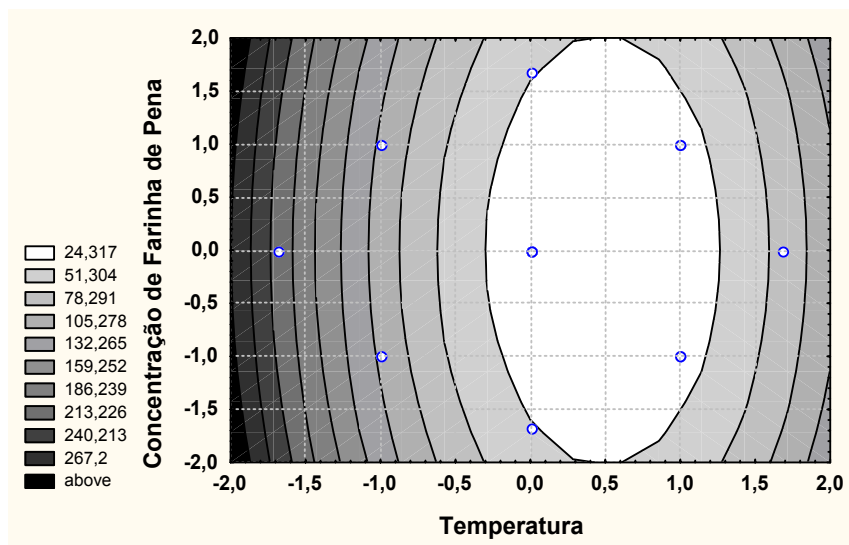


FIGURA 10: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e concentração de farinha de pena, tendo o pH inicial no ponto central, após 4 dias de incubação.

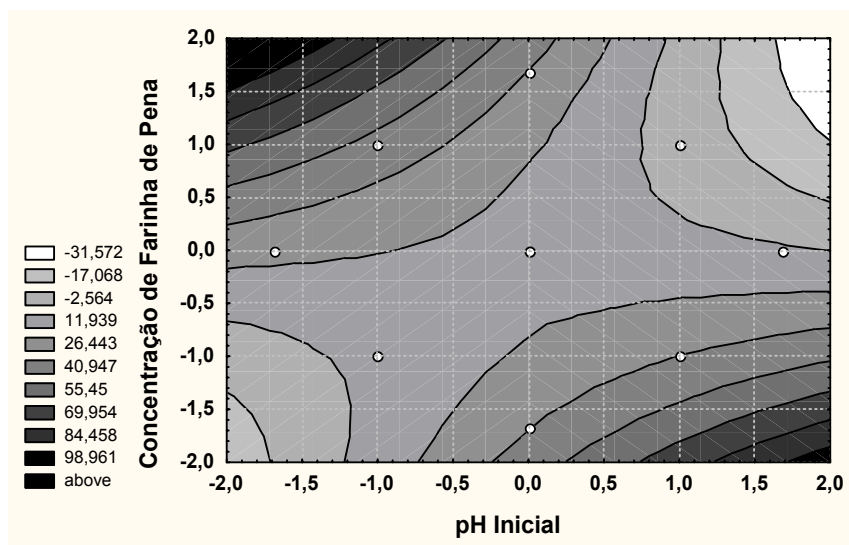


FIGURA 11: Produção da protease observada como uma resposta da interação entre as variáveis pH inicial e concentração de farinha de pena, tendo a variável temperatura no ponto central, após 4 dias de incubação.

Quando a produção da protease foi observada como resposta da interação entre as variáveis temperatura e pH, tendo a concentração de farinha de pena no ponto central (Figura 9), notou-se um aumento na produção da protease em faixas mais baixas de temperatura, assim como em faixas altas, não existindo nenhuma influência do pH inicial. A existência deste ponto de mínimo pode ser explicada pelo fato de que em temperaturas altas, o microrganismo tem a necessidade de produzir mais enzima, para que alcance o suporte de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, já que se encontra em condições adversas a este (Wang & Shih, 1999).

Da mesma forma, na Figura 10, pode-se perceber que em faixas baixas de temperatura, tem-se uma região máxima de produção da protease, não havendo influência da variável concentração de farinha de pena.

A Figura 11 mostra a produção da protease como resposta da interação, que foi significativa, entre a concentração de farinha de pena e o pH inicial, tendo a temperatura no ponto central. A partir desta Figura, pode-se observar um aumento da produção da enzima em valores máximos de pH inicial e concentração de farinha de pena. Entretanto, ambas as faixas geram valores mais baixos para a produção da enzima (em torno de 99 U/ml), quando comparado ao valor encontrado para o ensaio de número 13, que foi de 270 U/ml. Este fato justifica a não realização de outros experimentos nestas faixas.



A partir da indicação do modelo de que em baixas temperaturas, a produção da enzima tendia a aumentar, independentemente dos níveis do pH inicial e da concentração de farinha de pena (Figuras 9 e 10), foi testada a produção da protease a 18°C, pH inicial de 7.0 e 12,5 g.l<sup>-1</sup> de concentração de farinha de pena. Estas condições apresentaram o valor máximo de produção (270,8 U/ml), quando a temperatura de 25°C, ao invés de 18°C, foi utilizada. Através da análise da atividade enzimática no 4º dia (máximos valores observados no experimento), observou-se uma produção da protease de 1,5 U/ml. Este resultado permitiu a confirmação de que temperaturas menores que 25°C, não seriam indicadas para o aumento da produção da enzima, conforme propunha o modelo. Segundo Sneath et al. (1984), a temperatura ótima de crescimento para este microrganismo é de 30°C, o que indicaria que este produz maiores níveis da enzima em temperaturas menores que a ótima de crescimento. Resultados similares foram encontrados por Riffel et al (2003) para *Chryseobacterium* sp. (linhagem kr6), onde a produção máxima de protease se encontrava a 25°C enquanto o máximo crescimento celular estava a 30° C. Para *Bacillus licheniformis* PWD-1, Wang e Shih (1999) demonstraram que a máxima atividade keratinolítica estava em 37° C, uma temperatura muito menor do que a encontrada para a ótima de crescimento (50°C). Estes autores também descreveram temperaturas ótimas de produção de protease por *Bacillus subtilis* FDB-29, (37° C) menores do que as ótimas para o seu crescimento (42° C)

Analisando todos os resultados obtidos, pode-se dizer que as melhores condições para a produção da protease pelo *Microbacterium* sp. foram: em pH neutro (ponto central), baixas temperaturas e concentração de farinha de pena no ponto central (pH = 7.0; CFP = 12.5 g l<sup>-1</sup> e T = 25° C), que corresponde ao experimento de número 13 da Tabela 11.

#### 4.3.3 Curva de crescimento e produção da enzima nas condições ótimas de crescimento

*Microbacterium* sp. kr10 foi incubado aerobicamente, nas condições ótimas determinadas no item anterior (25° C, pH 7,0 e 12,5 g/l de farinha de pena). O crescimento do microrganismo entrou na fase estacionária após 3 dias de cultivo e a produção máxima da protease foi observada no 4° dia. A curva de crescimento e de produção enzimática esta apresentada na Figura 12.

