

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA APLICAÇÃO
DE UMA PROTEASE ALCALINA PRODUZIDA POR *Cellulosimicrobium*
cellulans 191**

LUCIANA FERRACINI DOS SANTOS
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas - SP
Setembro/2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Sa59p Santos, Luciana Ferracini dos
Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação
de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium*
cellulans 191 / Luciana Ferracini dos Santos. – Campinas, SP:
[s.n.], 2004.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Proteases. 2.Enzimas. 3.Glucanas. I.Sato, Hélia Harumi.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

*À Thaís Carolina, minha filha,
ao Cassiano Ricardo, meu marido,
e à Maria Lurdes e Arnaldo, meus pais,
Com muito carinho,*

Dedico

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em ____ de _____ de 2004, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
DEA/FEA

Profa. Dra. Margarida Massami Yamaguchi
Unidade de Medianeira do CEFET/PR

Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitiz
Universidade Estadual de Feira de Santana/BH

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
ESALQ/Piracicaba

Prof Dra. Gláucia Maria Pastore
DCA/FEA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
DEA/FEA

AGRADECIMENTOS

À professora Hélia H. Sato, pela dedicação, carinho, amizade e presença sempre agradável.

Aos professores da banca examinadora.

À Deus por ter abençoado cada dia de dedicação a este trabalho, e pelas pessoas que durante estes últimos anos cruzaram o meu caminho e me trouxeram muito carinho e amizades verdadeiras.

À minha família, sem a qual nem um dia sequer deste trabalho teria sido possível e sem a qual nem um dia sequer da minha vida teria valido.

À meus grandes amigos, Amarilis, Mariane, Mariângela, Rodolfo e Sérgio Takabaiachi, pela grande ajuda em cada dia que cuidaram de minha filha durante a minha ausência, e por todos os momentos em que precisei de uma palavra de amizade e sabedoria.

À todos os amigos dos Laboratórios de Bioquímica de Alimentos e Bioaromas, em especial à Margarida, Severino, Bia, Mareci, Hermelinda, Cláudio, Biba, Márcia, Haroldo, Luciana Fleuri, Denise, Luciana Bittar, Luciana Liboni, Cristina Ferraz, Fernanda, Gisele, Daniela, Priscila, Vânia, Gaby, Fifa, Eliane e a todos aqueles que colaboraram indiretamente com este trabalho.

À professora Gláucia M. Pastore pelo apoio e disponibilização do equipamento FPLC e à RECOPE, financiadora do mesmo.

Aos técnicos, Guilherme, Cléber, Marcelo Funo e Dora.

À Capes pela concessão da bolsa.

Aqueles cujos nomes não foram citados mas que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	x
Resumo	xii
Summary	xiv
Objetivos	xviii
Introdução	1
 CAPÍTULO 1 - Proteases alcalinas produzidas por microrganismos - Revisão Bibliográfica	 3
 Resumo	 3
Introdução	3
Microrganismos produtores de protease alcalina	4
Proteases produzidas por microrganismos que lisam a parede celular de leveduras	5
Produção de protease alcalina	9
Características bioquímicas de algumas proteases alcalinas	12
Algumas proteases alcalinas comerciais	14
Aplicação de proteases alcalinas	14
Conclusões	19
Referências Bibliográficas	20
 CAPÍTULO 2 - Otimização do meio de cultura para a produção de protease por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	 26
 Resumo	 26
Introdução	26
Material e métodos	27
Material	27
Produção da protease	27
Determinação da atividade de protease	28
Planejamento experimental fracionário (2^{8-3}) para a estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultura	28
Planejamento experimental completo para a otimização do meio de cultura	29

Planejamento experimental completo para a otimização das condições de fermentação	30
Cinética de crescimento e produção da protease no meio de cultura otimizado	30
Resultados e discussão	32
Atividade de protease no meio de cultura descrito por SCOTT & SCHEKMAN (1980)	32
Planejamento experimental fracionário (2^{8-5}) para a estimativa do efeito de cada componente do meio de cultura	32
Planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura	34
Planejamento experimental completo 2^2 para a otimização das condições de fermentação	37
Cinética de crescimento e produção da protease no meio de cultura otimizado	39
Conclusões	41
Referências Bibliográficas	42
 CAPÍTULO 3 - Purificação e caracterização de uma protease alcalina produzida por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	 44
Resumo	44
Introdução	44
Material e métodos	45
Material	45
Produção de protease	45
Determinação da atividade de protease	46
Determinação da atividade de outras enzimas na preparação enzimática bruta	46
Determinação da atividade de glucanase	46
Determinação da atividade de celulase	47
Determinação da atividade de quitinase	47
Fracionamento da protease com sulfato de amônio	48
Purificação da protease em coluna de DEAE-Sepharose	48
Purificação da protease em coluna de Q-Sepharose	49
Determinação da massa molecular	49
Determinação de K_m e $V_{máx}$	49
Efeito de alguns sais e compostos químicos na atividade da protease purificada	50
Planejamento experimental para a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada	50
Planejamento experimental para a determinação do efeito da temperatura e do	51

pH na estabilidade da protease purificada	
Resultados e discussão	52
Determinação das atividades de algumas enzimas produzidas no extrato enzimático bruto	52
Fracionamento da protease com sulfato de amônio	52
Purificação da protease em coluna de DEAE-Sepharose e Q-Sepharose	53
Determinação da massa molecular	56
Determinação do Km e V _{máx}	57
Efeito de alguns sais e compostos químicos na atividade da protease purificada	58
Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada	60
Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade da protease purificada	64
Conclusões	71
Referências Bibliográficas	72
 CAPÍTULO 4 - Aplicação da protease alcalina de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 no isolamento de polissacarídeos da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
 Resumo	74
Introdução	74
Material e métodos	77
Determinação da atividade de protease	77
Determinação da atividade de β -1,3-glucanase	77
Aplicação da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191 na lise celular de levedura	78
Aplicação da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191 na obtenção de polissacarídeos da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	79
Obtenção da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> extraída mecanicamente	79
Extração de lipídeos da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
Extração da glucana bruta à quente	81
Precipitação da manana-proteína com etanol	81
Tratamento da glucana bruta liofilizada com a protease alcalina de <i>C. cellulans</i> 191	81
Hidratação e tratamento das glucanas bruta e purificada com ultrassom	82
Tratamento da manana-proteína com a protease alcalina de <i>C. cellulans</i> 191	82
Determinação da atividade antioxidante	82

Métodos analíticos	83
Determinação de carboidratos totais	83
Determinação do conteúdo de proteína	84
Resultados e discussão	85
Aplicação da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191 na lise da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	85
Aplicação da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191 na obtenção de polissacarídeos da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	85
Extração de lipídeos da parede celular da levedura	85
Tratamento à quente para obtenção da glucana bruta	86
Tratamento da glucana bruta liofilizada com a protease alcalina de <i>C. cellulans</i> 191	87
Tratamento das glucanas bruta e purificada de <i>S. cerevisiae</i> com ultrassom	88
Tratamento da manana-proteína com a protease alcalina purificada de <i>C. cellulans</i> 191 e estudo da atividade antioxidante	90
Conclusões	92
Referências Bibliográficas	93
Conclusões Finais	95
Sugestão para Trabalhos Futuros	97

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 -	Alguns <i>Bacillus</i> produtores de protease alcalina	4
Tabela 1.2 -	Alguns fungos produtores de proteases alcalinas	5
Tabela 1.3 -	Temperaturas de fermentação e pH do meio de cultura para a produção de proteases alcalinas de alguns microrganismos	11
Tabela 1.4 -	Temperatura e pH ótimos de atividade de algumas proteases alcalinas	13
Tabela 1.5 -	Algumas proteases alcalinas comerciais e seus fabricantes	15
Tabela 2.1 -	Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fracionário $2^{(8-3)}$	29
Tabela 2.2 -	Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura	29
Tabela 2.3 -	Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^2 para a otimização das condições de fermentação	30
Tabela 2.4 -	Matriz do planejamento experimental fracionário 2^{8-3} e os resultados obtidos para cada ensaio de produção de protease de <i>C. cellulans</i>	33
Tabela 2.5 -	Estimativa dos efeitos de variáveis do planejamento experimental fracionário 2^{8-3}	34
Tabela 2.6 -	Matriz do planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura e resultados obtidos	35
Tabela 2.7 -	Análise de variância do planejamento experimental completo para a otimização do meio de cultura	35
Tabela 2.8 -	Matriz do planejamento experimental completo 2^2 para a otimização das condições de fermentação e resultados obtidos	38
Tabela 2.9 -	Análise de variância do planejamento experimental para a otimização das condições de fermentação	38
Tabela 3.1 -	Níveis das variáveis do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade	51
Tabela 3.2 -	Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental para determinação da estabilidade da protease purificada	51
Tabela 3.3 -	Precipitação fracionada da protease com sulfato de amônio	52
Tabela 3.4 -	Purificação da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	55

Tabela 3.5 -	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 para a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada	61
Tabela 3.6 -	Efeitos das variáveis temperatura e pH sobre a atividade da protease purificada	61
Tabela 3.7 -	Análise de variância para o planejamento experimental fatorial 2^2 para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade	62
Tabela 3.8 -	Matriz dos planejamentos experimentais 2^2 para a determinação da estabilidade da protease purificada tratada por 1 hora ou 4 horas nas condições apresentadas	64
Tabela 3.9 -	Análises de variância dos efeitos do pH e da temperatura na estabilidade da protease após os tratamentos por 1 hora na presença de cisteína (5 mM)	66
Tabela 3.10 -	Análise de variância do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease purificada após tratamento por 1 hora na presença de DTT (10 μ g/mL)	67
Tabela 3.11 -	Análise de variância do efeito do pH e temperatura na estabilidade da protease após tratamento por 4 horas na presença de cisteína (5 mM)	68
Tabela 3.12 -	Análise de variância do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease purificada após tratamento por 4 horas na presença de DTT (10 μ g/mL)	69
Tabela 4.1 -	Rendimento e composição da glucana da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> durante o processo de isolamento	87
Tabela 4.2 -	Porcentagem de carboidratos totais solubilizados pelo tratamento em ultrassom de amostras de glucana antes e depois do tratamento enzimático, sem tratamento de hidratação	88
Tabela 4.3 -	Porcentagem de carboidratos totais solubilizados pelo tratamento em ultrassom de amostras de glucana pré-hidratada antes e depois do tratamento enzimático.	89

Lista de Figuras

Figura 2.1 -	Superfície de resposta para a otimização do meio de cultura para a produção de protease de <i>C. cellulans</i> 191	36
Figura 2.2 -	Superfície de resposta das condições de fermentação para a produção de protease de <i>C. cellulans</i> 191	39
Figura 2.3 -	Cinética de crescimento e produção de protease por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 no meio de cultura otimizado	40
Figura 3.1 -	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- Sepharose da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	53
Figura 3.2 -	Cromatografia de troca iônica em coluna de Q- sepharose da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	54
Figura 3.3 -	Determinação da massa molecular da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 através de cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200	56
Figura 3.4 -	Determinação das constantes Km e Vmáx da protease purificada de acordo com o gráfico de Lineweaver- Burk	58
Figura 3.5 -	Efeito de alguns sais na atividade da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191	59
Figura 3.6 -	Efeito de alguns compostos químicos na atividade da protease purificada de <i>C. cellulans</i> 191	60
Figura 3.7 -	Superfície de resposta do efeito da temperatura e do pH na atividade da protease purificada de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	63
Figura 3.8 -	Área de contorno do efeito da temperatura e do pH na atividade da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	63
Figura 3.9 -	Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 1 hora na presença de cisteína (5 mM).	65
Figura 3.10 -	Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 1 hora na presença de DTT (10 µg/mL).	66
Figura 3.11 -	Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 4 horas na presença de cisteína (5 mM).	68

Figura 3.12 -	Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 4 horas na presença de DTT (10 µg/mL).	69
Figura 4.1 -	Procedimento para o isolamento dos compostos da parede celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> e testes	80
Figura 4.2 -	Índice de antioxidação da manana- proteína tratada com a protease alcalina de <i>C. cellulans</i> 191	91

RESUMO

Cellulosimicrobium cellulans 191 é um microrganismo produtor de um complexo enzimático capaz de degradar a parede celular de leveduras, composto de enzimas β -1,3-glucanases, proteases e quitinases. Este microrganismo adere à célula de levedura e provoca sua lise. *C. cellulans* 191 foi isolado de resíduos de indústria de fermentação alcoólica. Células desidratadas de *Saccharomyces cerevisiae* foram usadas no meio de cultura como indutor para a produção da protease. O meio de cultura inicial era composto por 1% de células de *S. cerevisiae* desidratadas; 13,6 g/L de KH_2PO_4 ; 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g/L de KOH; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/L de biotina e 1mg/L de tiamina. Realizou-se um planejamento experimental fracionário 2^{8-3} cujas variáveis independentes foram os componentes do meio de cultura inicial, este planejamento mostrou que os componentes KH_2PO_4 , KOH e o indutor apresentaram efeito estatisticamente significativo na atividade de protease do meio de cultura. Um planejamento experimental 2^2 foi realizado usando-se dois fatores, pH e porcentagem de células desidratadas de levedura. Os resultados mostraram que o meio de cultura para a máxima produção de protease seria composto por 8% de células desidratadas de levedura; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em solução tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0. A maior produção de protease foi obtida quando a fermentação ocorreu em temperaturas entre 20 e 27 °C, após 24 horas de fermentação. A produção da protease foi aumentada cerca de 36 vezes após a otimização do meio de cultura e das condições de fermentação. Para a produção de protease, a linhagem de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi fermentada no meio de cultura otimizado em frascos agitados a 27°C durante 24 horas a 150 rpm. Para a extração da protease extracelular, o sobrenadante do meio de cultivo foi saturado com 40% de sulfato de amônio. O precipitado foi coletado por centrifugação e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até 80% de saturação. O precipitado contendo a protease foi coletado por centrifugação, dialisado e purificado por cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose e Q-Sepharose. O fator de purificação obtido foi

de 16,8 e o rendimento foi 7,8%. A massa molecular da protease purificada foi estimada em 55 KDa por cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200. A protease apresentou temperatura e pH ótimos de 7,0 a 8,0 e de 50 a 64°C, respectivamente. A protease foi estável em uma faixa de pH de 4,0 a 7,5 após uma hora a 83°C quando estabilizada por DTT. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da protease foram 0,027 mg de caseína /mL e $V_{m\acute{a}x}$. de 6,25 U/mg de enzima, respectivamente. A protease purificada foi ativada por 1 mM de $FeCl_3$ e parcialmente inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSP). A protease purificada foi capaz de lisar células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*. A aplicação desta protease no isolamento de componentes da parede celular de levedura foi estudada. A glucana é o principal componente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Nos processos convencionais para o isolamento desse polissacarídeo, são usadas condições de pH extremas que provocam sua degradação. Um método que combina tratamento físico e enzimático utilizando a protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi proposto. A glucana foi obtida com pureza de 87,4% e rendimento de 33,7%. Durante este processo, foi facilmente obtida a manana-proteína da parede celular de levedura.

SUMMARY

Cellulosimicrobium cellulans 191 is a microorganism that produces an enzyme complex capable of disrupting yeast cell walls, which is composed of β -1,3-glucanase, protease and chitinase. This microorganism adheres to yeast cell walls and then lyses them. It was isolated from industrial fermentation sludge. Dried *Saccharomyces cerevisiae* cells were used in the culture medium as an inductor for protease production. The initial culture medium was composed of 1% of dried cells of *S. cerevisiae*; 13.6 g/L of KH_2PO_4 ; 2.0 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4.2 g/L of KOH; 0.2 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.001 g/L of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/L of biotin and 1 mg/L of thiamine. A 2^{8-3} experimental design was performed, the independent variables being the components of the initial culture medium. The components KH_2PO_4 , KOH and the inductor showed a significant effect on the protease activity of the culture medium. A new (2^2) design was performed using two factors, pH and the percentage of dried yeast cells. The results showed that the culture medium indicated for maximum protease production was composed of 8% of dried yeast cells; 0.2 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.0 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in a 0.15M phosphate buffer at pH 8.0. The highest protease production was obtained after 24 hours of fermentation of the microorganism at temperatures between 20 and 27°C. Protease production was increased about 36 times after optimization of the culture medium and the fermentation conditions. For protease production, *Cellulosimicrobium cellulans* 191 was grown on the optimized culture medium at 28°C for 24 hours with agitation at 150 rpm. The cells were collected by centrifugation and 40% of ammonium sulfate added to the supernatant. The precipitate was collected by centrifugation and ammonium sulfate added to the supernatant up to 80% saturation. The precipitate, which contained the protease, was collected by centrifugation, dialyzed and purified by DEAE-Sepharose and Q-Sepharose chromatography. The purification factor was 16.8 and the yield was 7.8%. The molecular mass of the purified protease was estimated at around 55 kDa by gel filtration on Sephacryl S-200. The optimum pH and temperature ranged from 7.0 to 8.0 and from 50 to 64°C, respectively. When stabilized with

DTT, the protease was stable in the pH range from 4.0 to 7.5 for one hour at 83°C. The kinetic parameters K_m and V_{max} were 0.027 mg of casein/mL and 6.25 U/mg of enzyme, respectively. The purified protease was activated by 1.0 mM of $FeCl_3$ and partially inhibited by phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). The protease was capable of lysing viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* alone. The application of this alkaline protease in the isolation of yeast cell wall compounds was studied. Glucan is the major component of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Over the last few years, numerous benefits of glucan have been described with respect to human health. Conventional isolation processes involving extreme conditions of pH cause degradation of the polymeric chains. A method combining physical extraction steps and enzymatic treatment using the alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans* 191 was proposed in this study, obtaining glucan with a purity of 87.4% and a yield of 33.7%. During this process, the mannoprotein of the yeast cell wall was easily obtained.