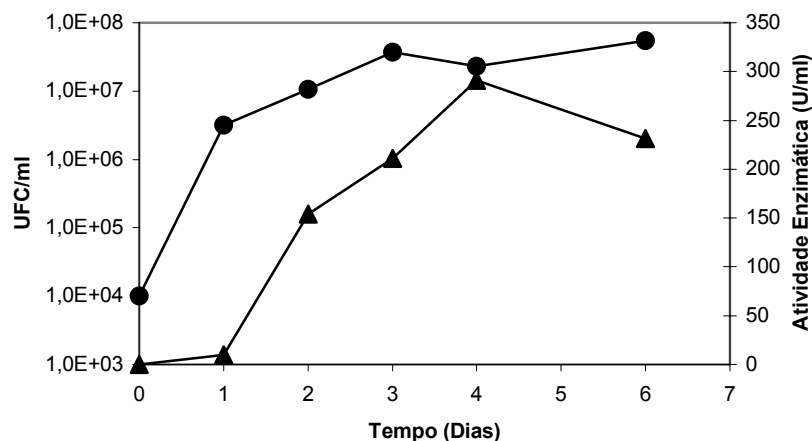


FIGURA 12: Produção de metaloprotease durante o crescimento de *Microbacterium* sp em caldo farinha de pena (12,5g/l, pH 7.0 e 25°C). UFC/ml (●) e atividade proteolítica (▲) foram monitoradas em função do tempo de cultivo. Cada ponto representa uma média de dois experimentos isolados.

Segundo Macfaddin (2000), a produção máxima de proteases bacterianas normalmente ocorre entre o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária, o que concorda com o resultado obtido.

#### 4.3.4 Efeito do aumento da concentração do inóculo na produção da enzima

O microrganismo foi cultivado nas condições ótimas (25°C, 12,5g/l de concentração de farinha de pena e pH inicial de 7,0) em incubadora com agitação de 125 rpm e concentração do inóculo de 1 e 3% (v/v). Determinou-se o efeito do aumento de concentração do inóculo na produção da enzima

Na Figura 13, pode-se observar que não houve diferença significativa quando a concentração do inóculo foi aumentada de 1 para 3%.

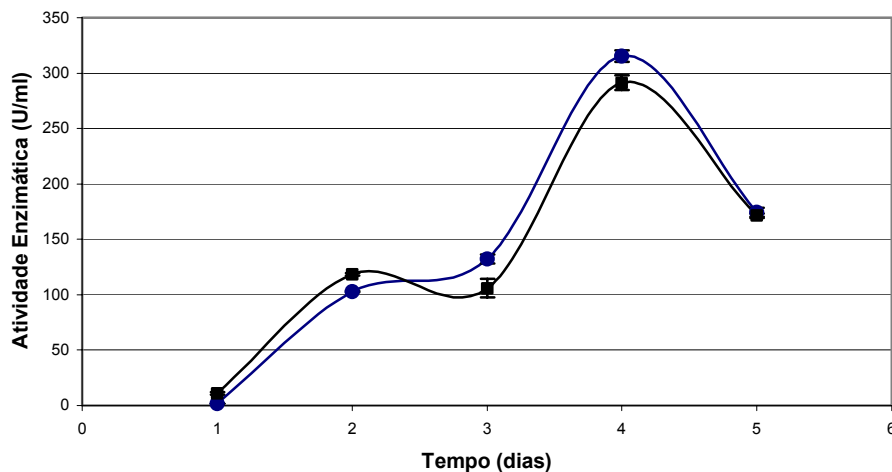


FIGURA 13: Produção de metaloprotease durante o crescimento de *Microbacterium* sp kr10 em caldo farinha de pena (CFP), pH 7.0 e 25°C. Inóculo à 1% (●) e inóculo à 3% (■). Cada ponto representa uma média de dois experimentos isolados.

## **4.4 Purificação da Enzima**

### **4.4.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio**

O microrganismo foi cultivado nas condições ótimas anteriormente determinadas (pH 7,0, 12,5g/l de farinha de pena e 25°C). A precipitação fracionada do sobrenadante resultante da centrifugação do cultivo (4°C/10000g/10 minutos) nas faixas de saturação de 0 a 20%, 20 a 40% e 40 a 80% resultou em três precipitados (um referente a cada etapa da precipitação) e um sobrenadante final, oriundo da última etapa desta. Determinou-se a concentração da proteína solúvel e a atividade da enzima em cada etapa.

Os valores de proteína solúvel e da atividade enzimática para cada faixa de saturação foram expressos em porcentagem, sendo o valor de 100% referente ao sobrenadante do cultivo (extrato cru). Como se observa na Figura 14, da primeira etapa da precipitação (0 a 20%) quase 50% do total de enzima presente é recuperado, sem que se precipite grande parte das demais proteínas presentes no sobrenadante do cultivo (15,22%). Sendo assim, a precipitação com sulfato de amônio nesta faixa de saturação pode ser utilizada para a produção da enzima em escala industrial, devido à rapidez da sua obtenção (uma etapa apenas), a não utilização de uma quantidade alta de sal e a não necessidade da enzima pura para fins comerciais (Beynon & Bond, 1996).

Para fins de purificação, a precipitação nesta faixa (0 a 20%) torna-se uma boa opção para a primeira etapa do processo, que deve ser seguido de

outras etapas, como a cromatografia de gel filtração ou de troca iônica, a fim de eliminar as proteínas não interessantes, obtendo um maior grau de pureza. Entretanto, o fato de que, com a precipitação nesta faixa, metade da quantidade de enzima produzida se perde deve ser levado em consideração no planejamento de um processo de purificação.

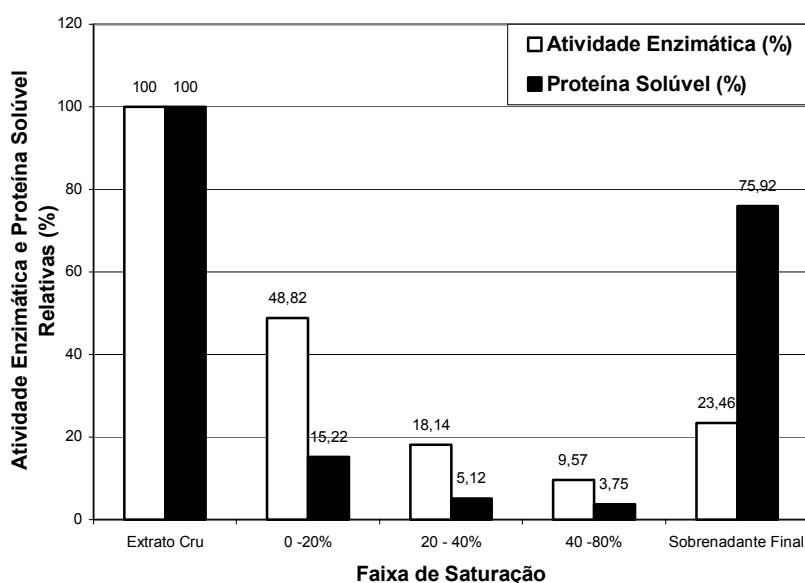


FIGURA 14: Quantificação do teor de proteína solúvel e do teor de enzima de cada etapa da precipitação fracionada. Cada valor representa uma média de duas repetições.

#### 4.4.1.1 Perfil das proteases precipitadas fracionadamente

Caracterizou-se as enzimas precipitadas em cada etapa do processo de precipitação fracionada, através da hidrólise do substrato azocaseína, na presença de inibidores específicos de metaloprotease (EDTA) e serina-protease (PMSF),

que segundo Rao et.al, (1998) são as duas famílias que uma protease neutra pode pertencer.

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram um comportamento de metaloprotease para as enzimas precipitadas nas três etapas da precipitação fracionada, assim como da enzima presente no sobrenadante final deste processo. Este perfil é mais característico para a protease obtida na primeira etapa do processo de precipitação, devido ao maior efeito inibidor frente ao EDTA. Metaloproteases constituem os mais diversos tipos, entre elas encontram-se as colagenases de organismos superiores e microrganismos e a termolisina em bactérias (Rao et al.,1998).

TABELA 14: Atividade enzimática relativa (%) das enzimas precipitadas nas diferentes etapas da precipitação fracionada frente a inibidores específicos.

Inibidor específico	1ª Etapa (0 a 20%)	2ª Etapa (20 a 40%)	3ª Etapa (40 a 80%)	Sobrenadante Final
Controle*	100	100	100	100
EDTA (metalo)	4,50	17,32	17,26	16,71
PMSF (serina)	90,20	90,55	100,60	98,85

\*O controle do experimento consistiu nas análises de atividade enzimática das enzimas precipitadas na ausência de inibidores.

#### 4.4.2 Purificação parcial a partir do sobrenadante cru precipitado

As etapas utilizadas para a purificação parcial da enzima (precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração) estão apresentadas na Tabela 15.

TABELA 15: Teores de enzima, proteína solúvel e fatores de recuperação e purificação em cada etapa do sistema de purificação

	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Recuperação (%)	Fator de Purificação
Sobrenadante Cru	1466,7	44,5	32,9	100	1
Precipitado Sulfato de Amônio	615,62	2,1	292,2	42,0	8,9
Gel Filtração	497,9	0,4	1112,0	33,9	33,7

De acordo com a Tabela 15, pode-se observar que a precipitação, na faixa de saturação de 20% de sulfato de amônio, resulta em um razoável fator de recuperação da protease (42,0%), entretanto, com um baixo grau de purificação (8,9). Sendo assim, para a obtenção da enzima com fins de comercialização (aplicação como agente de modificação de proteínas), a precipitação com sulfato de amônio, somente, seria uma boa opção, visto que, para este fim, conforme anteriormente citado (item 4.4.1) , em muitos casos, não há a necessidade da aplicação da enzima pura.

O passo seguinte deste processo (cromatografia de gel filtração) resultou em um maior grau de pureza da enzima (33,7) com uma redução do seu

fator de recuperação (33,9%). Este fator de purificação foi superior ao alcançado por Rattray et al.(1995) para a protease produzida por *Brevibacterium linens* ATCC 9174, que foi de 19,4, assim como ao obtido por Bressolier et al.(1999) para a protease produzida por *Streptomyces albidoflavus*, que foi de 25,9. Ambos autores não utilizaram a precipitação com sulfato de amônio como primeiro passo do processo de purificação e sim a cromatografia de troca iônica, seguida de cromatografia de interação hidrofóbica.

Secades et al.(2001) utilizaram um processo semelhante (precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica) para a purificação da protease de *Yersinia ruckeri* e alcançaram um fator de purificação de 82,15, que foi superior ao alcançado neste trabalho.

Este processo de purificação (precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração) foi utilizado para a realização da caracterização da enzima parcialmente purificada.

#### **4.4.3 Purificação a partir do extrato cru liofilizado**

Foi realizada a purificação do extrato cru, cultivado nas condições ótimas de produção enzimática (item 4.3), centrifugado (4°C/10000 g/10 minutos) e liofilizado. Este processo foi realizado com o objetivo de aumentar a recuperação da enzima, visto que a precipitação com sulfato de amônio (item 4.1 e 4.4.2), gera uma perda em torno de 50% do teor total da enzima em questão, o que justificou a sua não utilização como primeiro passo deste processo.



Após a liofilização do sobrenadante cru, foi utilizado um sistema de purificação de duas etapas, constituindo a primeira delas em uma coluna de gel filtração (Sephadex G-100) e a segunda em uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose).

#### **4.4.3.1 Cromatografia de gel filtração**

De acordo com a Figura 15, pode-se observar que das 20 frações coletadas, de 1 ml cada, as frações 9,10 e 11 apresentaram um grande pico de proteína presente (ABS~3,000) sem apresentar atividade enzimática considerável (<20 U/ml), o que provavelmente corresponda às proteínas presentes no meio de cultura. As frações 3,4 e 5 apresentaram um pico de atividade enzimática (~140 U/ml), acompanhado de um pequeno pico protéico (ABS~0,5), sendo assim, retentoras de grande quantidade da protease produzida pelo microrganismo.

A coluna de gel filtração, desta forma, mostrou-se uma boa ferramenta para a primeira etapa da purificação visto que conseguiu separar a enzima (frações 3,4 e 5) das demais proteínas presentes no meio (frações 8,9 e 10).

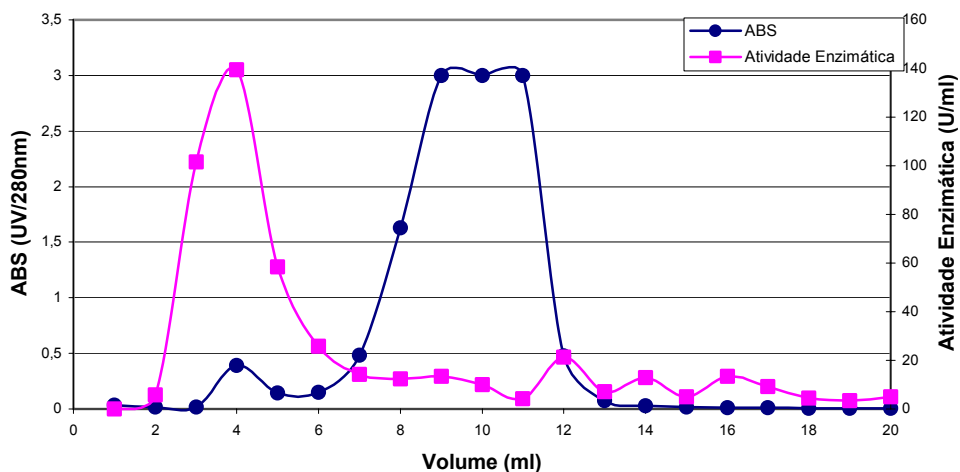


FIGURA 15: Valores de absorvância (espectrofotômetro UV/280 nm) e de atividade enzimática (U/ml) para as frações obtidas da cromatografia de gel filtração. Cada valor representa uma média de duas repetições.