OBJETIVOS

1. Otimizar os componentes do meio de cultivo e as condições de fermentação para a maior produção de protease alcalina por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 utilizando-se a metodologia de planejamento experimental e superfície de resposta.
2. Purificar e determinar as características bioquímicas de uma protease alcalina produzida no meio de cultura otimizado.
3. Estudar a aplicação da protease alcalina purificada na lise da parede celular de levedura e no isolamento de glucana da parede celular de *S. cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas usados industrialmente (SINGH *et al.*, 2003). A aplicação de proteases alcalinas é bastante ampla, são utilizadas na indústria de detergentes, no tratamento de couro para a confecção de roupas, na recuperação da prata de filmes fotográficos e de filmes de raio X, na indústria farmacêutica, no tratamento de resíduos de indústrias de alimentos, na obtenção de peptídeos funcionais, entre outros (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Nos últimos anos, o uso de proteases alcalinas como catalisador industrial tem aumentado. Essas enzimas apresentam alta capacidade catalítica, alto grau de especificidade de substrato e são economicamente viáveis (CHEN *et al.*, 1995).

Na indústria de alimentos, as proteases alcalinas podem ser usadas para a produção de hidrolisados protéicos a partir de proteínas vegetais ou animais, para o melhoramento da digestibilidade, biodisponibilidade e funcionalidade destes produtos.

As proteases alcalinas microbianas para uso comercial ou industrial são obtidas principalmente de bactérias e fungos. Os microrganismos do gênero *Bacillus* são os mais estudados como produtores dessas proteases e suas enzimas têm sido bastante exploradas comercialmente.

Devido à grande importância e aplicação das proteases alcalinas, encontram-se disponíveis no mercado produtos comerciais como Alcalase, Savinase, Opticlean, Maxatase, entre outros.

Estima-se que trinta a quarenta por cento do custo da produção industrial de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura (JOO *et al.*, 2002). Considerando este fato, a possível utilização de resíduos industriais de baixo custo na composição do meio de cultura para a produção de proteases alcalinas se tornou especialmente importante.

Os complexos enzimáticos produzidos por microrganismos que lisam a parede celular de leveduras apresentam geralmente atividade de protease, como foi descrito por VENTOM & ASENJO (1990), SAEKI *et al.* (1994) e recentemente por ADAMITSCH *et al.* (2003), mas suas proteases não tem sido muito estudadas.

Cellulosimicrobium cellulans 191 é um actinomiceto isolado de resíduos de indústria de fermentação alcoólica que é capaz de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Ele é produtor de um complexo enzimático que apresenta

atividade de β -1,3-glucanase, quitinase e protease alcalina. Este microrganismo demonstrou grande potencial como produtor de protease alcalina e esta enzima pode ser utilizada para a obtenção de polissacarídeos da parede celular de levedura.

A β -1,3-glucana é o principal componente da parede celular de leveduras. A maior parte das β -glucanas exibem atividade imunomodulatória. Devido a esta função biológica, este polissacarídeo pode exercer efeito benéfico contra uma série de doenças (SANDULÁ *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001).

FREIMUND *et al.* (2003) apresentaram um método de isolamento da β -1,3-glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza um processo físico combinado com um tratamento enzimático utilizando-se a protease alcalina comercial Savinase, produzida por *Bacillus lentus*. Este processo de isolamento da glucana gerou um outro produto também benéfico à saúde, a manana-proteína, que é um composto biologicamente ativo de grande interesse (KRIZKOVA *et al.* 2001; BYSTRICKY *et al.*, 2003).

KRIZKOVÁ *et al.* (2001) constataram que a manana da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta importantes características como boa solubilidade e massa molecular relativamente pequena (15-30 KDa) e boa atividade antioxidante.

Portanto, as proteases alcalinas de fonte microbiana apresentam grande potencial de aplicação. O estudo de novas proteases alcalinas microbianas que apresentem características diferenciadas podem dar origem a novos produtos comerciais e ampliar ainda mais as possibilidades de suas aplicações. Os estudos para a utilização de resíduos industriais, como a massa celular de leveduras, através do uso de proteases apresentam-se indispensáveis para agregar valor econômico aos processos dessas indústrias e para a manutenção do equilíbrio ambiental.

CAPÍTULO 1 - PROTEASES ALCALINAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS

Revisão Bibliográfica

Resumo

O interesse industrial por proteases alcalinas tem aumentado nos últimos anos. As proteases são um dos grupos mais importantes de enzimas produzidas comercialmente devido à grande possibilidade de aplicações que apresentam. Elas exibem, geralmente, alto grau de especificidade de substrato e alta capacidade catalítica. Sua produção em larga escala tem-se mostrado economicamente viável. As proteases alcalinas produzidas por microrganismos têm recebido atenção especial. A otimização dos parâmetros relacionados à produção tem sido estudada com o objetivo de obter a maior produtividade pelo menor custo. O estudo de novas aplicações para o aumento da biodisponibilidade de proteínas vegetais e para a obtenção de compostos com atividades biológicas aumentam a possibilidade de uso dessas enzimas na indústria de alimentos em geral.

Palavras-chave: protease alcalina, produção de enzimas, aplicação de proteases, caracterização bioquímica de proteases.

Introdução

As proteases alcalinas microbianas para uso comercial ou industrial são obtidas principalmente de bactérias e fungos.

Estima-se que trinta a quarenta por cento do custo da produção industrial de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura (JOO *et al.*, 2002). Considerando este fato, a possível utilização de resíduos industriais de baixo custo na composição do meio para a produção de proteases alcalinas se tornou especialmente importante.

A aplicação de proteases alcalinas é bastante ampla, elas são utilizadas na indústria de detergentes, no tratamento de couro para a confecção de roupas, na recuperação da prata de filmes fotográficos e de filmes de raio X, na indústria

farmacêutica, no tratamento de resíduos de indústrias de alimentos, na síntese de peptídeos funcionais, entre outros (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Microrganismos produtores de protease alcalina

Muitos dos microrganismos produtores de protease alcalina descritos na literatura são alcalofílicos, alguns foram isolados exatamente por apresentarem esta característica.

Entre as bactérias, os microrganismos do gênero *Bacillus* são os mais estudados como produtores de proteases alcalinas e suas enzimas tem sido bastante exploradas comercialmente. A Tabela 1.1 apresenta alguns bacilos produtores dessas proteases.

Tabela 1.1 - Alguns *Bacillus* produtores de protease alcalina.

<i>Bacillus</i>	Referência
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC21522	AEHLE <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GEORGE <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus sphaericus</i>	SINGH <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus pumilus</i> MK6-5	KUMAR, 2002
<i>Bacillus lentus</i>	DUINHOVEN <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus licheniformis</i>	ÇALIK <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14416	CHU <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus thuringiensis</i>	TYAGI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	JANG <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus horikoshii</i>	JOO <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus mojavenensis</i>	BEG & GUPTA, 2003

Bactérias gram negativas do gênero *Pseudomonas* (ZENG *et al.*, 2003) foram identificadas como produtoras de proteases alcalinas. ROMERO *et al.* (2001) relataram a produção de protease alcalina por *Serratia marcescens*.

Entre os fungos produtores de proteases alcalinas extracelulares destacam-se as linhagens de *Aspergillus* (Tabela 1.2).

Algumas leveduras como *Yarrowia lipolytica* (OGRYDZIAK, 1993 e LAMBERT *et al.*, 1997), *Candida* sp (OGRYDZIAK, 1993) e *Candida olea* (NELSON & YOUNG,

1987), e diferentes espécies de *Streptomyces* como *S. moderatus* (CHANDRASEKARAN & DHAR, 1987) também produzem protease alcalina.

Tabela 1.2 - Alguns fungos produtores de proteases alcalinas.

Fungo	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	JARAI <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus terreus</i>	HANZI <i>et al.</i> , 1993
<i>Aspergillus nidulans</i>	KATZ <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus oryzae</i>	MURAKAMI <i>et al.</i> , 1991
<i>Aspergillus parasiticus</i>	TUNGA <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HANZI <i>et al.</i> , 1993
<i>Conidiobolus coronatus</i> NCL86820	PHADATARE <i>et al.</i> , 1993
<i>Penicillium</i> sp	AGRAWAL <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizopus oryzae</i>	BANERJEE & BHATTACHARYYA, 1993

TOMASCHOVÁ *et al.* (1998) publicaram que o crescimento da bactéria *Brevibacterium lineus* na superfície de alguns tipos de queijo é essencial para o desenvolvimento de aroma, cor e textura típicos. Através da ação de enzimas secretadas por ele, como proteases alcalinas e lipases, muitos compostos de baixo peso molecular são formados produzindo o “flavour” típico.

Em alguns casos a protease alcalina produzida por microrganismos pode também ser termoestável. A termoestabilidade foi identificada em linhagens de *Bacillus licheniformis* (NEHETE *et al.*, 1986), *B. thermovulgaris* (VYBORNKYKH *et al.*, 1977), *B. stearothermophilus* (JANG *et al.*, 1992) e *Thermoactinomyces* SP-HS682 (TSUCHIYA *et al.*, 1991).

Proteases produzidas por microrganismos que lisam a parede celular de leveduras

Os complexos enzimáticos produzidos por microrganismos que lisam a parede celular de bactérias apresentam geralmente atividade de protease. Por exemplo, a β -protease lítica é uma das proteases secretadas pelo microrganismo lítico

Achromobacter lyticus que exibe atividade de protease e atividade bacteriolítica em pH alcalino (LI *et al.*, 1998).

Os microrganismos que são capazes de lisar a parede celular de leveduras produzem proteases além de outras enzimas como β -1,3-glucanases e quitinases. O estudo destas enzimas tem sido direcionado principalmente para a lise da parede celular de leveduras.

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é organizada em duas camadas que são compostas por quatro macromoléculas principais: manana-proteína, β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina. Estes componentes estão interligados por ligações covalentes. A manana-proteína corresponde a aproximadamente 30% do peso seco da parede celular, e compõe a camada mais externa da parede, estando ligada covalentemente a cadeias de β -1,6-glucana. A β -1,6-glucana corresponde à cerca de 5% do peso seco da parede, são moléculas relativamente pequenas com cerca de 140 resíduos de glicose. Mais da metade da parede celular é formada por β -1,3-glucana, que é composta predominantemente por moléculas lineares consistindo de cerca de 1500 resíduos de glicose, dos quais cerca de 40 a 50 resíduos estão envolvidos em ligações através do carbono C-6 com moléculas de β -1,6-glucana e quitina (KAPTEYN *et al.*, 1999).

Os microrganismos *Cytophaga johnsonii* (BACON *et al.*, 1970), *Arthrobacter luteus* (DOI *et al.*, 1973), *Flavobacterium dormitator* (NAGASAKI *et al.*, 1976), *Oerskovia* sp CK (OBATA *et al.*, 1977), *Rarobacter faecitabidus* (YAMAMOTO *et al.*, 1988), *Rarobacter incanus* (YAMAMOTO *et al.*, 1993) produzem enzimas capazes de lisar células de leveduras. Estes microrganismos tem sido isolados de sistemas de tratamento de água de indústria de alimentos e bebidas alcoólicas.

HANTER & ASENJO (1988) apresentaram um modelo que considera a lise da célula de levedura como passos progressivos de ruptura de estruturas celulares, começando pela superfície externa e progredindo pelas estruturas celulares dentro do protoplasma. Cada passo é consequência direta da estrutura da parede celular.

OBATA *et al.* (1977) identificaram e estudaram as enzimas proteolíticas produzidas pelo microrganismo *Oerskovia* sp CK. Este microrganismo é capaz de lisar células viáveis da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e produz uma protease alcalina.

A atividade proteolítica foi máxima em pH 9,0 e mostrou-se estável em temperaturas até 60°C por 15 minutos em pH acima de 2,0, mas foi completamente inativada a 70°C por 15 minutos.

Arthrobacter sp foi isolado por ROWLEY & BULL (1977) e identificado como uma bactéria que lisa célula de levedura. Seu extrato enzimático apresentou atividade de protease.

O complexo enzimático produzido por *Arthrobacter* GJM-1 durante o seu crescimento em meio de cultura contendo parede celular de levedura apresentou enzimas capazes de hidrolisar todos os componentes estruturais da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Este complexo enzimático apresentou dois tipos de endo- β -1,3-glucanases. A lise da parede celular isolada de levedura foi induzida apenas pela endo- β -1,3-glucanase que exibiu alta afinidade por glucana insolúvel. Esta enzima foi capaz de lisar células viáveis de *S. cerevisiae* apenas na presença de um fator adicional presente no extrato enzimático, que foi identificado como uma protease alcalina (VRSANSKÁ *et al.*, 1977).

FUNATSU *et al.* (1978) estudaram as propriedades da protease produzida por *Arthrobacter luteus* e suas funções na lise celular de leveduras. Esta protease foi inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto, que é um inibidor específico de serina protease. A inibição da protease provocou a inibição da lise celular, o que comprovou que a protease é essencial para a lise.

Zymolyase é uma preparação comercial produzida por *Arthrobacter luteus* usada para lisar a parede celular de leveduras. Em 1982, KITAMURA estudou a participação da protease durante a digestão da parede celular de levedura por Zymolyase. A protease, denominada Zymolyase B, foi capaz de reduzir a turbidez de uma suspensão de células de levedura solubilizando manana-proteína da parede celular. O efeito desta enzima sobre a parede foi inibido por manana e completamente inativado pela presença de diisopropilfluorofosfato (DFP). A atividade proteolítica não foi afetada pelo tratamento a 55°C por 15 minutos. O tratamento térmico e alterações nos resíduos de aminoácidos desta enzima resultaram na redução da sua sensibilidade à manana de levedura e levaram a uma diminuição em sua atividade sobre a parede celular. Com base nestes resultados, o autor sugeriu que a protease se liga à manana da parede

celular, muda sua conformação e hidrolisa a proteína, solubilizando fragmentos de manana-proteína.

Rhizotonia solani também é um microrganismo capaz de lisar células de levedura. USUI & OGUCHI (1986) purificaram e caracterizaram a protease deste microrganismo.

A purificação e caracterização da protease de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 foi publicada em 1994 por SAEKI *et al.* Sua massa molecular foi estimada em 20 KDa, a enzima apresentou maior atividade em pH entre 9,5 e 11,0 a 50°C. Ela foi inibida pelo inibidor específico de serina protease, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), podendo ser classificada como uma serina protease alcalina.

VENTOM & ASENJO (1990) identificaram e purificaram duas proteases produzidas por *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 que apresentaram massas moleculares na faixa de 11 a 23 KDa.

Rarobacter faecitabidus é produtor de uma serina protease capaz de lisar células de levedura. Esta enzima foi caracterizada com o objetivo de elucidar o mecanismo de lise de células de levedura. Os resultados indicaram que a protease se liga à manana da superfície da parede celular da levedura e hidrolisa a proteína (SHIMOI & TADENUMA, 1991).

Recentemente, ADAMITSCH *et al.* (2003) publicaram o estudo da atividade proteolítica de um microrganismo isolado do solo e que apresentou capacidade de lisar a parede celular de levedura. Ele foi identificado como uma espécie de *Arthrobacter*.

Em 1980, STACKEBRANDT *et al.* sugeriram a transferência das espécies de *Oerskovia* para o gênero *Cellulomonas* devido a evidências genéticas. Em 1991, STACKEBRANDT & PRAUSER sugeriram que os microrganismos dos gêneros *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicronospora* e *Jonesia* formassem uma nova família denominada *Cellulomonadaceae*. A partir deste momento, vários autores passaram a considerar o gênero *Oerskovia* como sinônimo de *Cellulomonas*.

Em 2001, SCHUMANN *et al.* sugeriram a reclassificação do microrganismo lítico *Cellulomonas cellulans* como *Cellulosimicrobium cellulans*.

Produção de protease alcalina

Para a obtenção de um rendimento comercial viável da protease alcalina microbiana, é essencial a otimização do meio de cultura para o crescimento celular e produção enzimática. As proteases alcalinas são produzidas por fermentação submersa ou por fermentação em substrato sólido, na maior parte dos casos. Na produção industrial, a otimização da composição do meio de cultura tem o objetivo de minimizar as concentrações dos componentes do meio sem deixar de fornecer o necessário para o crescimento celular e para a produção enzimática até o final da fermentação.

As pesquisas têm se direcionado principalmente para a avaliação dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio, além do enriquecimento do meio com íons metálicos e também a otimização de parâmetros como temperatura, pH, aeração e agitação.