#### 4.4.3.2 Cromatografia de troca iônica

As frações que apresentaram o pico de atividade (3,4 e 5), da coluna de cromatografia de gel filtração, foram agrupadas e submetidas à segunda etapa da purificação, a cromatografia de troca iônica. Desta coluna de cromatografia foram coletadas 60 frações de 2 ml, que foram analisadas no detector de absorvância a 280 nm e, posteriormente, à análise de atividade enzimática. O eluente utilizado na coluna, até a fração 20, foi o tampão fosfato 0,01M, pH 6,0. Da fração 21 a 34 foi aplicado um gradiente (0 à 1M) de cloreto de sódio, de maneira a retirar àquelas moléculas que se encontravam adsorvidas na resina aniônica (amônia

quaternária). A partir da fração 34, o eluente foi o tampão fosfato 0,01M, pH 6.0 com 1M de NaCl, até a coleta da última fração de 2 ml.

Através da análise da curva de absorvância das frações coletadas (Figura 16), observam-se dois picos característicos de absorvância (ABS ~ 0,045) O primeiro na fração 37 e o segundo nas frações 39, 40 e 41, ambos após o término do gradiente de NaCl, isto é, quando a concentração de NaCl chegou à 1M. As frações 39, 40 e 41 apresentaram junto com o pico de absorvância um pico de atividade (~35 U/ml), sendo consideradas as retentoras da enzima em questão. Desta forma, pode-se concluir que a enzima em questão é carregada negativamente, já que ficou inicialmente adsorvida na resina aniônica (amônia quaternária), desprendendo-se desta somente após a aplicação do tampão com NaCl.

As frações 39, 40 e 41 foram agrupadas e dializadas contra o tampão fosfato, 0,01M, pH 6.0 sem NaCl, durante 24 horas, sob agitação e refrigeração. Após a diálise, foram realizadas as análises de atividade enzimática e de proteína solúvel, obtendo-se os valores de 50,4 U/ml e 0,003 mg proteína /ml, respectivamente. O aumento do valor em U/ml observado após a diálise pode estar relacionado com a retirada do NaCl da solução enzimática, que poderia estar inibindo a reação enzima / substrato, quando presente.

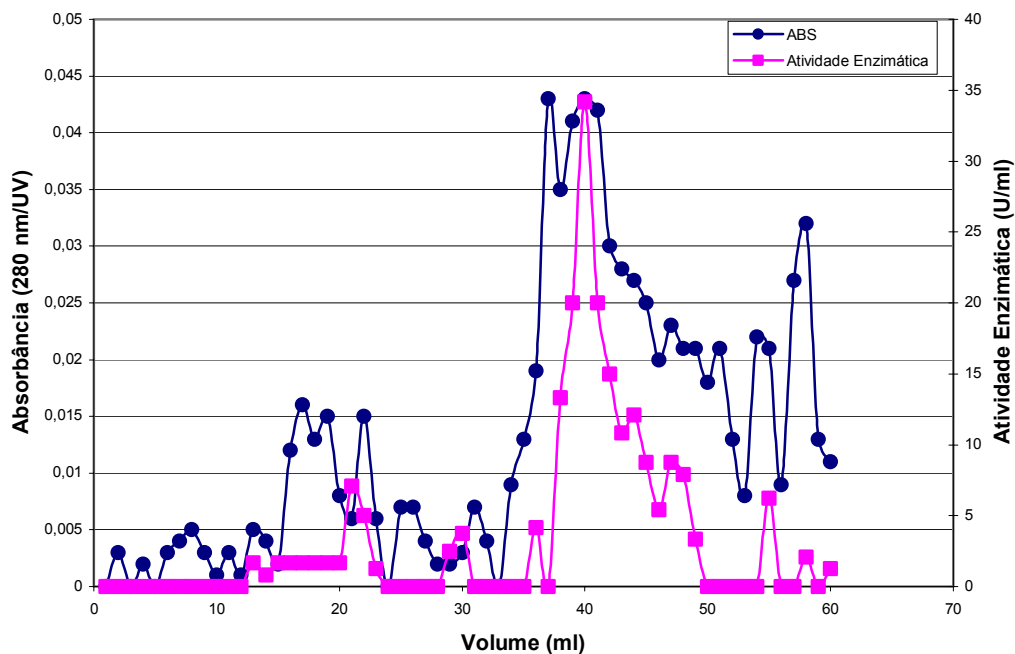


FIGURA 16: Absorbância (UV) e atividade enzimática das frações coletadas da coluna de troca iônica (Q-Sepharose). Cada ponto representa uma média de duas repetições.

A Tabela 16 mostra as etapas de purificação utilizadas, com os valores das análises de atividade enzimática e Lowry (proteína solúvel), assim como os valores obtidos para os fatores de purificação e recuperação da enzima em cada etapa.

A comparação entre os dois processos (Tabela 15 e Tabela 16) ressalta a escolha do segundo, para fins de purificação, devido ao grau de pureza obtido (249,9) frente ao primeiro processo (33,7).

O sistema de purificação realizado resultou em um fator de purificação de 249,9, o que o torna um eficiente sistema de purificação. Entretanto, o fator de recuperação obtido (34,2%) demonstra que para uma produção em escala industrial, este sistema não seria tão eficiente, já que se recupera uma quantidade pequena da enzima pura na etapa final do processo, frente ao fator de recuperação obtido somente com a etapa de precipitação com sulfato de amônio (42,0%).

TABELA 16: Teores de enzima, proteína solúvel e fatores de recuperação e purificação em cada etapa do sistema de purificação.

	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Recuperação (%)	Fator de Purificação
Sobrenadante Cru	2650	44,7	59,3	100	1,0
Cru Liofilizado	1878,75	28,4	66,1	70,9	1,1
Gel Filtração	1400	0,98	427,1	52,8	24,0
Troca Iônica	907,5	0,06	14812,4	34,2	249,9

Secades et al. (2001) conseguiu um fator de purificação semelhante (231,5) para a metaloprotease de *Flavobacterium psychrophilum* através de um sistema muito mais complexo, que compreendia a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, interação hidrofóbica e cromatografia de gel filtração.

Boguslawski et al. (1982) obteve um fator de purificação bastante inferior, de 60,33, para a metaloprotease produzida por *Flavobacterium arborescens* através de um processo que continha etapas de precipitação com

sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e finalizava com um gradiente de sacarose. A partir de 1984, o microrganismo *Flavobacterium arborescens* foi reclassificado como *Microbacterium arborescens* (Imai et al., 1984).

#### 4.4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A Figura 17 mostra o gel de eletroforese das frações que apresentaram o pico de atividade enzimática da coluna de cromatografia de troca iônica, dializadas e liofilizadas. Na canaleta 1 encontra-se o marcador de peso molecular, na canaleta 2, o sobrenadante cru do cultivo e na canaleta 3, as frações coletadas da coluna de cromatografia de troca iônica.