FUJIWARA & YAMAMOTO (1987) realizaram uma pesquisa para obter um meio de cultura de baixo custo para a produção de protease alcalina de *Bacillus* sp B21-2 isolado do solo. A produção enzimática atingiu nível máximo em 24-28 horas de incubação em meio alcalino contendo proteína de soja.

O isolamento de uma linhagem variante de *Bacillus licheniformis* produtora de protease alcalina foi descrito por NEHETE *et al.* (1986). Esta linhagem apresentou o dobro da atividade de protease em meio de cultura contendo 5% de glicose.

A otimização da produção de protease alcalina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 foi estudada por MABROUK *et al.* (1999). O máximo rendimento de protease alcalina foi obtido usando-se lactose (4%) e glicose (1,5%) como fontes de carbono. Isolado protéico de soja (6%) e fosfato de amônio (1,2%) foram as melhores fontes de nitrogênio. O aumento da concentração de cloreto de cálcio no meio de cultura de 0,01 para 0,07% provocou aumento na produção da protease.

JOO *et al.* (2002) publicaram a otimização da produção de uma protease alcalina extracelular de *Bacillus horikoshii*. A atividade máxima foi alcançada quando a bactéria cresceu em meio contendo caseína (1% m/v) e proteína de soja (1,5% m/v) em pH 9,0 a 34°C por 16-18 horas de incubação.

CHU *et al.* (1992) relataram que compostos nitrogenados inorgânicos mostraram efeito inibidor na produção de protease alcalina de *B. subtilis* ATCC 14416.

A otimização das condições de fermentação para a produção de protease alcalina por *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20 revelou que a máxima produção foi obtida a 28°C e 200 rpm, por 48 horas em meio contendo sacarose (3%), nitrato de amônio (0,38%), triptona (2%), cloreto de potássio (0,2%), fosfato de potássio monobásico (0,1%), caseína (2%), sulfato de zinco (0,001%) e cloreto de cálcio (0,001%). A faixa de pH ótimo para a produção enzimática foi 7,0 a 7,5, usando-se inóculo de 12% (v/v) crescido no mesmo meio durante 24 horas (PHADATARE *et al.*, 1993).

Alguns aminoácidos apresentaram efeitos diferentes sobre a produção de proteases de *Actinomyces thermovulgaris* T-54 (VYBORNKYKH *et al.*, 1977). Glutamina e arginina induziram a síntese de protease, o aumento observado foi dependente da concentração do aminoácido no meio de cultura. Outros aminoácidos inibiram a síntese.

A adição de extrato de levedura induziu o aumento da produção de protease de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*. A produção de protease de *Aspergillus niger* foi fortemente induzida por ácido glutâmico, alanina e albumina, enquanto que gelatina, peptona, ácido aspártico, caseína e acetamida estimularam o acúmulo de protease produzida por *A. terreus* (ASHOUR *et al.*, 1996).

De uma forma geral, carboidratos como glicose, lactose, maltose, sacarose e frutose podem aumentar a produção de protease, mas em altas concentrações têm efeito contrário, reprimem a síntese enzimática (KUMAR & TAKAGI, 1999).

A adição de alguns ácidos orgânicos como ácido acético, metil acetato, ácido cítrico ou citrato de sódio no meio de cultivo tem resultado em aumento na produção de protease em pH alcalino. Estes ácidos orgânicos se mostram interessantes do ponto de vista econômico, além de apresentarem habilidade de controlar a variação de pH (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Metais divalentes como cálcio, cobre, ferro, magnésio e manganês podem ser requeridos para a produção de protease. Todavia, o requerimento de um desses íons em particular irá depender do microrganismo em questão.

Muitos microrganismos produtores de proteases alcalinas apresentaram crescimento fortemente dependente do pH do meio de cultura. Normalmente o pH do meio deve ser mantido acima de 7,5 durante o período de fermentação (KUMAR e TAKAGI, 1999).

A temperatura durante a produção enzimática é um parâmetro crítico e a temperatura ótima varia para cada microrganismo. A Tabela 1.3 apresenta a temperatura de fermentação e o pH para a produção máxima de protease por alguns microrganismos.

A taxa de aeração é também um fator importante por estar relacionada indiretamente ao nível de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. CHU *et al.* (1992) relataram que o rendimento ótimo para a produção de protease por *Bacillus subtilis* ATCC 14416 foi obtido com agitação de 200 rpm. De uma forma geral, o fornecimento de oxigênio mostrou-se um fator importante para o crescimento celular e para a produção de protease.

Tabela 1.3 - Temperatura de fermentação e pH do meio de cultura para a produção de protease alcalina de alguns microrganismos.

Microrganismo	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Conidiobolus coronatus</i>	7,0 - 7,5	28	PHADATARE <i>et al.</i> , 1993
<i>Penicillium</i> sp	9,0	45	AGRAWAL <i>et al.</i> , 2003
<i>Arthrobacter</i> sp	7,5	30	ADAMITSCH <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus pumilus</i> MK6-5	9,6	35	KUMAR, 2002
<i>Bacillus horikoshii</i>	9,0	34	JOO <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,0 - 7,5	-	ÇALIK <i>et al.</i> , 2002

Observou-se que as espécies de *Bacillus* apresentaram pouca ou nenhuma produção de protease durante a fase de crescimento exponencial (NEHETE *et al.*, 1986). Há casos em que a síntese e secreção da protease iniciada durante a fase de crescimento exponencial tem um aumento substancial no final desta fase, vindo a atingir uma produção máxima na fase estacionária (MANACHINI *et al.*, 1988).

Características bioquímicas de algumas proteases alcalinas

Para a utilização de enzimas em geral, é necessário o conhecimento de características como a temperatura e o pH ótimos de atividade, a estabilidade em relação ao pH e à temperatura, a massa molecular, a constante de Michalis-Mentem (K_m), o ponto isoelétrico, o efeito de compostos inibidores específicos, entre outros.

A Tabela 1.4 apresenta temperaturas e valores de pH ótimos para a atividade de algumas proteases microbianas.

A protease de *Oerskovia* sp CK apresentou-se estável a 60°C mas foi completamente inativada a 70°C por 15 minutos. Ela também apresentou estabilidade na faixa de pH entre 2,0-7,0 e de temperatura entre 30°C-65°C durante 15 minutos (OBATA *et al.*, 1977).

FUNATSU *et al.* (1978) publicaram algumas propriedades apresentadas pela protease de *Arthrobacter luteus*. Entre elas, identificaram que esta protease foi inibida pela ação de fenilmetilsulfonilfluoridato (PMSF) e diisopropilfosfofluoridato (DFP), que são inibidores específicos de serina protease.

Zymolyase é o complexo enzimático produzido por *Arthrobacter luteus*. Em 1982, KITAMURA verificou que uma serina protease denominada Zymolyase B mostrou-se estável na faixa de pH entre 7,0-12,0 e quando incubada em temperaturas inferiores a 60°C durante 15 minutos.

A protease alcalina de *Bacillus* sp alcalofílico apresentou estabilidade a 50°C, mas foi inativada após 10 minutos a 60°C e teve sua atividade completamente inibida por diisopropilfluorofosfato (FUJIWARA & YAMAMOTO, 1987).

KUMAR (2002) purificou a protease alcalina de *Bacillus pumilus* MK6-5 por meio da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e gel de filtração, o rendimento foi de 26,2% e a protease foi purificada 36,6 vezes. A massa molecular desta protease foi 28 KDa, o pH ótimo de atividade, 11,5 e a temperatura ótima, 55-60°C. Para o substrato Glu-Gli-Ala-Phe-pNa, a protease deste microrganismo apresentou K_m de 1,1 mM. A enzima foi inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto, sugerindo que se tratava de uma serina protease.

Candida olea é uma levedura produtora de proteases ácida e alcalina. A protease alcalina apresentou massa molecular de 23,4 KDa e teve sua atividade inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto e EDTA (NELSON & YOUNG, 1987).

A protease alcalina de *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20 apresentou estabilidade em pH entre 6,0 e 8,5 e em temperaturas inferiores a 40°C (PHADATARE *et al.*, 1993).

Em 1994, JARAI *et al.* publicaram a clonagem do gene que codifica a protease subtilisina em *Aspergillus niger*. A expressão desse gene deu origem a uma enzima de 30,3 KDa que era constituída de 295 resíduos de aminoácidos.

No mesmo ano, SAEKI *et al.* purificaram a protease alcalina de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 que apresentou massa molecular de 20 KDa estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A enzima hidrolisou preferencialmente ligações envolvendo resíduos de fenilalanina e foi classificada como uma serina protease.

Tabela 1.4 - Temperatura e pH ótimos de atividade de algumas proteases alcalinas

Microrganismo	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	9,5 - 11,0	50	SAEKI <i>et al.</i> , 1994
<i>Oerskovia</i> sp CK	9,0	-	OBATA <i>et al.</i> , 1977
<i>Arthrobacter luteus</i>	10,5	-	FUNATSU <i>et al.</i> , 1978
<i>Arthrobacter</i> sp	11,0	55	ADAMITSCH <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus</i> sp B21-2	11,5	60	FUJIWARA & YAMAMOTO, 1987
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11,0	70	TYAGI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus pumilus</i> MK6-5	11,0	55-60	KUMAR, 2002
<i>Bacillus mojavensis</i>	10,5	60	BEG & GUPTA, 2003
<i>Bacillus horikoshii</i>	9,0	45	JOO <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus clausii</i> I-52	11,0	60	JOO <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus parasiticus</i>	8,0	40	TUNGA <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas</i> DY-A	10,0	40	ZENG <i>et al.</i> , 2003

A linhagem *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 produz uma protease alcalina que apresenta estabilidade a 50°C por 15 minutos mas perde cerca de 49% da atividade após 1 hora na mesma temperatura (MABROUK *et al.*, 1999). A linhagem *B. horikoshii* produz protease alcalina que apresenta estabilidade a 50°C por 1 hora e em pH entre 6,0 e 12,0 (JOO *et al.*, 2002). A protease alcalina de *Bacillus mojavenensis* apresentou estabilidade em pH entre 7,0 e 11,5 por 48 horas a 50°C e perdeu 50% de sua atividade quando tratada a 60°C por 150 minutos, 65°C por 15 minutos e a 70°C por 7 minutos (BEG & GUPTA, 2003).

A protease alcalina de *Aspergillus parasiticus* apresentou massa molecular de 23 KDa e estabilidade em pH entre 6,0 e 10,0 e em temperaturas entre 4 e 40°C. Essa enzima foi inibida por fenilmetilsulfonilfluoreto, o que indicou que se tratava de uma serina protease (TUNGA *et al.*, 2003).

Algumas proteases alcalinas comerciais

Devido à grande importância e aplicação das proteases alcalinas, encontram-se disponíveis no mercado alguns produtos comerciais que estão apresentados na Tabela 1.5.

Aplicação de proteases alcalinas

As proteases alcalinas podem ser usadas para a produção de hidrolisados protéicos a partir de proteínas vegetais ou animais, para o aumento da digestibilidade, biodisponibilidade e funcionalidade destes produtos.

Há no mercado atualmente algumas preparações enzimáticas comerciais como a Alcalase, protease produzida por *B. licheniformis*, que apresenta alta especificidade por proteínas que possuem aminoácidos hidrofóbicos terminais. O uso deste produto reduz o sabor amargo em hidrolisados protéicos (KUMAR & TAKAGI, 1999).

GEORGE *et al.* (1997) descreveram a produção de hidrolisado protéico de grão de bico como uma alternativa industrial de aplicação das proteases produzidas por *B. amyloliquefaciens* por fermentação em substrato sólido. O hidrolisado produzido foi separado por cromatografia e duas frações obtidas mostraram-se ricas em aminoácido

essencial metionina, que podem ser usadas para o enriquecimento de produtos alimentícios.

Tabela 1.5 - Algumas proteases comerciais e seus fabricantes

Protease comercial	Fonte	pH ótimo de atividade	Temperatura ótima de atividade (°C)	Fabricante
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	7 - 10	60	Novo Nordisk, Dinamarca
Savinase	<i>Bacillus lentus</i>	8 - 11	50 - 60	Novo Nordisk, Dinamarca
Esperase	<i>Bacillus lentus</i>	7 - 12	50 - 65	Novo Nordisk, Dinamarca
Durazym	Proteína geneticamente modificada variante da Savinase	8 - 11	50	Novo Nordisk, Dinamarca
Maxatase	<i>Bacillus subtilis</i>	9 - 10	50 - 60	Gist- Brocades, Nova Zelândia
Opticlean	<i>Bacillus alcalophilus</i>	8 - 11,5	15 - 60	Solvay Enzymes, Alemanha
Optimase	<i>B. licheniformis</i>	7,5 - 10,5	15 - 60	Solvay Enzymes, Alemanha
Maxapen	Proteína de <i>Bacillus</i> alcalofílico geneticamente modificada	11 - 12	60	Solvay Enzymes, Alemanha
Purafect	Proteína de <i>B. lentus</i> expressada em <i>Bacillus</i> sp.	10	40 - 65	Genencor International, USA
Protease P	<i>Aspergillus melleus</i>	8	45	Amano Pharmaceuticals Ltda., Japão
Protease S	<i>B. stearothermophilus</i>	8	70	Amano Pharmaceuticals Ltda., Japão

Os complexos fosfopeptídicos de caseína e íons metálicos apresentam potencial de aplicação como suplementos dietéticos para aumentar a biodisponibilidade de cálcio, ferro e outros elementos essenciais. ADAMSON & REYNOLDS (1996) usaram

um processo de precipitação seletiva por uma solução de cálcio em etanol para a obtenção de fosfolípidos a partir da digestão de caseína com uma protease comercial, a Alcalase.

Hidrolisados protéicos do músculo de sardinha obtidos pelo tratamento com protease alcalina de *Bacillus licheniformis* apresentaram atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I. Este hidrolisado apresentou potencial de utilização como alimento fisiologicamente funcional.

Os resíduos de proteína após a separação mecânica da carne bovina podem ser solubilizados pela ação de proteases alcalinas. Este hidrolisado usualmente apresenta sabor amargo quando o grau de hidrólise é excessivo. O'MEARA & MUNRO (1984) publicaram que a Alcalase apresentou-se apropriada para esta utilização, em termos econômicos. A otimização de fatores como pH, temperatura, tempo de hidrólise e concentração da enzima demonstraram que a Alcalase, em pH 8,5 e temperatura de 55 a 60°C, solubilizou cerca de 94% da carne. A pasteurização posterior deste hidrolisado solúvel inativou a enzima e pode ser utilizado em produtos cárneos enlatados e sopas.

DALEV (1994) estudou a aplicação da protease alcalina de *B. subtilis* na produção de concentrado protéico a partir de penas de aves resultantes do abate industrial. As penas constituem cerca de 5% do peso corpóreo da ave e podem ser consideradas fonte de proteína para ração, uma vez que sua rígida estrutura de queratina tenha sido removida. O pré-tratamento com hidróxido de sódio, a desintegração mecânica e a hidrólise enzimática resultaram na solubilização das penas. O produto final mostrou potencial para o uso como aditivo em ração animal.

ASDORNNITHEE *et al.* (1994) isolaram e identificaram uma bactéria cujo meio de cultivo apresentou atividade colagenolítica. Esta bactéria foi identificada como *Bacillus licheniformis*. A enzima colagenolítica foi obtida em meio contendo gelatina e foi purificada. Esta enzima foi capaz de hidrolisar colágeno solúvel, gelatina, hemoglobina e caseína, mas não hidrolisou oligopeptídeos sintéticos usualmente usados como substrato para colagenase.

Recentemente, o uso de amido de arroz para a produção de cereais matinais, alimentos hipoalergênicos, fórmulas infantis, produtos com redução de calorias e produtos de panificação têm aumentado bastante. LUNDUBWONG & SEIB (2000) publicaram um estudo sobre a extração de amido de arroz pela digestão por protease

alcalina. O amido isolado apresentou melhor aparência, maior conteúdo de lipídeos e melhor consistência após a formação da massa.

A aplicação da protease alcalina de *Bacillus amyloliquefaciens* no tratamento de couro foi estudada por GEORGE *et al.* (1995), bem como o efeito da temperatura, aeração e concentração de farelo de trigo no meio de cultura para a produção de enzimas por fermentação em substrato sólido.

A aplicação de enzimas no tratamento de resíduos do processamento de peixes e na produção de concentrado protéico tem se mostrado atrativa comercialmente. O uso de enzimas para modificar ou aumentar as propriedades funcionais pode ser feito através da hidrólise controlada. O tratamento da carne de peixe ou do resíduo do processamento de peixes com enzimas proteolíticas representa uma alternativa interessante em relação à separação mecânica ou a métodos químicos para a preparação de concentrados protéicos. SHAHIDI *et al.* (1995) prepararam hidrolisados protéicos a partir de carne de peixe (*Mallotus villosus*) usando preparações comerciais Alcalase, Neutrase, e papaína.

AMAROWICZ & SHAHIDI (1997) isolaram quatro frações de peptídeos a partir de hidrolisado protéico de peixe, seguindo a metodologia proposta por SHAHIDI *et al.* (1995). Uma das frações apresentou alta atividade antioxidante, outras duas frações apresentaram atividade antioxidante média e a quarta fração apresentou efeito pró-oxidante.