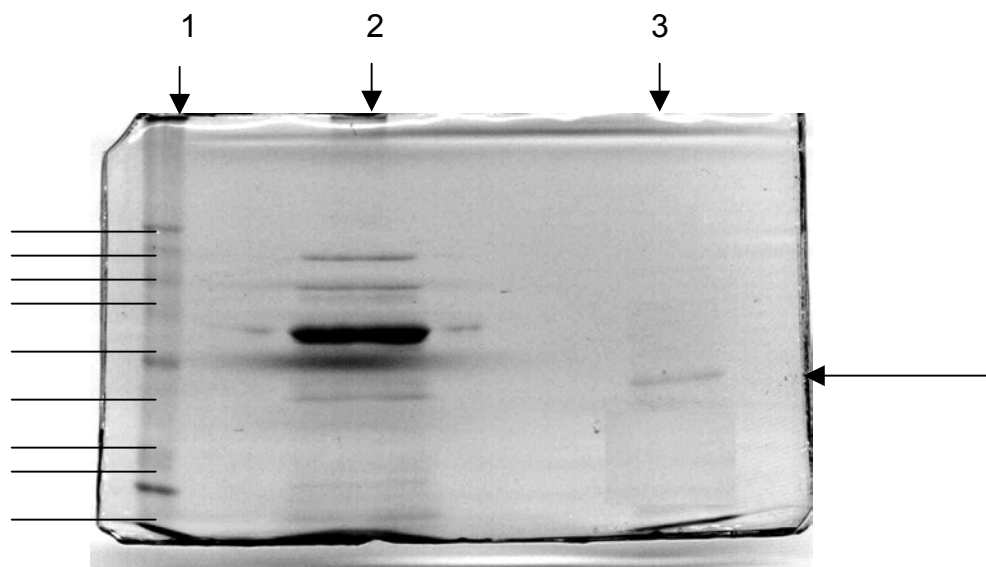


FIGURA 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações retiradas da coluna de cromatografia de troca iônica (3) e do sobrenadante do cultivo (2).

Na canaleta 2, onde encontra-se o sobrenadante cru do cultivo, pode-se observar a presença de mais de uma proteína. Na canaleta 3, onde encontra-se as frações retiradas da cromatografia de troca iônica, observa-se a presença de uma banda principal de, aproximadamente, 32 kDa (mostrada pela flecha horizontal) o que confirma o alto grau de purificação obtido no processo, apresentado pela Tabela 16. As linhas horizontais, à esquerda da Figura, apontam as bandas (de cima para baixo) de 116kb, 97kb, 66kb, 45kb, 36kb, 29kb, 24kb, 20,1kb e 14,2kb.

A protease produzida por *Streptomyces* sp. (Bono et al.,1996) apresentou peso molecular similar, de 33 kDa. Bressollier et al. (1999) apresentaram uma serina protease de menor peso molecular, produzida por *Streptomyces albidoflavus* (18 kDa). Da mesma forma, Boguslawski et al. (1982) descreveram a protease produzida por *Flavobacterium arborescens* que possuía peso molecular de 19 kDa.

#### **4.4.3.4 Determinação da presença dos íons $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$**

O resultado obtido através da análise de espectrofotometria de absorção da enzima purificada pelo processo citado anteriormente detectou a presença de traços dos metais  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que, provavelmente, pertençam ao sítio ativo da protease em questão.

## 4.5 Aplicação da protease como agente de modificação da proteína de soja

### 4.5.1 Avaliação do potencial proteolítico da enzima

A Tabela 17 apresenta os valores obtidos para a análise de atividade enzimática realizada com a enzima produzida, após precipitação com sulfato de amônio e posterior diálise, e com as enzimas comerciais, papaína, tripsina, alcalase e pronase V. A análise foi feita com 1 mg de cada enzima, diluída em 1 ml de água destilada.

Os resultados obtidos, demonstraram que a metaloprotease produzida pelo *Microbacterium* sp. kr10 possui um potencial proteolítico superior ao das enzimas comerciais papaína, alcalase e pronase V e, além disso, demonstrou atividade contra diversos substratos protéicos (Tabela 10) sugerindo que esta enzima pode ser uma opção para uso como agente modificador de proteínas de interesse industrial.

TABELA 17: Atividade proteolítica da enzima produzida frente a enzimas comerciais.

Enzima Analisada	Atividade Enzimática (U/mg)
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	300,80
Tripsina	1542,08
Papaína	145,00
Alcalase	36,9
Protease V	26,5



#### 4.5.2 Determinação do grau de hidrólise da proteína de soja

A Figura 18 mostra o grau de hidrólise da proteína de soja tratada com diferentes concentrações de substrato. O grau de hidrólise resultou em valores crescentes à medida que a razão E/S foi aumentada até 1,0%. A partir deste valor, não houve diferença significativa para o grau de hidrólise.

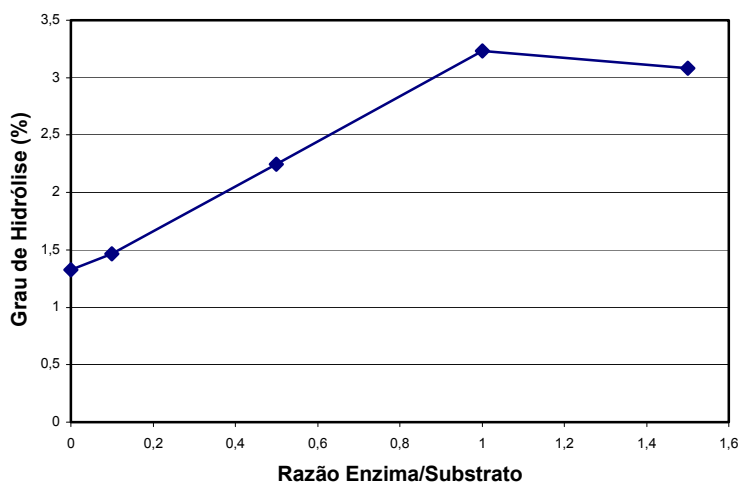


FIGURA 18: Grau de hidrólise da proteína de soja tratada com diferentes proporções da enzima produzida. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

O hidrolisado de razão E/S de 1,0% gerou um aumento no grau de hidrólise de, aproximadamente, 2% , quando comparado à proteína de soja não tratada (razão E/S nula). Este aumento não é considerado muito significativo, entretanto, através deste, conseguiu-se incrementar propriedades funcionais

(apresentadas nos itens seguintes) que têm importância para a indústria de alimentos, principalmente.

Da mesma forma, Adler & Nissen (1983), conseguiram por hidrólise de um concentrado de soja com 3-5% de grau de hidrólise, através da enzima alcalase, uma proteína com aumento da estabilidade, assim como, aumento da capacidade de formação de espuma.

#### **4.5.3 Avaliação da capacidade de formação de espuma**

A Figura 19 mostra a capacidade de formação de espuma obtida através da agitação dos hidrolisados de diferentes razões E/S, a 3% (diluídos no mesmo tampão), durante 3 minutos em mixer (~6000 rpm).