A soja é uma conhecida fonte de proteína vegetal, mas o uso dessa proteína é restrito devido a sua baixa funcionalidade. A hidrólise das proteínas de soja utilizando-se preparações comerciais de protease tem mostrado melhoramento destas propriedades. A proteína modificada pode ser usada para o enriquecimento de sucos, bebidas e outros alimentos. AGRAWAL *et al.* (2003) publicaram a produção de protease alcalina de *Penicillium* sp. por fermentação em substrato sólido para aplicação em proteína de soja. O fungo foi isolado do solo e as condições de produção foram otimizadas para a máxima produção da protease.

Várias atividades fisiológicas foram detectadas em hidrolisados de alguns alimentos, como a soja, por exemplo. CHEN *et al.* (1995) isolaram seis peptídeos que apresentaram atividade antioxidante em hidrolisado de β -conglucina de soja preparado com protease alcalina de *Bacillus subtilis*. Os peptídeos eram compostos por

cinco a dezesseis resíduos de aminoácidos, incluindo aminoácidos hidrofóbicos, valina e leucina, nas posições N-terminal, e prolina, histidina e tirosina na sequência.

O polissacarídeo β -1,3-glucana apresenta vários benefícios comprovados para a saúde humana (SANDULA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001). Uma fonte das β -1,3-glucanas é a parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que constitui um grande resíduo da indústria de fermentação alcoólica. Os processos convencionais para a extração da glucana usando-se ácidos ou álcali à quente, todavia, causam degradação da cadeia polimérica resultando em uma redução do rendimento e uma possível redução nos efeitos benéficos. FREIMUND *et al.* (2003) desenvolveram um método para o isolamento da glucana de levedura que consiste em passos brandos de extração e tratamento enzimático sem usar condições extremas de pH. O processo combina método físico e enzimático. O método enzimático envolve o tratamento com uma protease alcalina comercial, a Savinase, em pH 10,5 a 45°C por 5 horas. A pureza da glucana extraída foi de 92% e o rendimento foi de 87%. Durante este processo, o produto manana-proteína, que também é benéfico à saúde, foi facilmente obtido.

Conclusões

As proteases alcalinas de fonte microbiana apresentam grande potencial de aplicação e são muito diversificadas. Os estudos de novas proteases alcalinas microbianas que apresentem características diferenciadas podem dar origem a novos produtos comerciais e ampliar ainda mais as possibilidades de suas aplicações. Os estudos para a utilização de resíduos das indústrias de alimentos através do uso de proteases apresentam-se indispensáveis para agregar valor econômico aos processos dessas indústrias e para a manutenção do equilíbrio ambiental.

Referências Bibliográficas

- ADAMITSCH, B. F., KARNER, F., HAMPEL, W. Proteolytic of a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 227-229, 2003.
- ADAMSON, N. & REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 202-207, 1996.
- AEHLE, W., SOBEK, H., AMORY, A., VETTER, R., WILKE, D., SCHOMBURG, D. Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved washing performance - the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. **Journal of Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 31-40, 1993.
- AGRAWAL, D., PATIDAR, P., BANERJEE, T., PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 2, p. 1-6, 2003.
- AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 355-359, 1997.
- ASDORNNITHEE, S., AKIYAMA, K., SASAKI, T., TAKATA, R. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n.4, p. 283-287, 1994.
- ASHOUR, S. A., EL-SHORA, H. M., METWALLY, M. HABIB, S. A. Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of proteases. **Microbios**, v. 86, n. 346, p. 59-69, 1996.
- BACON, J. S. D., GORDON, A. H., JONES, D., TAYLOR, I. F. WEBLEY, D. M. The separation of β -glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell wall. **The Biochemical Journal**, v. 120, p.67-78, 1970.
- BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B. C. Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 380-382, 1993.
- BEG, Q. K., GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 294-304, 2003.
- BYSTRICKY, S., PAULOVICOVA, E., MACHOVA, E. *Candida albicans* mannan-protein conjugate as vaccine candidate. **Immunology Letters**, v. 85, n. 3, p. 251-255, 2003.
- ÇALIK, P., BILIR, E., ÇALIK, G., OZDAMAR, T. H. Influence of pH conditions on regulation in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 685-697, 2002.

- CHANDRASECKARAN, S., DHAR, S. C. Multiple proteases from *Streptomyces moderatus*. II. Physicochemical and enzymatic properties of the extracellular proteases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 257, n. 2, p. 402-408, 1987.
- CHEN, H. M., MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 574-578, 1995.
- CHU, I. M., LEE, C., LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 9, p. 755-761, 1992.
- DALEV, P. G. Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 3, p. 265-267, 1994.
- DOI, K., DOI, A., FUKUI, T. Purification and properties of lytic β -glucanase from an *Arthrobacter* bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1619-1627, 1973.
- DUINHOVEN, S., POORT, R., VAN DER VOET, G., AGTEROF, W. G. M., NORDE, W., LYKLEMA, J. Driving forces for enzyme adsorption at solid-liquid interfaces. 1. The serine protease savinase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, n. 2, p. 340-350, 1995.
- FREIMUND, S., SAUTER, M., KAPPELI, O., DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003.
- FUJIWARA, N., YAMAMOTO, K. Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 3, p. 345-348, 1987.
- FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, Y., SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1975-1977, 1978.
- GEORGE, S., RAJU, V., KRISHNAN, M. R. V., SUBRAMANIAN, T. V., JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 457-462, 1995.
- GEORGE, S., SIVASANKAR, B., JAYARAMAN, K., VIJAYALAKSHMI, M. A. Production and separation of the methionine rich fraction from chick pea protein hydrolysate generated by proteases of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 401-404, 1997.

- HANTER, J. B., ASENJO, J. A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 929-943, 1988.
- HANZI, M., SHIMIZU, M., HEARN, V. M., MONOD, M. A study of the alkaline proteases secreted by different *Aspergillus* species. **Mycoses**, v. 36, n. 11-12, p. 351-356, 1993.
- JANG, J. S., KANG, D. O., CHUN, M. J., BYUN, S. M. Molecular cloning of a subtilisin J gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Bacillus subtilis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, n. 1, p. 277-282, 1992.
- JARAI, G., KIRCHHERR, D., BUXTON, F. P. Cloning and characterization of the pepD gene of *Aspergillus niger* which codes for a subtilisin-like protease. **Gene**, v. 139, n. 1, p. 51-57, 1994.
- JOO, H. S., KUMAR, C. G., PARK, G. C., KIM, K. T., PAIK, S. R., CHANG, C. S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 155-159, 2002.
- JOO, H. S., KUMAR, C. G., PARK, G. C., PAIK, S. R., CHANG, C. S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 267-272, 2003.
- KAPTEYN, J. C., ENDE, H. V. D., KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 373-383, 1999.
- KATZ, M. E., FLYNN, P. K., VANKUYK, P. A., CHEETHAM, B. F. Mutation affecting extracellular protease production in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Molecular & General Genetics**, v. 250, n. 6, p. 715-724, 1996.
- KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2093-2099, 1982.
- KRIZKOVÁ, L., DURACKOVA, Z., SANDULA, J., SASINKOVA, V., KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 497, n. 1-2, p.213-222, 2001.
- KUMAR, C. G., TAKAGI, H. Microbial alkaline protease: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.
- KUMAR, C. G. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 13-17, 2002.

- LAMBERT, M., BLANCHIN-ROLAND, S., LE LOUEDEC, F., LEPINGLE, A., GAILLARDIN, C. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 7, p. 3966-3976, 1997.
- LEE, J. N., LEE, D. Y., JI, I. H., KIM, G. E., KIM, H. N., SOHN, J., KIM, S., KIM, C. W. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 837-841, 2001.
- LI, S., NORIOKA, S., SAKIYAMA, F. Bacteriolytic activity and specificity of *Achromobacter* beta-lytic protease. **Journal of Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 332-339, 1998.
- LUNDUBWONG, N., SEIB, P. A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 31, p. 63-74, 2000.
- MABROUK, S. S., HASHEM, A. M., EL-SHAYEB, N. M. A., ISMAIL, A. M. S., ABDEL-FATTAH, A. F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 155-159, 1999.
- MANACHINI, P. L., FORTINA, M. G., PARINI, C. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* - a new species of *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 409-413, 1988.
- MURAKAMI, K., ISHIDA, Y., MASAKI, A., TATSUMI, H., MURAKAMI, S., NAKANO, E., MITAI, H., KAWABE, H., ARIMURA, H. Isolation and characterization of the alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 2807-2811, 1991.
- NAGASAKI, S., NISHIOKA, T., MORI, H., YAMAMOTO, S. Purification and properties of lytic β -1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 1059-1067, 1976.
- NEHETE, P. N., SHAH, V. D., KOTHARI, R. M. Isolation of a high yielding alkaline protease variant of *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 6, p. 370-372, 1986.
- NELSON, G., YOUNG, T. W. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 1461-1469, 1987.
- O'MEARA, G. M., MUNRO, P. A. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. **Meat Science**, v. 11, n. 3, p. 227-238, 1984.
- OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.

- OGRYDZIAK, D. M. Yeast extracellular proteases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-55, 1993.
- PHADATARE, S. U., DESHPANDE, V. V., SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 1, p. 72-76, 1993.
- ROMERO, F. J., GARCIA, L. A., SALAS, J. A., DÍAZ, M. QUIRÓS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.
- ROWLEY, B. I., BULL, T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879-899, 1977.
- SAEKI, K., IWATA, J., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification and characterization of an alkaline protease from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 554-556, 1994.
- SANDULA, J., KOGAN, G., KACURAKOVA, M., MACHOVA, E. Microbial (1-3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 247-253, 1999.
- SCHUMANN, P., WEISS, N., STACKEBRANDT, E. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Kiedis, 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1007-1010, 2001.
- SHAHIDI, F., HAN, X. Q., SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.
- SHIMOI, H., TADENUMA, M. Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I, a yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity. **Journal of Biochemistry**, v. 110, p. 608-613, 1991.
- SINGH, J., VOHRA, R. M., SAHOO, D. K. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 1-9, 2003.
- STACKEBRANDT, E., HARINGER, M., SCHLEIFER, K. H. Molecular genetic evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. **Archives of Microbiology**, v. 127, p. 179-185, 1980.
- STACKEBRANDT, E., PRAUSER, H. Assignment of genera *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicronospora* and *Jonesia* to *Cellulomonadaceae* fam. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 261-265, 1991.

- TOMASCHOVÁ, J., BUCHINGER, W., HAMPEL, W., ZEMANOVIC, J. Purification and characterization of extracellular proteinase produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9172. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 499-503, 1998.
- TSUCHIYA, A. K., SAKASHITA, H., NAKAMURA, Y., KIMURA, T. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic thermoactinomyces SP-HS682. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3125-3127, 1991.
- TUNGA, R., SHRIVASTAVA, B., BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1553-1558, 2003.
- TYAGI, R. D., FOKO, V. S., BARNABE, S., VIDYARTHI, A. S., VALÉRO, J. R., SURAMPALLI, R. Y. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 10, p. 247-254, 2002.
- USUI, T., OGUCHI, M. Purification of a protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 535-537, 1986.
- VENTON, A. M., ASENJO, J. A. Two extracellular proteases from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n. 3, p. 171-176, 1990.
- VRŠANSKÁ, M., BIELY, P., KRÁTKÝ, Z. Enzymes of the yeast lytic system produced by *Arthrobacter* GJM-1 bacterium and their role in the lysis of yeast cell walls. **Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie**, v. 17, n. 6, p. 465-480, 1977.
- VYBORNÝKH, S. N., LORIIA, Z. K., EGOROV, N. S. Influence of amino acids on synthesis of extracellular proteases by *Actinomyces thermovulgaris*. **Mikrobiologia**, v. 46, n. 2, p. 227-231, 1977.
- YAMAMOTO, N., SATO, S. I., SAITO, K., HASUO, T., TADENUMA, M., SUZUKI, K. I., TAMAOKA, J., KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 1, p. 7-11, 1988.
- YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y., TADENUMA, M. Isolation of yeast-lysing bacteria in Brazil. **Report of Research Institute of Brewing**, v. 165, p. 37-43, 1993.
- ZENG, R., ZHANG, R., ZHAO, J., LIN, N. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 7, n. 4, p. 335-337, 2003.

Capítulo 2 - Otimização do meio de cultura para produção de protease por *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Resumo

Cellulosimicrobium cellulans 191 é um microrganismo produtor de um complexo enzimático capaz de degradar a parede celular de leveduras composto pelas enzimas β -1,3- glucanase, protease e quitinase. Este microrganismo adere à parede celular da levedura e a lisa. Células desidratadas de *Saccharomyces cerevisiae* foram usadas como indutor para a produção da protease. O meio de cultura inicial era composto por 1% de células de *S. cerevisiae* desidratadas; 13,6 g/L de KH_2PO_4 ; 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g/L de KOH; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1mg/L de biotina e 1mg/L de tiamina. Os componentes KH_2PO_4 , KOH e o indutor mostraram efeito significativo no planejamento experimental fracionário. Um novo planejamento experimental foi realizado usando-se dois fatores, pH e porcentagem de células desidratadas de levedura. Os resultados mostraram que o meio de cultura para a máxima produção de protease foi 8% de células desidratadas de levedura, 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e em solução tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0. A maior produção de protease foi obtida quando a fermentação ocorreu em temperaturas entre 20 e 27 °C. A produção da protease foi aumentada em 36 vezes após a otimização do meio de cultura e das condições de fermentação.

Palavras-chave: planejamento experimental, otimização, protease alcalina, *Cellulomonas cellulans*, *Cellulosimicrobium cellulans*

Introdução

Cellulosimicrobium cellulans 191 é um actinomiceto isolado de resíduos de indústria de fermentação alcoólica. Este microrganismo produz um complexo enzimático durante seu crescimento que consiste de β -1,3-glucanase, quitinase e protease alcalina. Este complexo enzimático se mostrou capaz de lisar células

viáveis de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A lise de células viáveis da levedura é atribuída à ação sinérgica entre as enzimas β -1,3-glucanase e a protease (FUNATSU *et al.*, 1978).

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas usados industrialmente e tem várias aplicações como nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêutica, couro e seda (SINGH *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, o uso de proteases alcalinas como catalisador nas indústrias tem aumentado. Essas enzimas apresentam alta capacidade catalítica, alto grau de especificidade de substrato e são economicamente viáveis. Várias atividades biológicas têm sido detectadas em hidrolisados protéicos de alguns alimentos. Por exemplo, peptídeos antioxidantes foram isolados de hidrolisados preparados utilizando-se proteases microbianas (CHEN *et al.*, 1995).

O objetivo deste trabalho foi a otimização dos componentes do meio de cultura e as condições ideais de fermentação para a maior produção da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191.

Material e métodos

Material

Caseína bovina e ácido tricloroacético (Merck Co.) foram utilizados para a determinação da atividade de protease. Biotina e tiamina (Sigma Chemical Co.), ácidos, bases, sais (Merck Co. ou equivalente) e células de *S. cerevisiae* desidratadas (Fleischmann) foram utilizados na composição do meio de cultura.

Microrganismo: *Cellulosimicrobium cellulans* 191 isolada anteriormente de resíduos de indústria de fermentação alcoólica.

Produção da protease

Para a produção de protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi utilizado meio de cultura composto de 1% de células de *S. cerevisiae* desidratadas; 13,6 g/L de KH_2PO_4 ; 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g/L de KOH; 0,2 g/L

de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/L de tiamina e 1 mg/L de biotina (SCOTT & SCHEKMAN, 1980). Utilizou-se um inóculo de 16 horas de crescimento. Uma alíquota de 5 mL de inóculo foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 45 mL do mesmo meio de cultura. A fermentação ocorreu a 30 °C com agitação de 150 rpm por 24 horas. O meio de cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 5 °C e a atividade de protease no sobrenadante foi determinada.

Determinação da atividade de protease

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato (OBATA *et al.*, 1977). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução de caseína 2%, 1 mL de solução tampão fosfato 50 mM (pH 8,0) e 0,5 mL de solução enzimática, foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi medida a 280 nm, utilizando como controle o meio de reação onde a solução enzimática foi substituída por água. Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento na absorbância do filtrado igual a 1,0 após 30 minutos de reação (ROWLEY & BULL, 1977).

Planejamento experimental fracionário (2^{8-3}) para a estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultura

Inicialmente, oito componentes do meio de cultura foram estudados. Para estimar a influência desses fatores e suas possíveis interações, um planejamento experimental fracionário 2^{8-3} foi escolhido, que resultou em 32 ensaios. Três pontos centrais foram adicionados para a avaliação do erro puro.

A Tabela 2.1 apresenta os níveis das variáveis independentes estudadas, e a Tabela 2.4 apresenta os 35 ensaios realizados e as respectivas concentrações dos componentes do meio de cultura.

Tabela 2.1 - Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fracionário $2^{(8-3)}$

Fator (g/L)	-1	0	+1
KH_2PO_4	7,6	13,6	19,6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	2,0	3,0
KOH	2,0	4,2	6,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,2	0,3
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Tiamina	0,0	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Biotina	0,0	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Células de levedura desidratadas *	0,5	1,0	1,5

* (% m/v)

Planejamento experimental completo para a otimização do meio de cultura

Um novo planejamento experimental (2^2) foi realizado utilizando-se dois fatores, pH e concentração de células de levedura desidratadas (indutor). Os níveis das variáveis independentes estudadas neste planejamento experimental completo estão apresentados na Tabela 2.2. Para os valores de pH 6,6; 7,0 e 8,0 foram utilizadas soluções tampão fosfato 0,15 M, e para os valores de pH 9,0 e 9,4, soluções tampão borax/NaOH 0,15 M. Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.2 - Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura

Fator	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
pH	6,6	7,0	8,0	9,0	9,4
células de levedura desidratadas (%)	4,0	5,0	7,5	10,0	11,0

* $\alpha = 1,41$

Planejamento experimental completo para a otimização das condições de fermentação

Para a avaliação das condições ótimas de temperatura e agitação para a máxima produção de protease, um planejamento experimental completo (2^2) foi realizado. A Tabela 2.3 apresenta os níveis das variáveis independentes estudadas neste planejamento experimental.

Tabela 2.3 - Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^2 para a otimização das condições de fermentação

Fator	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Temperatura (°C)	18,0	20,0	25,0	30,0	32,0
Agitação (rpm)	80	100	150	200	220

Os resultados obtidos em todos os planejamentos experimentais foram analisados através do programa Statistica 5.0.

Cinética de crescimento e produção da protease no meio de cultura otimizado

Uma alçada de cultura de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 com 24 horas de crescimento foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura otimizado e incubado a 27 °C por 16 horas com agitação de 150 rpm. Cinco mL deste meio de cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL do mesmo meio de cultura, e foi incubado a 27 °C com agitação de 150 rpm. Foram coletadas amostras do meio de cultivo após 5, 10, 24, 48 e 72 horas de crescimento.

Para a contagem de células viáveis, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução 0,2% de Tween 80, em seguida os frascos foram agitados vigorosamente em vortex por 5 minutos. A contagem de células viáveis foi realizada utilizando-se diluições seriais. O número de unidades

formadoras de colônias foi determinado pelo método da gota (MILES & MISRA, 1938). Neste método, uma gota (20 µL) da diluição apropriada de células do microrganismo é inoculada em placas contendo ágar, em duplicatas. Quando a gota tiver secado na superfície do ágar, a placa é invertida e incubada (30 °C). Após o crescimento satisfatório das colônias, elas são contadas e o número de microrganismos presentes na suspensão inicial é determinado considerando-se a diluição e o volume da gota.

Determinou-se também a atividade de protease no sobrenadante da centrifugação destas amostras.

Resultados e discussão

Atividade de protease no meio de cultura inicial descrito por SCOTT & SCHEKMAN (1980)

A produção de protease por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 no meio de cultura descrito por SCOTT & SCHEKMAN (1980) foi realizada como descrito anteriormente. A atividade de protease neste meio foi de 0,20 U/mL.

Planejamento experimental fracionário (2^{8-3}) para a estimativa do efeito de cada componente do meio de cultura

A Tabela 2.4 mostra a matriz do planejamento experimental fracionário. A análise dos resultados mostrou que nem todas as variáveis apresentaram efeito significativo. A Tabela 2.5 apresenta os principais efeitos no planejamento 2^{8-3} . Os componentes do meio de cultura KH_2PO_4 , KOH e células desidratadas de levedura mostraram efeitos significativos, cujos valores foram -0,077; 0,164 e 0,128, respectivamente para o nível de significância de 95%.

Tiamina, biotina e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não apresentaram efeito significativo. Como o menor nível estudado para essas variáveis foi a concentração nula, eles se mostraram desnecessários para a produção de protease nas condições estudadas.

A exclusão de compostos como as vitaminas tiamina e biotina, reduz consideravelmente o custo do meio de cultura e o custo operacional, uma vez que elas necessitam de esterilização à frio.

Os sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também apresentaram efeito não significativo nos níveis estudados, mas, uma vez que os menores níveis estudados foram diferentes de zero, eles continuaram sendo componentes do meio de cultura otimizado. Suas concentrações foram fixadas em 0,2 e 2,0 g/L, respectivamente.

Tabela 2.4 - Matriz do planejamento experimental fracionário 2⁸⁻³ e resultados obtidos para cada ensaio de produção de protease de *C. cellulans*

	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	KOH	MgSO ₄ .7H ₂ O	Fe(SO ₄) ₃ .6H ₂ O	Tiamina	Biotina	cél. leved %	Atividade de Protease U/mL
	g/L				10 ⁻³ g/L				
1	19,6	3,0	6,4	0,3	2,0	2,0	2,0	1,5	0,27
2	19,6	3,0	6,4	0,3	0,0	2,0	2,0	0,5	0,10
3	19,6	3,0	6,4	0,1	2,0	2,0	0,0	0,5	0,10
4	19,6	3,0	6,4	0,1	0,0	2,0	0,0	1,5	0,23
5	19,6	3,0	2,0	0,3	2,0	0,0	2,0	0,5	0,06
6	19,6	3,0	2,0	0,3	0,0	0,0	2,0	1,5	0,15
7	19,6	3,0	2,0	0,1	2,0	0,0	0,0	1,5	0,21
8	19,6	3,0	2,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,07
9	19,6	1,0	6,4	0,3	2,0	0,0	0,0	0,5	0,07
10	19,6	1,0	6,4	0,3	0,0	0,0	0,0	1,5	0,24
11	19,6	1,0	6,4	0,1	2,0	0,0	2,0	1,5	0,20
12	19,6	1,0	6,4	0,1	0,0	0,0	2,0	0,5	0,09
13	19,6	1,0	2,0	0,3	2,0	2,0	0,0	1,5	0,12
14	19,6	1,0	2,0	0,3	0,0	2,0	0,0	0,5	0,09
15	19,6	1,0	2,0	0,1	2,0	2,0	2,0	0,5	0,08
16	19,6	1,0	2,0	0,1	0,0	2,0	2,0	1,5	0,15
17	7,6	3,0	6,4	0,3	2,0	0,0	0,0	1,5	0,54
18	7,6	3,0	6,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,19
19	7,6	3,0	6,4	0,1	2,0	0,0	2,0	0,5	0,28
20	7,6	3,0	6,4	0,1	0,0	0,0	2,0	1,5	0,55
21	7,6	3,0	2,0	0,3	2,0	2,0	0,0	0,5	0,08
22	7,6	3,0	2,0	0,3	0,0	2,0	0,0	1,5	0,09
23	7,6	3,0	2,0	0,1	2,0	2,0	2,0	1,5	0,09
24	7,6	3,0	2,0	0,1	0,0	2,0	2,0	0,5	0,03
25	7,6	1,0	6,4	0,3	2,0	2,0	2,0	0,5	0,24
26	7,6	1,0	6,4	0,3	0,0	2,0	2,0	1,5	0,23
27	7,6	1,0	6,4	0,1	2,0	2,0	0,0	1,5	0,65
28	7,6	1,0	6,4	0,1	0,0	2,0	0,0	0,5	0,18
29	7,6	1,0	2,0	0,3	2,0	0,0	2,0	1,5	0,03
30	7,6	1,0	2,0	0,3	0,0	0,0	2,0	0,5	0,09
31	7,6	1,0	2,0	0,1	2,0	0,0	0,0	0,5	0,07
32	7,6	1,0	2,0	0,1	0,0	0,0	0,0	1,5	0,12
33	13,6	2,0	4,2	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,19
34	13,6	2,0	4,2	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,18
35	13,6	2,0	4,2	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,23

Os compostos KH₂PO₄ e KOH apresentaram efeito significativo e estão relacionados ao pH do meio de cultura. Assim, a influência do pH na produção da protease foi avaliada em um novo planejamento experimental.

Um planejamento experimental completo foi realizado com as variáveis pH e porcentagem de células de levedura desidratadas.

Tabela 2.5 - Estimativa dos efeitos das variáveis do planejamento experimental fracionário 2^{8-3}

Fator	Efeito	t(2)	p	-95%	+95%
Média	0,180*	40,185*	0,001*	0,160*	0,199*
KH ₂ PO ₄	-0,077*	-8,218*	0,014*	-0,117*	-0,037*
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,024	2,606	0,121	-0,016	0,065
KOH	0,164*	17,572*	0,003*	0,124*	0,205*
MgSO ₄ .7H ₂ O	-0,032	-3,407	0,076	-0,072	0,008
Fe(SO ₄) ₃ .6H ₂ O	0,031	3,274	0,0820	-0,010	0,071
Tiamina	-0,014	-1,537	0,264	-0,055	0,026
Biotina	-0,026	-2,739	0,111	-0,066	0,015
Células de levedura desidratadas	0,128*	13,697*	0,005*	0,088*	0,168*

* Valores estatisticamente significativos

Planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura

A Tabela 2.6 apresenta a matriz do planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura.

A análise de variância deste planejamento (Tabela 2.7) apresentou valor para F de 15,04. Este valor é cerca de 3,4 vezes maior que o valor de $F_{3,7}$, indicando que o modelo codificado é estatisticamente significativo.

A produção de protease em um meio de cultura cujo pH e a concentração de células de levedura desidratada são representados por pH e LD, pode ser descrita pela equação polinomial abaixo, utilizando-se meio de cultura com 2,0 g/L de sulfato de amônio e 0,2 g/L de sulfato de magnésio.

Atividade de protease (U/mL) = $7,16 - 1,42 \text{ pH}^2 + 0,80 \text{ LD} - 1,48 (\text{LD})^2$, pH representa o valor codificado do pH e LD, a porcentagem de levedura desidratada codificada.

A Figura 2.1 mostra a superfície de resposta para a produção da protease baseada nos dois fatores, pH e porcentagem de células de levedura desidratadas. A máxima produção de protease foi observada para os valores de pH do meio de cultura entre 7,5 e 8,5; e para as concentrações de células de levedura desidratadas entre 7,0 e 9,0%.

Tabela 2.6 - Matriz do planejamento experimental completo 2^2 para a otimização do meio de cultura e resultados obtidos

Ensaio	pH	% de células de levedura	Atividade de protease (U/mL)
1	9,0	10,0	4,94
2	9,0	5,0	2,42
3	7,0	10,0	4,30
4	7,0	5,0	3,88
5	9,4	7,5	3,98
6	6,6	7,5	5,42
7	8,0	11,0	5,82
8	8,0	4,0	3,36
9*	8,0	7,5	7,18
10*	8,0	7,5	6,88
11*	8,0	7,5	7,42

* ponto central

Tabela 2.7 - Análise de variância do planejamento experimental completo para a otimização do meio de cultura $R^2 = 0,86$ $p < 0,05$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrada	F	F _{3,7}
Regressão	23,45	3	7,82	15,04	4,35
Resíduo	3,65	7	0,52		
Falta de ajuste	3,50	5			
Erro puro	0,15	2			
Total	27,10	10			

A composição do meio de cultura para a máxima produção de protease foi considerada 8,0% de células de levedura desidratadas; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em solução tampão fosfato 0,15M e pH 8,0.

Os valores ideais de pH do meio de cultura para a produção de protease descritos na literatura não variam muito, quase todos estão próximos da neutralidade, com exceção dos microrganismos alcalofílicos. O microrganismo *Arthrobacter* sp apresentou pH ideal de fermentação 7,5 para a produção de protease (ADAMITSCH *et al.*, 2003). ÇALIK *et al.* (2002) publicaram que o pH ideal do meio de cultura para a produção de protease de *Bacillus licheniformis* foi 7,0-7,5.

As células de levedura são fonte de carbono e nitrogênio orgânico para o crescimento celular e produção da protease. A produção de protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 utilizando-se o meio de cultura otimizado apresentou-se bastante atraente do ponto de vista econômico, quando comparado a meios de cultura para a produção de protease descritos na literatura.

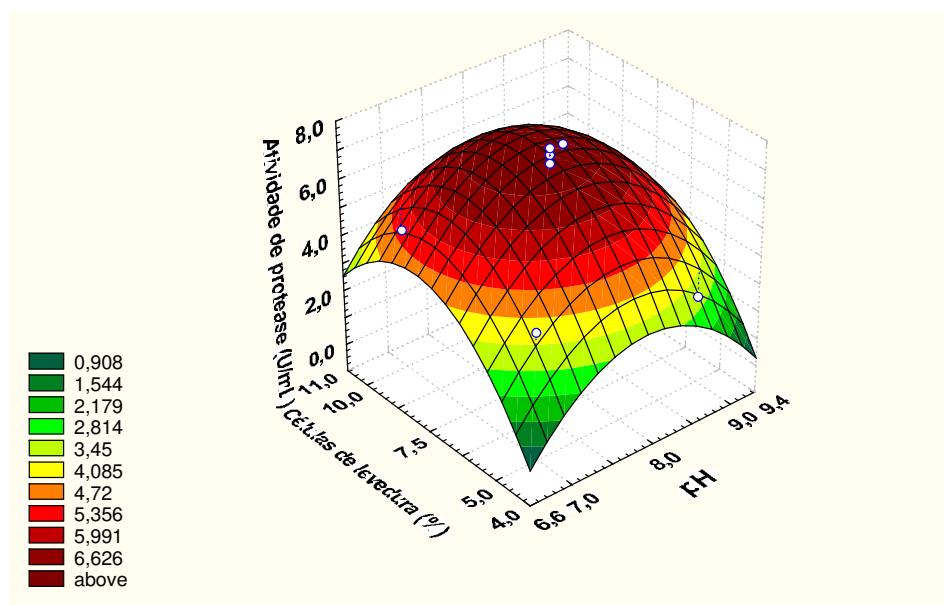


Figura 2.1 Superfície de resposta para a otimização do meio de cultura para a produção de protease de *C. cellulans* 191

Estes meios, descritos na literatura, apresentam em sua composição compostos como glicose (1,5%) e lactose (4%) como fonte de carbono; proteína de soja (6%) e fosfato de amônio (1,2%) como fonte de nitrogênio (MABROUK *et al.*, 1999) ou caseína (1% m/v) e proteína de soja (1,5% m/v) (JOO *et al.*, 2002). Há ainda meios de cultura propostos na literatura que apresentam em sua composição triptona (2%) e caseína (2%) como fontes de nitrogênio orgânico (PHADATARE *et al.*, 1993).

Estima-se que trinta a quarenta por cento do custo da produção enzimática industrial esteja relacionado ao meio de cultura (JOO *et al.*, 2002). A única fonte de carbono e nitrogênio orgânico do meio de cultura otimizado neste trabalho é um resíduo de indústrias de fermentação alcoólica, e apresenta um custo bastante reduzido.

Planejamento experimental completo 2² para a otimização das condições de fermentação

A análise dos resultados deste planejamento experimental completo, apresentado na Tabela 2.8, mostra que a variação na agitação durante o crescimento celular não foi significativa para a produção da protease. A produção enzimática foi influenciada apenas pela temperatura de fermentação. A temperatura apresentou efeito igual a -1,13 na produção de protease.

A análise de variância, como mostra a Tabela 2.9, indicou que o modelo estatístico codificado foi significativo e preditivo. O valor de F foi sete vezes maior que o valor de $F_{2,8}$.

A variação na produção de protease no meio de cultura otimizado em relação a temperatura de fermentação pode ser descrita pela equação polinomial:

Atividade de protease (U/mL) = $8,46 - 0,44 T - 0,56 T^2$, onde T representa o valor codificado da temperatura.

A superfície de resposta representada na Figura 2.2 indica que a maior atividade de protease foi observada quando a fermentação ocorreu em temperaturas entre 20 e 27 °C. Levando-se em consideração o custo para a

redução da temperatura de fermentação, pode-se fixar a temperatura ideal em 27 °C.

Tabela 2.8 - Matriz do planejamento experimental completo 2² para a otimização das condições de fermentação e resultados obtidos

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atividade de protease (U/mL)
1	30,0	200	7,14
2	30,0	100	7,52
3	20,0	200	8,42
4	20,0	100	8,50
5	18,0	150	7,80
6	32,0	150	6,90
7	25,0	80	8,59
8	25,0	220	8,89
9	25,0	150	8,55
10	25,0	150	7,98
11	25,0	150	8,31

Tabela 2.9 - Análise de variância do planejamento experimental para a otimização das condições de fermentação $R^2 = 0,84$ $p < 0,10$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	F _{2,8}
Regressão	3,50	2	1,75	21,87	3,11
Resíduo	0,65	8	0,08		
Falta de ajuste	0,49	6			
Erro puro	0,16	2			
Total	4,15	10			

As temperaturas de fermentação para a produção de protease descritas na literatura são bastante variáveis e dependem do microrganismo produtor. O actinomiceto *Arthrobacter* sp apresentou temperatura de 30 °C como a ideal para fermentação e produção de protease (ADAMITSCH *et al.*, 2003). Os

microrganismos *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20, *Bacillus horikoshii* e *Penicillium* sp apresentaram as temperaturas de 28, 34 e 45 °C respectivamente (PHADATARE *et al.*, 1993; JOO *et al.*, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2003).