Os resultados obtidos demonstraram que a protease utilizada causa redução de capacidade de formação de espuma à medida que se aumenta a razão E/S. Esta capacidade que a enzima apresentou pode ser utilizada por indústrias que necessitem do emprego de agentes anti-espumíferos, com o objetivo de reduzir a espuma formada durante o processo, devido ao possível comprometimento que esta pode proporcionar aos equipamentos utilizados. Contrariamente ao resultado obtido, Don et al., (1991) obtiveram aumento da capacidade de formação de espuma para o concentrado protéico de soja hidrolisado por uma protease bacteriana produzida por *Bacillus subtilis*.

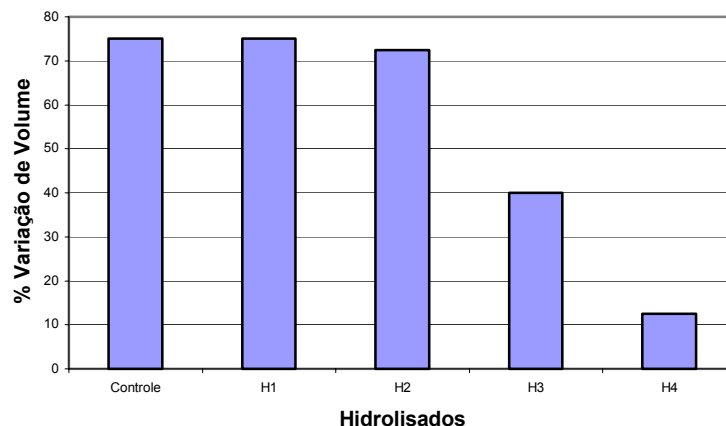


FIGURA 19: Porcentagem da variação de volume na proveta dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima produzida após agitação. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

#### 4.5.4 Avaliação da capacidade emulsificante

O hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H2) apresentou a capacidade emulsificante mais pronunciada, assim como a melhor estabilidade da emulsão formada com óleo de soja (Figura 20), quando comparado aos outros hidrolisados. Estas propriedades foram incrementadas quando este foi submetido a tratamento térmico (Figura 21) e a alta concentração de sal (Figura 22). Os hidrolisados 1 e 3 apresentaram perfil semelhante ao hidrolisado 4. O valor da ordenada no tempo zero é relativo à capacidade emulsificante e a meia vida da turbidez inicial reflete a estabilidade da emulsão. Nenhuma alteração na capacidade emulsificante foi observada quando este foi submetido a um tratamento sob condições ácidas, sendo a estabilidade da emulsão diminuída nestas condições, conforme observa-

se na Figura 23. Através destas propriedades apresentadas, a enzima produzida por *Microbacterium* sp. kr10 pode ser aplicada para modificação da proteína de soja, resultando em melhoria de propriedades funcionais, mesmo sob condições, normalmente encontradas no processamento de alimentos, como de altas concentrações de sal e tratamento térmico. Resultado similar foi observado por Kato et al. (1993) para o conjugado de proteína de clara do ovo e um polissacarídeo (galactomana).

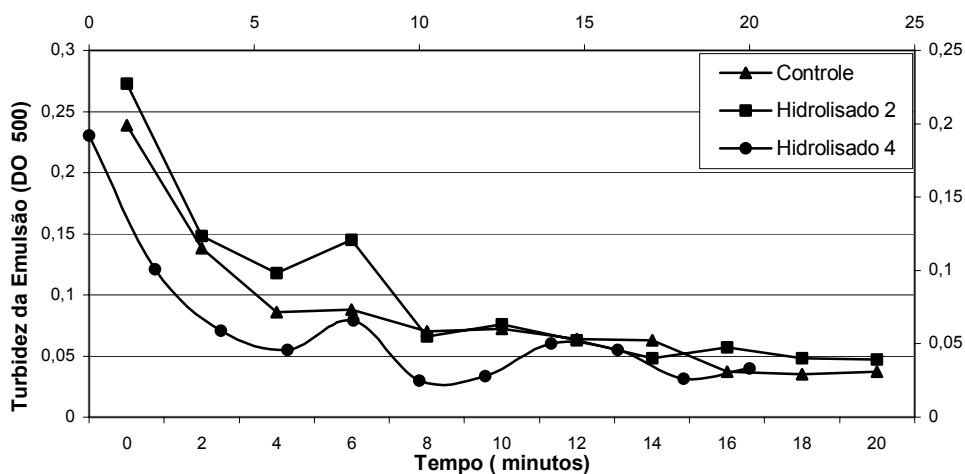


FIGURA 20: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima produzida. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

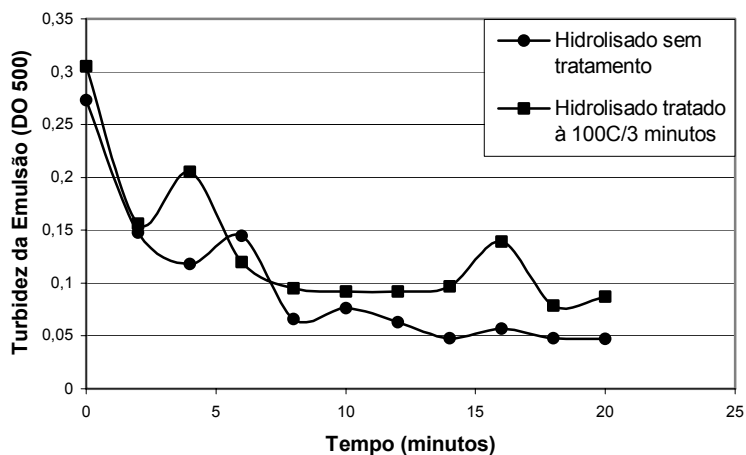


FIGURA 21: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H2) tratado termicamente (100°C/3 minutos). Cada ponto representa uma média de duas repetições.

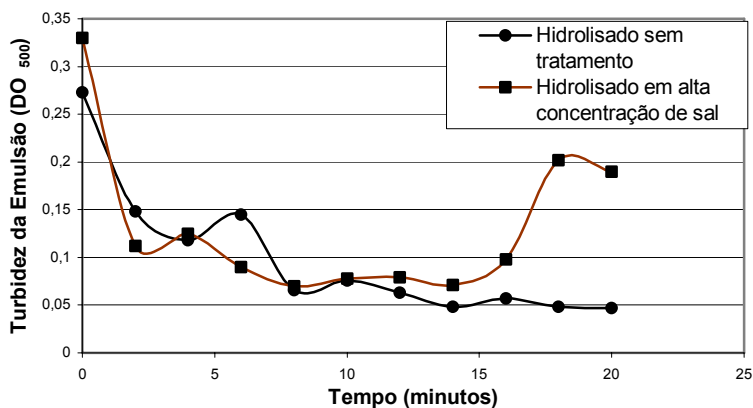


FIGURA 22: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H2) sob condições de alta concentração de sal. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