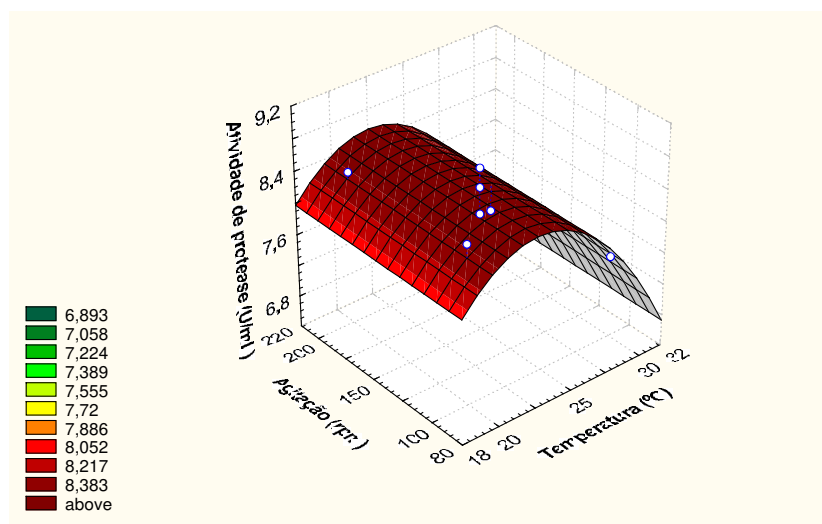


Figura 2.2 Superfície de resposta das condições de fermentação para a produção de protease por *C. cellulans* 191

Cinética de crescimento e produção da protease no meio de cultura otimizado

A protease foi produzida durante a fase exponencial de crescimento (Figura 2.3). A atividade de protease foi detectada no meio de cultura desde as primeiras horas de crescimento, o que mostra que as células de levedura desidratadas são um bom indutor para a produção desta enzima. A atividade enzimática aumentou acentuadamente durante a fase de crescimento exponencial e estabilizou-se durante a fase estacionária de crescimento.

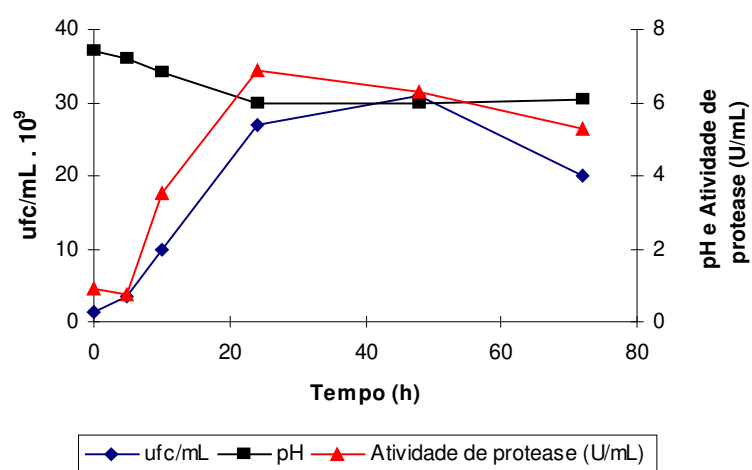


Figura 2.3 Cinética de crescimento e produção de protease por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 no meio de cultura otimizado

Conclusões

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficiente para a otimização dos componentes do meio de cultura para a produção de protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Os componentes tiamina, biotina e $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$, do meio de cultura sugerido por SCOTT & SCHECKMAN (1980), mostraram-se não essenciais para o crescimento e produção da protease.

A otimização do meio de cultura proporcionou aumento de cerca de 36 vezes na atividade de protease em relação a atividade no meio de cultura inicial. A otimização das condições de fermentação apresentou aumento na produção de protease de cerca de 20% em relação as condições de fermentação iniciais.

A máxima produção de protease ocorreu em meio de cultura composto por 8,0% de células de levedura desidratadas; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e em solução tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0, após 24 horas de fermentação a 27 °C e agitação de 150 rpm.

Referências Bibliográficas

- ADAMITSCH, B. F., KARNER, F., HAMPEL, W. Proteolytic of a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 227-229, 2003.
- AGRAWAL, D., PATIDAR, P., BANERJEE, T., PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 2, p. 1-6, 2003.
- ÇALIK, P., BILIR, E., ÇALIK, G., OZDAMAR, T. H. Influence of pH conditions on regulation in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 685-697, 2002.
- CHEN, H. M., MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 574-578, 1995.
- FUNATSU, M., OH, H., AIZONO Y., SHIMODA T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1975-1977, 1978.
- JOO, H. S., KUMAR, C. G., PARK, G. C., KIM, K. T., PAIK, S. R., CHANG, C. S. Optimization of the production of na extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 155-159, 2002.
- MABROUK, S. S., HASHEM, A. M., EL-SHAYEB, N. M. A., ISMAIL, A. M. S., ABDEL-FATTAH, A. F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 155-159, 1999.
- MILES, A. A., MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.
- OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p. 2387-2394, 1977.
- PHADATARE, S. U., DESHPANDE, V. V., SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with comercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 1, p. 72-76, 1993.
- ROWLEY, B. I., BULL, A. T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879-899, 1977.
- SCOTT, J. H., SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 414-423, 1980.

SINGH, J., BATRA, N., SOBTI, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781-785, 2001.

Capítulo 3 - Purificação e caracterização de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Resumo

Cellulosimicrobium cellulans 191 é um actinomiceto isolado de resíduos de indústria de fermentação alcoólica. Ele é produtor de um complexo enzimático composto de β -1,3-glucanases, proteases e quitinases, capaz de lisar células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*. No estudo da purificação da protease, observou-se quatro picos de proteína com atividade de protease eluídos da coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose. A fração com maior atividade de protease foi, em seguida, aplicada em coluna de Q-Sepharose sendo purificada 16,8 vezes. A protease purificada apresentou maior atividade em temperaturas entre 50-64 °C e em pH entre 7,0-8,0 e mostrou-se estável em temperaturas até 83 °C por 1 hora na faixa de pH de 4,0-7,5; quando estabilizada por ditioneitol (DTT). Na presença de cisteína, nas mesmas condições, a protease perdeu apenas 20% de sua atividade inicial. Apresentou massa molecular de 55 KDa, estimada por filtração em gel, e K_m de 0,027 mg de caseína/mL. A protease purificada teve sua atividade ativada por $FeCl_3$ e inibida parcialmente (16,5%) por fenilmetilsulfonilfluoreto na concentração de 1mM.

Palavras-chave: *Cellulosimicrobium cellulans*, protease alcalina, purificação, caracterização

Introdução

Muitos microrganismos produtores de protease alcalina têm sido descritos na literatura. Os microrganismos do gênero *Bacillus* são os mais estudados como produtores dessas proteases e suas enzimas tem sido bastante exploradas comercialmente.

Devido à grande importância e aplicação das proteases alcalinas, encontram-se disponíveis no mercado produtos comerciais como Alcalase, Savinase, Opticlean, Maxatase, entre outros.

As proteases alcalinas podem ser usadas para a produção de hidrolisados protéicos a partir de proteínas vegetais ou animais, para o aumento da digestibilidade, biodisponibilidade e funcionalidade destes produtos.

Os complexos enzimáticos produzidos por microrganismos que lisam a parede celular de leveduras apresentam geralmente atividade de protease, como foi descrito por VENTOM & ASENJO (1990), SAEKI *et al.* (1994a) e recentemente por ADAMITSCH *et al.* (2003).

Este trabalho visou a purificação de uma protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e a determinação das características bioquímicas da enzima purificada quanto ao pH e a temperatura ótima de atividade e à estabilidade, através da metodologia de planejamento experimental e superfície de resposta. Determinou-se também o efeito da concentração de substrato na atividade da protease e estimou-se a massa molecular por filtração em gel S-200.

Material e métodos

Material

Caseína bovina, ácido tricloroacético, ácidos, bases, sais e minerais (Merck Co. ou equivalente) e células de *S. cerevisiae* desidratadas.

Microrganismo: *Cellulosimicrobium cellulans* 191 isolado anteriormente de resíduos de indústria de fermentação alcoólica.

Produção da protease

Para a produção de protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi utilizado meio de cultura otimizado anteriormente, composto de 8,0% de células de *S. cerevisiae* desidratadas; 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em solução tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0. Utilizou-se inóculo com 16 horas de

crescimento. Uma alíquota de 5mL de inóculo foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 45 mL de meio de cultura. A fermentação ocorreu a 28 °C com agitação de 150 rpm por 24 horas. O meio de cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi utilizado como preparação enzimática bruta.

Determinação da atividade de protease

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato (OBATA *et al.*, 1977). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução de caseína 2%, 1 mL de solução tampão fosfato 0,15 M (pH 8,0) e 0,5 mL de solução enzimática, foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi medida a 280 nm, utilizando como controle o meio de reação onde a solução enzimática foi substituída por água destilada.

Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade de enzima necessária para produzir aumento na absorbância do filtrado igual a 1,0 após 30 minutos de reação (ROWLEY & BULL, 1977).

Determinação da atividade de outras enzimas na preparação enzimática bruta

Determinação da atividade de β -1,3-glucanase

A determinação da atividade de β -1,3-glucanase foi realizada segundo SAEKI *et al.* (1994b) com pequenas modificações. A mistura de reação contendo 250 μ L de extrato enzimático e 250 μ L de solução 1% de laminarina em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 foi incubada a 55 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada por aquecimento em banho em ebulição por 5 minutos e determinou-se a quantidade de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.

Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores por mL de extrato

enzimático e por minuto de reação, nas condições descritas. Utilizou-se glicose como padrão de açúcar redutor.

Determinação da atividade de celulase

A determinação da atividade de celulase foi realizada segundo PONCE-NOYOLA *et al.* (2001) com modificações. A mistura de reação contendo 1,0 mL de solução 1% (m/v) de carboximetilcelulose em tampão Tris/HCl 50mM pH 7,2 e 1,0 mL da diluição apropriada do extrato enzimático foi incubada a 40 °C por 10 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento em banho de gelo e determinou-se os açúcares redutores liberados pela metodologia de Somogyi-Nelson. Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade em μmol de açúcares redutores liberada por minuto de reação nas condições indicadas. Utilizou-se glicose como padrão de açúcar redutor.

Determinação da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada segundo método descrito por SANDHU *et al.* (1989). A mistura de 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de quitina coloidal 0,2% em tampão citrato de sódio (pH 5,8) foi incubada a 37 °C por 2 horas. Após este período foi adicionado 0,1 mL de borato de potássio 0,8 M (pH 9,0) e os tubos foram aquecidos em banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de solução 10 % de dimetil aminobenzaldeído em ácido acético contendo 12,5% de ácido clorídrico 10 N e os tubos foram incubados a 37 °C por 20 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 585 nm.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglicosamina por mL de extrato enzimático nas condições da reação. A curva padrão foi preparada utilizando-se N-acetil glicosamina na faixa de 50 a 400 $\mu\text{g/mL}$.

Fracionamento da protease com sulfato de amônio

A enzima bruta, obtida da centrifugação do meio de cultura, foi fracionada com sulfato de amônio com 40% de saturação. Após 5 horas de incubação a 10

°C, o precipitado foi coletado por centrifugação a 12.300 x g por 15 minutos a 5 °C, ressuspendido em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5 e dialisado contra a mesma solução. Ao sobrenadante desta centrifugação acrescentou-se sulfato de amônio para atingir a saturação de 60%, repetindo-se os passos seguintes. E assim também para a saturação de 80%.

Após a diálise dos precipitados de cada saturação, determinou-se a atividade de protease como descrito anteriormente, e a concentração de proteína pelo método de Lowry.

Purificação da protease em coluna de DEAE-Sepharose

A solução enzimática foi fracionada com sulfato de amônio com 40% de saturação. Após 5 horas de incubação a 10 °C, o precipitado foi coletado por centrifugação a 12.300 x g por 15 minutos a 5 °C e ao sobrenadante acrescentou-se sulfato de amônio para atingir a saturação de 80 %. Este precipitado foi coletado por centrifugação, dialisado contra solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5 e aplicado em coluna de cromatografia empacotada com 10 mL de resina DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5. A eluição ocorreu em um gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 a um fluxo de 1,0 mL/min. em um sistema FPLC (Pharmacia). O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm. A atividade de protease nas frações foi determinada como descrito anteriormente. As frações ativas foram reunidas e dialisadas contra solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5 e foi determinada a concentração de proteína pelo método de Bradford (DANIELS *et al.*, 1994).

Purificação da protease em coluna de troca iônica Q-Sepharose

A fração eluída da coluna de DEAE que apresentou maior atividade de protease, foi aplicada em uma coluna com 5 mL de resina Q-Sepharose, previamente equilibrada com solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5 e eluída em um gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 a um fluxo

de 1,0 mL/min. em um sistema FPLC (Pharmacia). O perfil de eluição das proteínas e a atividade de protease foram determinados como descrito anteriormente. As frações ativas foram reunidas e dialisadas como descrito anteriormente. Todos os testes para a caracterização bioquímica da protease purificada foram realizados na presença de 5 mM de cisteína, usado como estabilizador da enzima.

Determinação da massa molecular

A massa molecular da protease purificada foi determinada por cromatografia em gel de filtração com coluna de Sephacryl S-200 1660 HiTrep. Blue dextrana foi utilizada para determinação do volume vazio e as proteínas inibidor de tripsina de soja (20.100 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), albumina de soro bovino (67.000 Da) e fosforilase b (94.000 Da) foram usadas como padrões.

Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A constante de Michaelis-Menten e a velocidade máxima da protease purificada foi determinada utilizando-se como substrato caseína Hammarsten na faixa de concentração de 0,01 a 5,0 mg/mL em solução tampão fosfato 50 mM pH 8,0 a 50 °C. A atividade de protease foi determinada como descrito anteriormente e os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

Efeito de alguns sais e compostos químicos na atividade da protease purificada

Para o estudo dos efeitos de alguns sais e outros compostos inibidores na atividade da protease, a solução da enzima purificada foi tratada previamente por 1 hora a 30 °C em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 com 1,0 mM dos compostos $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $CuSO_4$, azida sódica,

EDTA, 2-mercaptoetanol, ácido aminobenzóico, N-bromossuccinimida, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e iodoacetamida. A atividade residual de protease foi determinada e, como controle, determinou-se a atividade de protease na ausência de sais e compostos inibidores.

Planejamento experimental para a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada

Para a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^2 . Os níveis das variáveis independentes, temperatura e pH, estudados estão apresentados na Tabela 3.1. A variável dependente considerada foi a atividade de protease relativa. Foram realizados 11 ensaios, com três pontos centrais e quatro pontos axiais. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software Statistica, versão 5.0.

Em cada um dos ensaios a reação entre a enzima purificada e o substrato (caseína) ocorreu durante 30 minutos nas temperaturas e valores de pH indicados na Tabela 3.5. A determinação da atividade de protease foi realizada como descrito anteriormente.

Tabela 3.1 - Níveis das variáveis do planejamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

Fator	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
pH	5,4	6,0	7,5	9,0	9,6
temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	36,0	40,0	50,0	60,0	64,0

* $\alpha=1,41$

Planejamento experimental para a determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade da protease purificada

Para a determinação da estabilidade da protease purificada, a enzima foi submetida a tratamento em diferentes temperaturas e valores de pH conforme

mostra a Tabela 3.2. Em seguida, alíquotas da enzima foram retiradas nos intervalos de 1 e 4 horas de incubação e ajustadas ao pH e temperatura ótimos de atividade para se determinar a atividade residual de protease após o tratamento.

Tabela 3.2 - Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental para determinação da estabilidade da protease purificada

Fator	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
pH	4,0	5,0	7,5	10,0	11,0
temperatura (°C)	26,8	35,0	55,0	75,0	83,2

* α = 1,41

Resultados e discussão

Determinação das atividades de algumas enzimas produzidas no extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto apresentou 8,5 U/mL de atividade de protease; 0,21 μ mol de glicose/mL.min. de atividade de β -1,3-glucanase; 0,20 μ mol de glicose/mL.min de atividade de celulase e nenhuma atividade de quitinase.

Fracionamento da protease com sulfato de amônio

A precipitação da protease com sulfato de amônio mostrou-se uma forma de concentração e também um passo de purificação. Observa-se na Tabela 3.3 que a saturação de 40 % de sulfato de amônio precipitou grande quantidade de proteína (1804,0 mg de proteína) que apresentava atividade total de protease muito baixa (110,0 U). As saturações de 60 e 80% de sulfato de amônio precipitaram proteínas que apresentaram boa atividade de protease, principalmente a saturação de 60%.

Tabela 3.3 - Precipitação fracionada da protease com sulfato de amônio

Extrato	Volume (mL)	Ativ. de protease (U/mL)	Ativ. de protease total (U)	Conc. de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)
bruto	600,0	8,5	5100,0	6,8	4080,0	1,25
40%*	55,0	2,0	110,0	32,8	1804,0	0,06
60%*	51,0	49,7	2534,7	13,7	698,7	3,63
80%*	32,0	24,4	780,8	10,3	329,6	2,37

* extrato precipitado de forma fracionada com a concentração de sulfato de amônio indicada e dialisado contra solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5.

Purificação da protease em coluna de DEAE-Sepharose e Q-Sepharose

Na purificação em colunas de resina de troca iônica, a protease foi parcialmente inativada. Na tentativa de estabilizar a enzima, foram testados compostos redutores como ditioneitol (10 µg/mL) e cisteína (5 mM), que restabeleceram a atividade enzimática e permitiram a determinação da atividade nas frações eluídas das colunas de troca iônica.

A enzima foi purificada por adsorção em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,5. A Figura 3.1 mostra o perfil da eluição cromatográfica em coluna de DEAE-Sepharose.

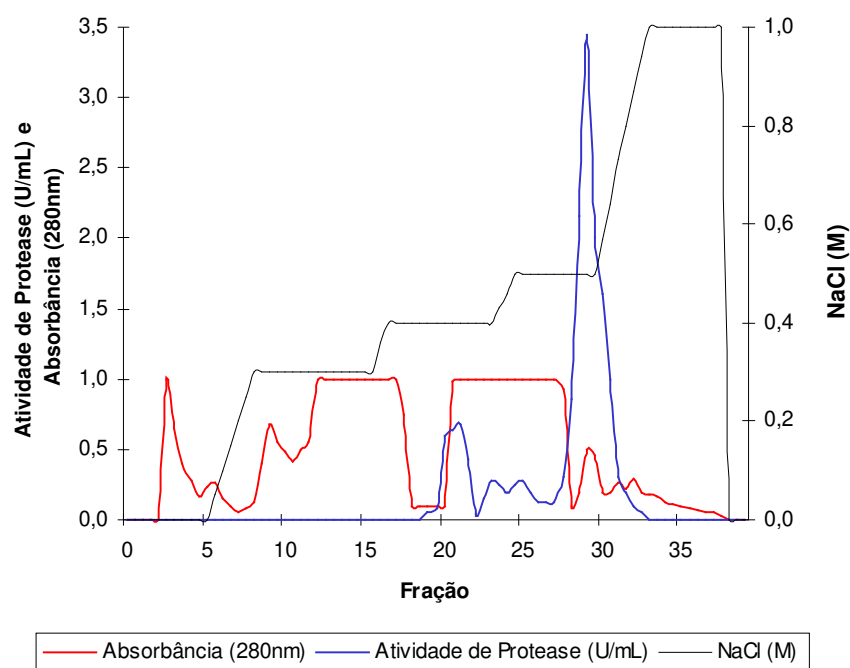


Figura 3.1 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Foram obtidos quatro picos principais de atividade de protease. O primeiro pico correspondente às frações de 19 a 22 foram eluídas com tampão contendo 0,4 M de NaCl. A fração mais ativa deste pico apresentou atividade de protease de 0,68 U/mL.

O segundo e o terceiro picos de atividade foram formados pelas frações 23 a 26 que eluíram com tampão contendo NaCl entre 0,4 e 0,5 M. A maior atividade apresentada pelas frações correspondentes a este pico foi de 0,27 U/mL.

E, o quarto pico correspondente às frações 28 a 31 eluiu com tampão contendo 0,5 M de NaCl. A fração 29, mais ativa deste pico, apresentou atividade de 3,45 U/mL. Para este estudo foi selecionada somente a fração 29 que apresentou a maior atividade de protease entre todas as frações eluídas da coluna de DEAE-Sepharose (Figura 3.1).

Para a aplicação na coluna de troca iônica Q-Sepharose, a fração 29, eluída da coluna de DEAE-Sepharose, foi dialisada contra tampão fosfato 50 mM

pH 7,5. A figura 3.2 mostra o perfil de eluição das proteínas em coluna Q-Sepharose.

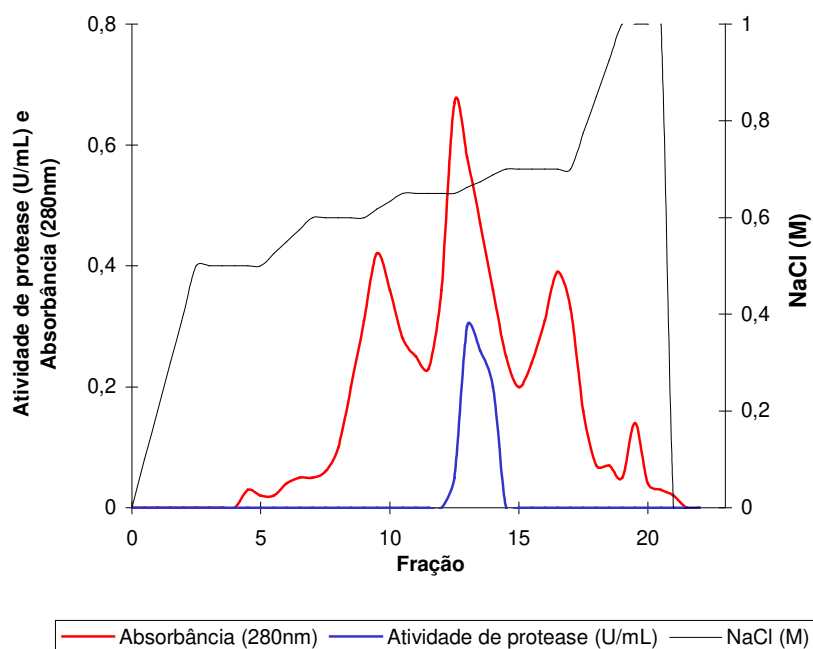


Figura 3.2 - Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Foram obtidos três picos de proteína principais no perfil de eluição da coluna de Q-Sepharose, mas apenas um deles apresentou atividade de protease. As frações 13 e 14, correspondentes a este pico de proteína, apresentaram atividades de protease de 0,3 U/mL e 0,2 U/mL, respectivamente, e eluíram com 0,65 M de NaCl.

As frações 13 e 14 eluídas da coluna Q-Sepharose, contendo a protease purificada, foram reunidas e utilizadas na caracterização bioquímica da enzima. O rendimento da enzima foi de 7,8% e a protease foi purificada 16,8 vezes, como mostra a Tabela 3.4. Estas frações não apresentaram atividade de β -1,3-glucanase ou celulase.

Tabela 3.4 - Purificação da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191

	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Sobrenadante	2235,60	2425,35	0,92	1,0	100,0
Fracionamento com 40-80% de (NH ₄) ₂ SO ₄	1544,40	346,95	4,45	4,8	69,1
DEAE-Sepharose	388,12	25,87	15,00	16,3	17,4
Q-Sepharose	174,37	11,25	15,50	16,8	7,8

Métodos de purificação de diversas proteases de microrganismos têm sido descritos na literatura. A protease de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1, microrganismo capaz de lisar células de levedura, foi purificada 39,6 vezes e apresentou rendimento de 19% quando concentrada por ultrafiltração com membrana de exclusão de 3.000 Da, seguida de cromatografia em coluna de Fenil-Sepharose CL-4B e DEAE-Sepharose (SAEKI *et al.*, 1994a).

Uma protease do *Bacillus mojavenensis* foi purificada cerca de 17 vezes através da precipitação com sulfato de amônio (0-85 %) e cromatografia em coluna de Q-Sepharose (BEG & GUPTA, 2003).

ROMERO *et al.* (2001) purificaram duas proteases de *Serratia marcescens*, uma metalo e uma serina protease, através da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de Q-Sepharose e cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200. A metalo protease foi purificada 4,2 vezes e apresentou rendimento de 15,7%, enquanto que a serina protease foi purificada 119,9 vezes e seu rendimento foi de 9,9 %.

TOMASCHOVÁ *et al.* (1998) purificaram a protease de *Brevibacterium linens* ATCC 9172 através de ultrafiltração com membrana de exclusão de 10.000 Da e cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.

TUNGA *et al.* (2003) purificaram a protease de *Aspergillus parasiticus* pela precipitação com 3 volumes de acetona, cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e cromatografia em gel de filtração Superose 12. Esta protease fúngica foi purificada 200 vezes e apresentou rendimento de 17 %.

Determinação da massa molecular

A massa molecular da protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi estimada em 55 kDa por filtração em gel Sephacryl S-200 (Figura 3.3).

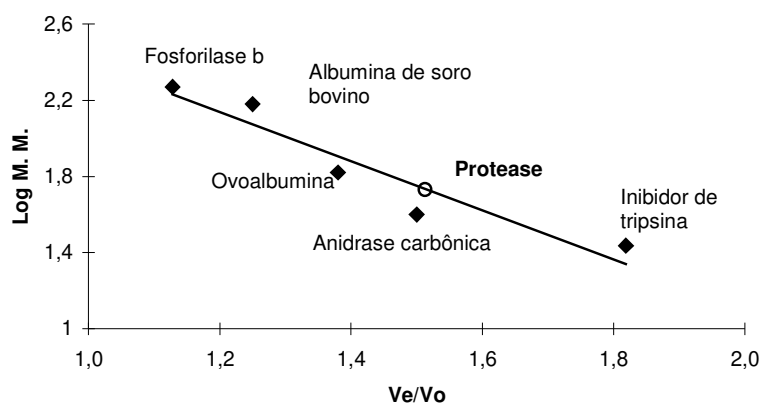


Figura 3.3 - Determinação da massa molecular da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 através de cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200

As massas moleculares de algumas proteases de microrganismos líticos foram descritas na literatura. A protease de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 apresentou massa molecular estimada em 20 kDa por eletroforese SDS-PAGE (SAEKI *et al.*, 1994a). FUNATSU *et al.* (1978) estimaram a massa molecular da protease de *Arthrobacter luteus* em 40,5 kDa por eletroforese SDS-PAGE. A massa molecular da protease de Zymolyase foi estimada em 29 kDa (KITAMURA, 1982). E, USUI & OGUCHI (1986) estimaram a massa molecular da protease de *Rhizoctonia solani* em 14 kDa por eletroforese SDS-PAGE e em 10,5 kDa por cromatografia em gel de filtração.

TOMASCHOVÁ *et al.* (1998) publicaram que a massa molecular da protease de *Brevibacterium linens* ATCC 9172 foi estimada em 56 kDa. A protease de *Bacillus mojavensis* apresentou massa molecular de 30 kDa (BEG & GUPTA, 2003).

A bactéria *Serratia marcescens* produziu duas proteases, uma metalo e outra serina protease. A metalo protease apresentou massa molecular de 53,5 kDa e a serina protease, 66,5 kDa (ROMERO *et al.*, 2001).

A levedura *Candida olea* produz uma protease alcalina cuja massa molecular foi estimada em 30,9 kDa (NELSON & YOUNG, 1987).

Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 apresentou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,027 mg de caseína/mL e 6,25 U/mg respectivamente para o substrato caseína (Figura 3.4).

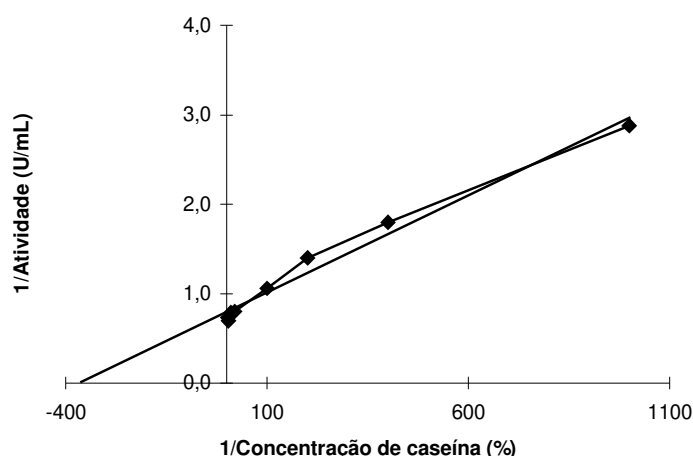


Figura 3.4 - Determinação das constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da protease purificada de acordo com o gráfico de Lineweaver-Burk

Essa protease apresentou maior afinidade pelo substrato caseína quando comparada com a protease de Zymolyase do complexo enzimático produzido pelo microrganismo lítico *Arthrobacter luteus*, que apresentou valor de K_m de 0,84 mg de caseína/mL (KITAMURA, 1982).

A protease purificada de *Bacillus subtilis* NCIM 2713 apresentou K_m de 2,5 mg de caseína/ mL (MANE & BAPAT, 2001).

Efeito de alguns sais e compostos químicos na atividade da protease purificada

A Figura 3.5 ilustra que a protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi ativada pela presença de FeCl_3 (1 mM) em 26,5%. O efeito do FeCl_3 na ação da protease purificada foi significativamente diferente do efeito de todos os outros sais estudados, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o efeito dos compostos ZnSO_4 , MgSO_4 , HgCl_2 , FeSO_4 , MnSO_4 , CaCl_2 e CuSO_4 .

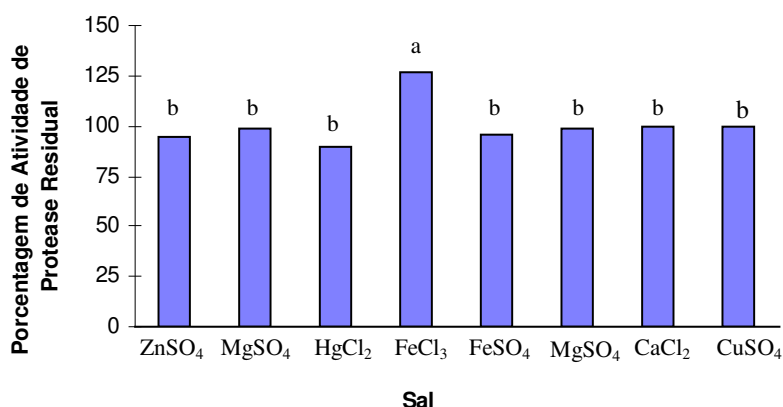


Figura 3.5 - Efeito de alguns sais (1 mM; $p < 0,05$) na atividade da protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ – Teste de Tukey)

O efeito do composto EDTA não apresentou diferença significativa do resultado obtido para azida sódica. Os efeitos dos compostos 2-mercaptoetanol, ácido aminobenzóico, N-bromossuccinimida e iodoacetamida não mostraram diferença significativa, segundo o teste de Tukey para $p < 0,05$ (Figura 3.6).

O efeito inibitório apresentado pelo composto PMSF foi estatisticamente diferente dos efeitos de todos os demais compostos químicos estudados, com exceção da iodoacetamida. Dentre os compostos estudados, o inibidor específico de serina protease, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) foi o que apresentou maior efeito inibitório, cerca de 16,3%.

A protease de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 foi fortemente inibida por diisopropilfluorofosfato (DFP), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e HgCl_2 , e foi parcialmente inibida por CuCl_2 e cisteína, todos em concentração de 1 mM (SAEKI *et al.*, 1994a). FUNATSU *et al.* (1978) publicaram que a protease de *Arthrobacter luteus* foi completamente inibida por DFP e PMSF na concentração final de 1 mM.

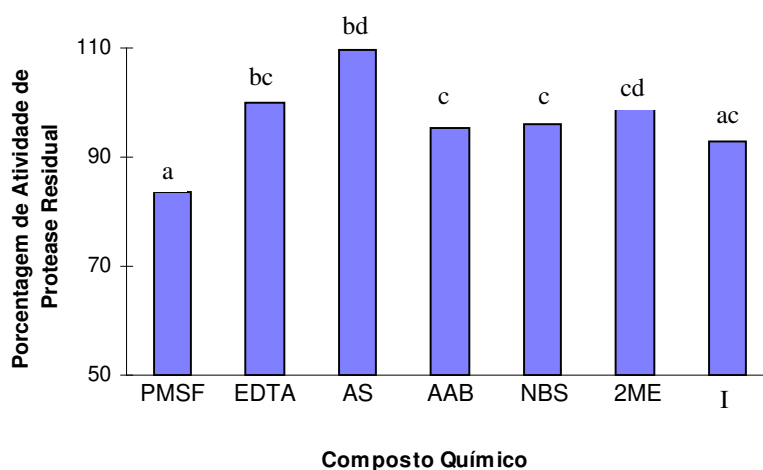


Figura 3.6 - Efeito de alguns compostos químicos na atividade da protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191. (PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto, EDTA: ácido etilenediaminotetraacético, AS: azida sódica, AAB: ácido aminobenzóico, NBS: N-bromosuccinimida, 2ME: 2-mercaptoetanol, I: iodoacetamida)

A protease da levedura *Candida olea* foi inibida por PMSF e EDTA, enquanto que o composto ditioneitol (DTT) inibiu a enzima parcialmente (NELSON & YOUNG, 1987). ROMERO *et al.* (2001) verificaram que a metalo protease produzida por *Serratia marcescens* foi fortemente inibida por EDTA e a serina protease por PMSF.