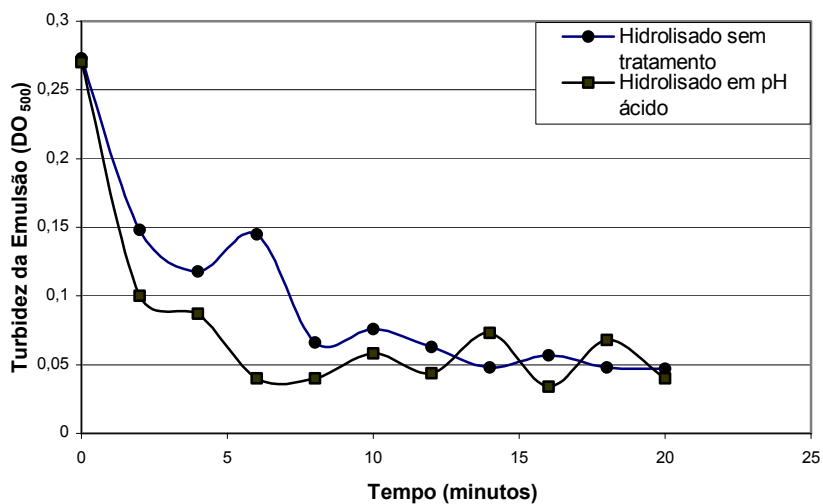


FIGURA 23: Capacidade emulsificante do hidrolisado de razão E/S de 0,5% (H2) sob condições ácidas. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

#### 4.5.5 Avaliação da capacidade de absorção de óleo

O hidrolisado de razão E/S de 0,5% (2) apresentou a máxima absorção de óleo após 1 hora (Figura 24). Não observou-se diferença entre os hidrolisados após 15 horas.

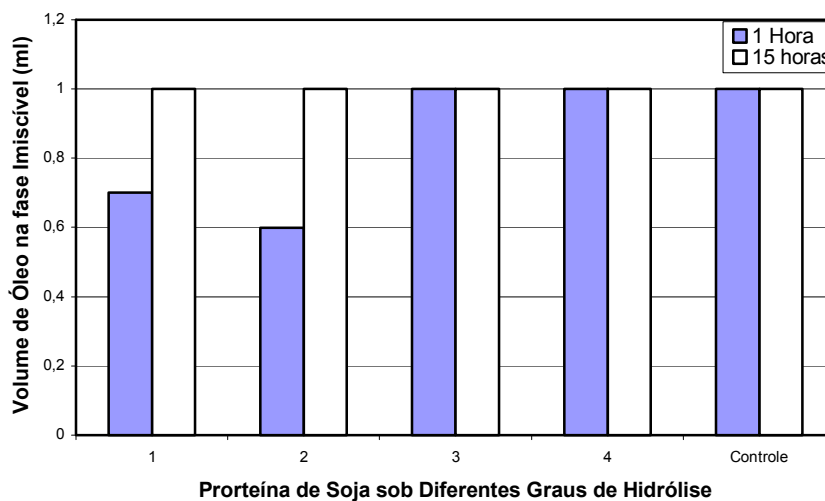


FIGURA 24: Capacidade de absorção de óleo da mistura formada pelos hidrolisados sob diferentes graus de hidrólise e óleo de soja, após 1 e 15 horas.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento:

1- O microrganismo selecionado, identificado como *Microbacterium* sp.Kr10, demonstrou em pH 7,0, temperatura de 25°C e 12,5g/l de farinha de pena as condições ótimas para a produção de protease.

2- A protease produzida apresentou atividade máxima nos intervalos de pH de 6,5 a 7,5 e de temperatura entre 45 e 55°C, caracterizando uma protease neutra. Este resultado foi observado tanto na enzima presente no extrato cru, quanto quando parcialmente purificada.

3- A enzima proteolítica em questão foi inibida pelo EDTA, apresentando caráter de metaloprotease. Este resultado foi observado tanto na enzima presente no extrato cru, quanto quando parcialmente purificada.

4- Um fator de purificação de 249,9 foi obtido quando se submeteu o sobrenadante do cultivo aos processos de cromatografia de gel filtração e cromatografia de troca iônica.



5- A protease mostrou potencialidade como agente de modificação da proteína de soja, gerando um grau de hidrólise máximo quando a relação enzima/substrato foi de 1,0%.

6- A enzima apresentou capacidade antiespumífera quando o hidrolisado protéico foi agitado, frente à mesma agitação sofrida pela solução de soja que não foi submetida à hidrólise via protease.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINARAYANA, K.; et al. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, p.1-8, 2003.

ANWAR,A. e SALEEMUDDIN,M.. Alkaline Proteases: A Review. **Bioresource Technology** , Essex, v.64, p. 175-183,1997.

AULD, D.S. Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 248, p. 228-242, 1995.

BARROS NETO, B., SCARMINIO,I.S. e BRUNS,R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**.Campinas: Unicamp,1995.2ed.

BEG, Q.K.; SAHAI, V. e GUPTA, R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in bioreactor. **Process Biochemistry**, London, v.39, p.203-209, 2003

BERNARDI, D. L.S.; PILOSOFF, A.M.R. e BARTHOLOMAI, G.B. 1990. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of American Oil Chemical Society**, New York, v. 68, no.2, p.102-105, 1991.

BEYNON, R.J. e BOND,J.S. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1996. 257p.

BOCHINI,D.A. et al.. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochemistry**, London, v.38,n.5,p.727-731,2002.

BOGULAWSKI,G., SHULTZ,J.L. e YEHLE,C.O.. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 132, p.41-49, 1983.

BONO, F. et al. Purification and characterization of a novel protease from culture filtrates of a *Streptomyces* sp. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, p. 213-220, 1996.

- BRESSOLLIER,P. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serina proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65,n.6, p.2570-2576, 1999.
- CALDAS, C., CHERQUI,A., PEREIRA,A. e SIMÕES,N.. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.3, p.1297-1304, 2001.
- CHAIA, A.A., et al. Identification and properties of two extracellular proteases from *Brevundimonas diminuta*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31,n.1, p.1517-1527, 2000.
- CHAN, L., JINGHUA, B.; ZHAOLING, C. e FAN, O. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.93. p. 27-34, 2001.
- CORDLE, C.T.. Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.72-76,1994.
- CRUEGER,W. E CRUEGER, A. Biotecnologia: **Manual de Microbiologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 1993.413 p.
- DONALD, P.;MILLER, E. e SCHIRMER, B.. Repletion of Nutritional Parameters in Surgical Patients Receiving Peptide Versus Amino Acid Elemental Feedings. **Nutricional Research**, London, v.14, p.3-12, 1994.
- FRIEDMAN, M. e BRANDON, D.L. Nutricional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.3, p.1069-1086,2001.
- GUERARD,F., GUIMAS,L. e BINET,A.. Production of tuna waste hidrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis**, Lausanne, v.19-20, p.489-498, 2002.
- GUERRA,N.P. e PASTRANA,L. Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.23, p.609-612, 2001.
- HAYASHI,K.,CLIFFE,A.J. e LAW,B.A.. Purification and preliminary characterization of five serina proteinases produced by *Brevibacterium linens*. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.25,p.180-187,1990.

IMAI, K., TAKEUCHI, M. e BANNO, I. Reclassification of "*Flavobacterium arborescens*" (Frankland and Frankland) Bergey et al. in the Genus *Microbacterium* (Orla-Jensen) Collins et al., as *Microbacterium arborescens* comb.nov., nom.rev. **Current Microbiology**, New York, v. 11, p.281-284, 1984.

JOHNVESLY, B. e NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p.139-144, 2001.

KATO, A., MINAKI, K. e KOBAYASHI, K. Improvement of emulsifying properties of egg proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.41, n.4, p.540-543, 1993.

KOLE, M.M.; DRAPER, I. e GERSON, D.F. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, Chicago, v.41, 196-206, 1998.

LI, C. et al. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.93, p.27-34, 2002.

LIMA, D.P.; CAMARGO, C.R.O. e PONEZI, A.N.. Efeito da Adição de Proteases na Solubilidade de Proteínas da Massa do Cracker. **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, p.1750-1752, 1998.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

LUSTERIO, D.D. et al. Alkali-resistant, alkaline endo-1,4-b-glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, Tokyo, v.56, p.1671-1672, 1992.

MACFADDIN, J.P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000.

MILES, A.A.L., MISSA, S.S.. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MOON, M.W. et al. Cloning and expression of the *ccpA* gene encoding catabolite control protein from *Thermoactinomyces* sp. E79. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, Tokyo, v.64, p.2254-2258, 2000.

NEHETE P.N.; SHAH, V.D. e KOTHARI, R.M.. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.7, p.413-418, 1985.

OH, S. et al. Optimizaing conditions for the growth of *Lactobacillus caseis* YIT 9018 in tryptone-glucose medium by using response surface methodology. **Applied and Environmental. Microbiogy**, Washington, n.61, p.3809-3814, 1995.

PURI, S.; BEG, Q.K. e GUPTA, R. Optimization of aldaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, New York, n. 44, p. 286-290, 2001.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, n.3, p. 597-635, 1998.

RATTRAY,F.P. e FOX, P.F.. Purification and characterization of an intracellular aminopeptidase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. **Applied and Environmental. Microbiogy**, Washington, v.77, p.169-180,1996.

RATTRAY,F.P. e FOX, P.F.. Recently identified of *Brevibacterium linens* ATCC 9174 – A Review. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.22, p.353-373,1998.

RATTRAY,F.P., BOCHELMANN,W. e FOX, P.F.. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. **Applied and Environmental. Microbiogy**, Washington, v.61,n.9, p.3454-3456, 1995.

RIFFEL, A. **Isolamento, identificação e caracterização de uma nova bactéria queratinolítica..** Porto Alegre: UFRGS, 2002. 84 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 179, p.258-265, 2003.

SANGALI,S. e BRANDELLI,A. Feather keratin hydrolisis by a *Vibrio* sp.kr2 strain. **Journal of Applied Microbiology**,Oxford, v.89, p.735-743,2000.

SCOPES,R.K. **Protein Purification**. New York: Springer Verlag. 1992. 282p.

SCRIBAN, R. et al. **Biotechnologia**.São Paulo: Manole,1985. 489p.

SECADES, P. e GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of a extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckery* and Effect of culture conditions on production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.9, p.3969-3979, 1999.

SECADES, P., ALVAREZ, B. E GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, grow-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.6, p.2436-2444, 2001.

SNEATH et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**.8ed. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 1984.2v.

SOARES, L.H. B. et al. Utilização da carne mecanicamente separada de aves na produção de proteína hidrolisada solúvel com enzimas microbianas. **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.3, p.1537-1540, 1998.

TAKAMI, H.; AKIBA, T. e HORIKISHI, K.. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.34, p.157-162, 1990.

TOMASCHOVÁ, J. et al. Purification and characterization of extracellular proteinase produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9147. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 4, p.499-503, 1998.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia** 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

TREVAN, M.D., BOFFEY, S., GOULDING, K.H. e STANBURY, P. **Bioteconología: Principios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990. 284p.

VARELA, H. et al. Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhearing activity. **Work Journal Microbiology Biotechnology**, London, n.12, p.643-645, 1996.

WANG, J.J. e SHIH, JCH. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, n.22, p.608-616, 1999.

WEBB, K.E.. Intestinal Absorption of Protein Hydrolysis Products: A Review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.68, p.3011-3022, 1990.

WEST, S.E.H., SAMPLE, A. K. E RUNYENJANECKY, J. The VFR gene-product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-A and protease production, belongs to the cyclic-AMP receptor protein family. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.7532-7542, 1994.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991. 444p.

YUNO-OHTA, N.; TORYU, H.; HIGASA, T.; MAEDA, H.; OKADA, M. e OHTA, H. Gelation properties of ovalbumin as affected by fatty acid salts. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, p.906-910, 1996.

**APÊNDICES****Ágar Leite (AL)**

Componentes	g.l <sup>-1</sup>
Peptona de Carne	5,0
Extrato de Levedura	3,0
Ágar	12,0
Leite Desnatado	10,0
Água Destilada	1000 ml

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C  
Ajustar pH desejado.



**Caldo Farinha de Pena (CFP)**

Componentes	g.l <sup>-1</sup>
NaCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Farinha de Pena de Frango	10,0
Água Destilada	1000 ml

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C  
Ajustar pH desejado.

## CURRICULUM VITAE

### ASPECTOS PESSOAIS

Nome: Roberta Cruz Silveira Thys

Data de Nascimento: 27/04/1978

Local de Nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil

Filiação: Carlos Alberto Silveira Thys e Lavínia Mercedes Cruz Thys

End.: R. Barão do Amazonas, 209 ap. 501 - Porto Alegre/RS. CEP: 90670-003

End. de correio eletrônico: betathys@hotmail.com

### FORMAÇÃO

Primeiro Grau: Colégio Farroupilha

Segundo Grau: Colégio Farroupilha

Terceiro Grau: Engenharia de Alimentos -UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Pós-Graduação:

1) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Mestrado) / Ênfase: Microbiologia de Alimentos – UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

2) Programa Gaúcho de Qualidade e Produtividade (Especialização em Melhoria da Qualidade) – CQIA (Certified Quality Improvement Associate)/ASQ (American Society of Quality)

### ATIVIDADES PROFISSIONAIS

1) Indústria de Alimentos Omedeto S.A. - Seven Boys (Porto Alegre)

Estagiária na área de produção e desenvolvimento de produtos

Período: mar/2000 a dez/2000

2) Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- Bolsista Iniciação Científica

Período: 1998-1999

- Estágio Docente/ Disciplina de Bioquímica de Alimentos

Período: 1º semestre/2002

- Professora substituta/Disciplinas: Processamento de Alimentos de Origem Vegetal, Tecnologia de Produtos de Origem Animal e Instrumentação e Controle na Indústria de Alimentos

Período: Atualmente

Início: dez/2003