TOMASCHOVÁ *et al.* (1998) observaram que a protease de *Brevibacterium linens* ATCC 9172 foi inibida por PMSF e ativada pelos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada

Os resultados dos ensaios realizados para o planejamento experimental completo 2^2 para a determinação do pH e temperatura ótimos estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 para a determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da protease purificada

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de protease residual (%)
1	9,0	60,0	91,7
2	9,0	40,0	68,6
3	6,0	60,0	83,5
4	6,0	40,0	73,5
5	7,5	36,0	89,2
6	7,5	64,0	100,0
7	5,4	50,0	76,8
8	9,6	50,0	65,3
9	7,5	50,0	95,9
10	7,5	50,0	95,9
11	7,5	50,0	95,0

No estudo da determinação da temperatura e pH ótimos de atividade da protease, observou-se que a enzima mostrou maior atividade nos pontos centrais e no ponto axial em que a temperatura era de 64 °C (Tabela 3.5). O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da protease foi estatisticamente significativo a nível de $p < 0,05$, conforme apresentado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Efeitos das variáveis temperatura e pH sobre a atividade da protease purificada

Variáveis	Efeitos	Desvio padrão	t(2)	p
Média	95,60	0,30	318,67	0,000

pH (L)	-3,26	0,37	-8,89	0,012
pH (Q)	-26,31	0,44	-60,17	0,000
Temperatura (L)	12,12	0,37	32,98	0,001
Temperatura (Q)	-2,76	0,44	-6,32	0,024
Temperatura e pH	6,6	0,52	12,70	0,006

O modelo matemático obtido através da análise estatística da atividade da protease foi estatisticamente significativo no limite de confiança de 95% com R^2 igual a 0,92. Porém, o modelo estatístico não foi preditivo uma vez que a relação entre F calculado e $F_{5,5}$ foi baixa (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Análise de variância para o planejamento experimental fatorial 2^2 para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade
 $p < 0,05$ e $R^2 = 0,92$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	$F_{5,5}$
Regressão	1371,32	5	274,26	12,18	5,05
Resíduo	112,60	5	22,52		
Falta ajuste	112,06	3			
Erro puro	0,54	2			
Total	1483,92	10			

A equação polinomial abaixo representa o modelo estatístico codificado que descreve a variação na atividade da protease provocada pela temperatura e pH.

Atividade de protease (U/mL) = $95,6 - 1,62 \text{ pH} - 13,15 \text{ pH}^2 + 6,05 \text{ T} - 1,37 \text{ T}^2 + 3,27 \text{ pH.T}$, onde pH representa o valor codificado do pH e T o valor codificado da temperatura.

A maior atividade de protease foi observada quando a reação entre a enzima e o substrato ocorreu em temperaturas entre 50 e 64 °C e em pH entre 7,0 e 8,0; como mostram as Figuras 3.7 e 3.8.

ADAMITSCH *et al.* (2003) publicaram que a protease do microrganismo *Arthrobacter* sp apresentou temperatura e pH ótimos de atividade de 55,0 °C e

11,0, respectivamente. As proteases de *Oerskovia xanthineolytica*, *Oerskovia* sp CK e *Arthrobacter luteus* apresentaram pH ótimos de atividade de 9,5-11,0; 9,0 e 10,5 respectivamente (SAEKI *et al.*, 1994a; OBATA *et al.*, 1977; FUNATSU *et al.*, 1978).

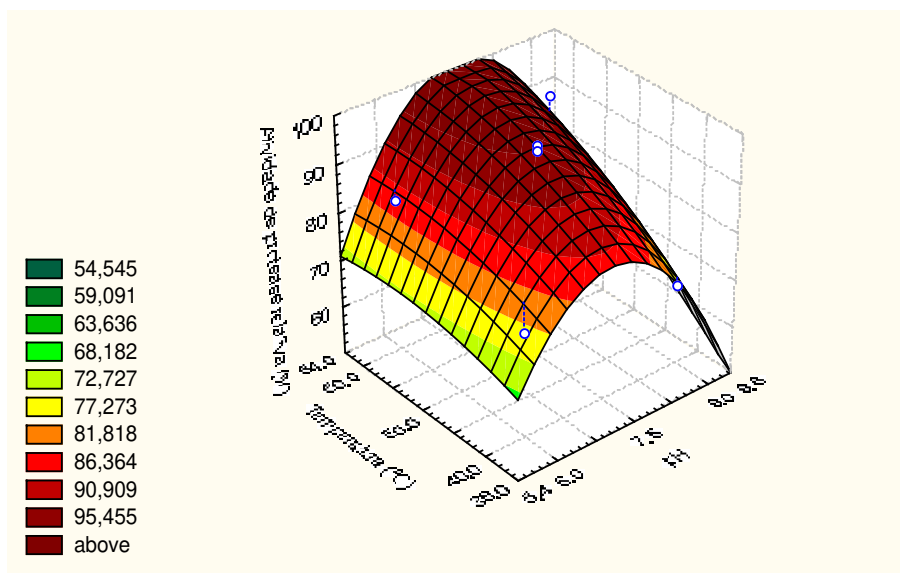


Figura 3.7 - Superfície de resposta do efeito da temperatura e do pH na atividade da protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191

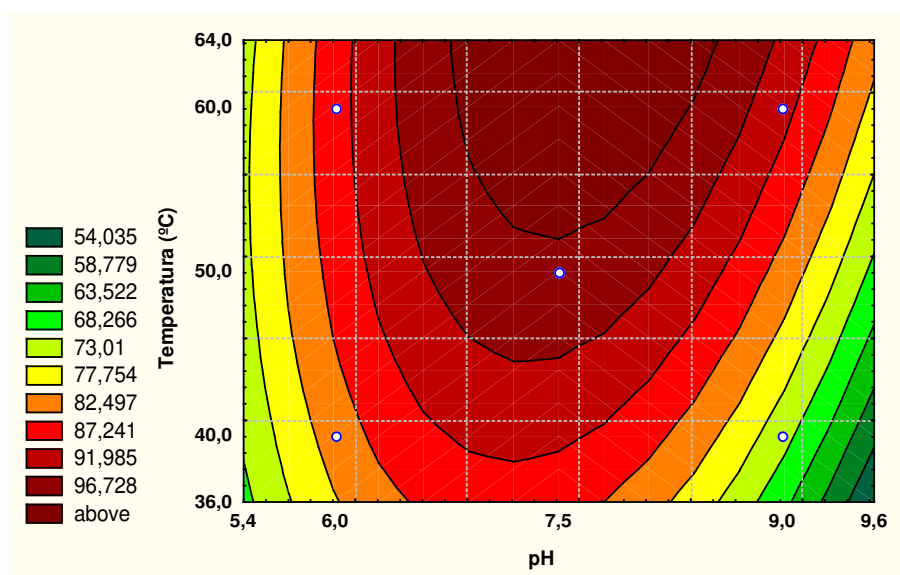


Figura 3.8 - Área de contorno do efeito da temperatura e do pH na atividade da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191

As proteases de *Bacillus* sp B21-2, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus horikoshii* e *Bacillus clausii* I-52 mostraram maior atividade em valores de pH de 11,5; 10,5; 9,0 e 11,0 respectivamente (FIJIWARA & YAMAMOTO, 1987; BEG & GUPTA, 2003; JOO *et al.*, 2002; JOO *et al.*, 2003). As temperaturas ótimas de atividade das proteases microbianas mencionadas acima variam entre 45 e 60 °C. As proteases alcalinas de *Bacillus* sp B21-2, *B. mojavensis* e *B. calussi* I-52 apresentaram temperatura ótima de atividade de 60 °C.

Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade da protease purificada

Conforme mencionado anteriormente, a protease apresentou-se parcialmente inativada quando eluíu da resina de cromatografia de troca iônica. Para o restabelecimento da atividade foi necessária a ação de um agente redutor como ditioneitol (DTT) ou cisteína. Assim sendo, estudou-se a estabilidade da protease purificada quando estabilizada por cada um destes compostos, conforme apresenta a Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Matriz dos planejamentos experimentais 2² para a determinação da estabilidade da protease purificada

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de protease relativa (%)			
			cisteína 5 mM (1h)	cisteína 5 mM (4h)	DTT 10 µg/mL (1h)	DTT 10 µg/mL (4h)
1	10,0	75,0	49,1	0,0	67,2	11,1
2	10,0	35,0	91,0	71,2	86,6	86,1
3	5,0	75,0	91,9	72,1	97,0	98,6
4	5,0	35,0	77,9	81,1	98,5	97,2
5	11,0	55,0	69,4	36,0	70,1	36,1
6	4,0	55,0	88,3	77,9	89,5	91,7

7	7,5	83,2	80,6	77,5	91,0	100,0
8	7,5	26,8	78,4	81,5	88,0	90,3
9	7,5	55,0	91,4	69,4	100,0	90,3
10	7,5	55,0	94,6	65,3	92,5	91,7
11	7,5	55,0	86,0	73,0	94,0	88,8

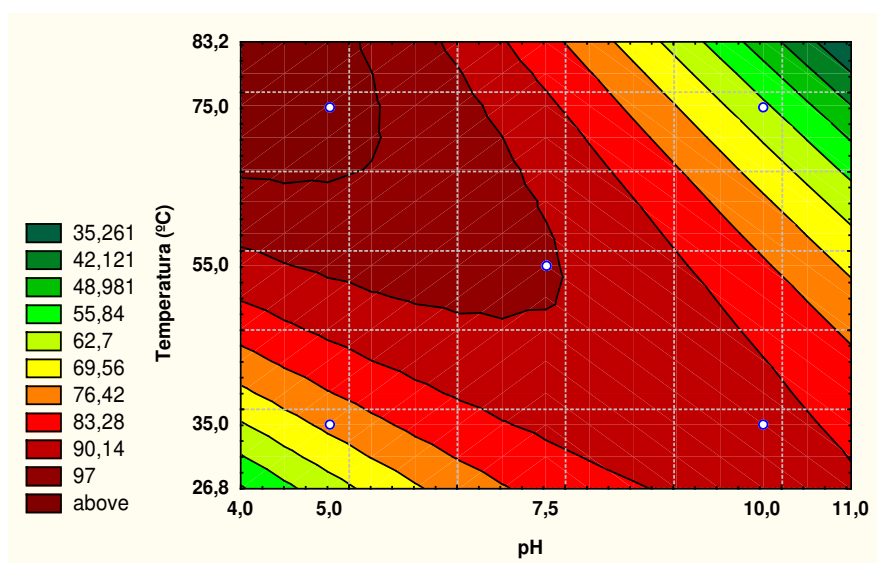


Figura 3.9 - Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 1 hora na presença de cisteína (5 mM).

A protease purificada manteve cerca de 97% de sua atividade após tratamento por 1 hora em pH entre 4,0 e 7,5 e temperaturas entre 55,0 e 83,2 °C na presença de cisteína 5 mM (Figura 3.9).

A atividade de protease residual após o tratamento durante 1 hora na presença de cisteína (5 mM) pode ser representada pela equação polinomial: Porcentagem de atividade de protease residual = $90,67 - 7,05 \text{ pH} - 6,33 \text{ pH}^2 - 6,01 \text{ T}^2 - 13,97 \text{ pH T}$, onde pH e T representam os valores de pH e temperatura (°C) codificados.

A análise de variância dos efeitos do pH e da temperatura após o tratamento da protease durante 1 hora com cisteína (5 mM) mostrou que o

modelo estatístico apresentado acima é estatisticamente significativo e preditivo (Tabela 3.9).

Na presença de DTT, a protease apresentou atividade residual maior que 93,6% na mesma faixa de pH e em temperaturas entre 26,8 e 83,2 °C e em pH entre 4,0 e 7,5 (Figura 3.10). Observou-se que o composto DTT foi melhor estabilizador da atividade da protease purificada em pH alcalinos para uma larga faixa de temperatura. A atividade residual nas mesmas condições de temperatura sofreu redução conforme o pH aumentava de 7,5 para 10,0. Em pH 10,0, a atividade residual foi de 80,9%.

Tabela 3.9 - Análises de variância dos efeitos do pH e da temperatura na estabilidade da protease após os tratamentos por 1 hora na presença de cisteína (5 mM), $R^2 = 0,86$, $p < 0,10$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	$F_{4,6}$
Regressão	1511,97	4	377,99	9,38	3,18
Resíduo	241,70	6	40,28		
Falta de ajuste	203,91	4			
Erro puro	37,79	2			
Total	1753,67	10			

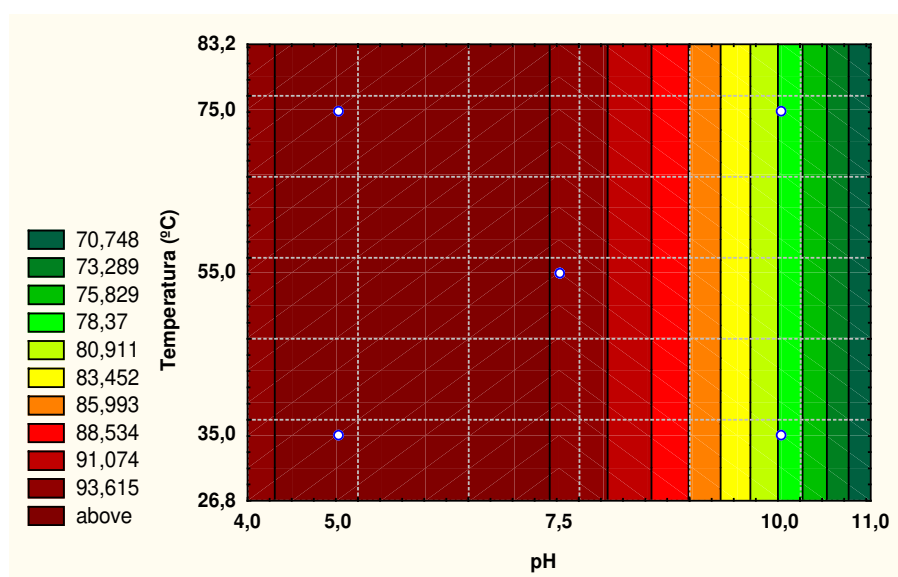


Figura 3.10 - Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 1 hora na presença de DTT (10 µg/mL).

A atividade de protease residual após o tratamento durante 1 hora na presença de DTT (10 µg/mL) pode ser representada pela equação polinomial: Porcentagem de atividade de protease residual = $93,30 - 8,64 \text{ pH} - 6,49 \text{ pH}^2$, onde pH e T representam os valores de pH e temperatura (°C) codificados. Este modelo estatístico apresentou-se significativo e preditivo, conforme mostra a Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Análise de variância do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease purificada após tratamento por 1 hora na presença de DTT (10 µg/mL), $R^2 = 0,74$, $p < 0,10$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	F _{2,8}
Regressão	859,09	2	429,54	11,70	3,11
Resíduo	295,14	8	36,70		
Falta de ajuste	263,64	6			
Erro puro	31,50	2			
Total	1154,23	10			

Na presença de cisteína, a atividade residual da protease purificada foi de 82,3% após 4 horas de tratamento em pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 45,0 e 83,2 °C. Quando o pH foi aumentado de 7,0 para 8,0, a mesma atividade residual foi observada para temperaturas em torno de 40 °C (Figura 3.11).

A atividade de protease residual após o tratamento durante 4 horas na presença de cisteína (5 mM) pode ser representada pela equação polinomial: Porcentagem de atividade de protease residual = $71,21 - 17,66 \text{ pH} - 9,79 \text{ pH}^2 - 10,73 \text{ T} - 15,55 \text{ pH T}$, onde pH e T representam os valores de pH e temperatura (°C) codificados (Figura 3.11). Este modelo estatístico apresentou-se significativo e preditivo, conforme mostra a Tabela 3.11.

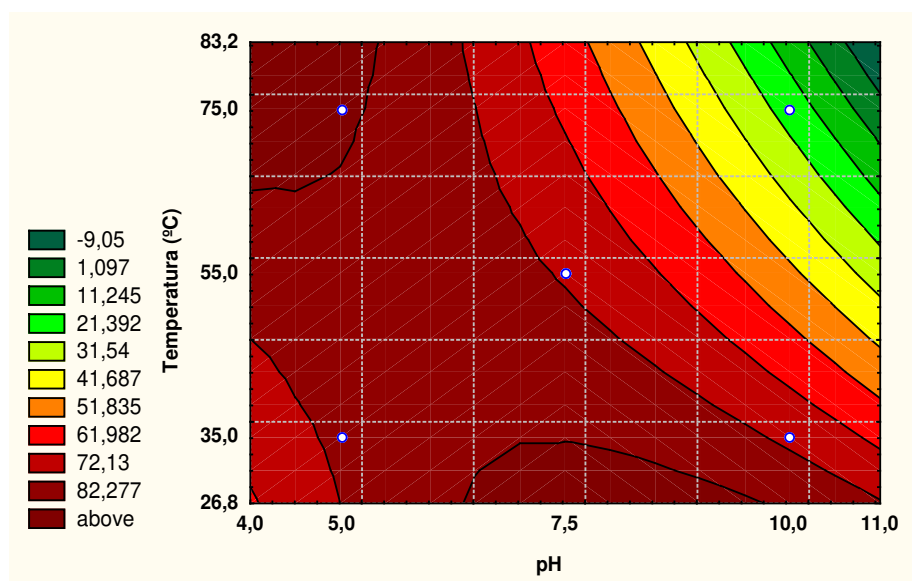


Figura 3.11 - Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 4 horas na presença de cisteína (5 mM).

Tabela 3.11 - Análise de variância do efeito do pH e temperatura na estabilidade da protease após tratamento por 4 horas na presença de cisteína (5mM), $R^2 = 0,82$, $p < 0,05$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	$F_{4,6}$
Regressão	4975,47	4	1243,87	6,74	3,18
Resíduo	1107,86	6	184,64		
Falta de ajuste	1078,23	4			
Erro puro	29,69	2			
Total	6083,33	10			

As Figuras 3.11 e 3.12 apresentam superfícies de contorno semelhantes. A protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 apresentou estabilidade após 4 horas de tratamento na faixa de temperatura de 26,8-83,2 °C e pH de 4,0-7,5, na presença de cisteína ou DTT como estabilizador.

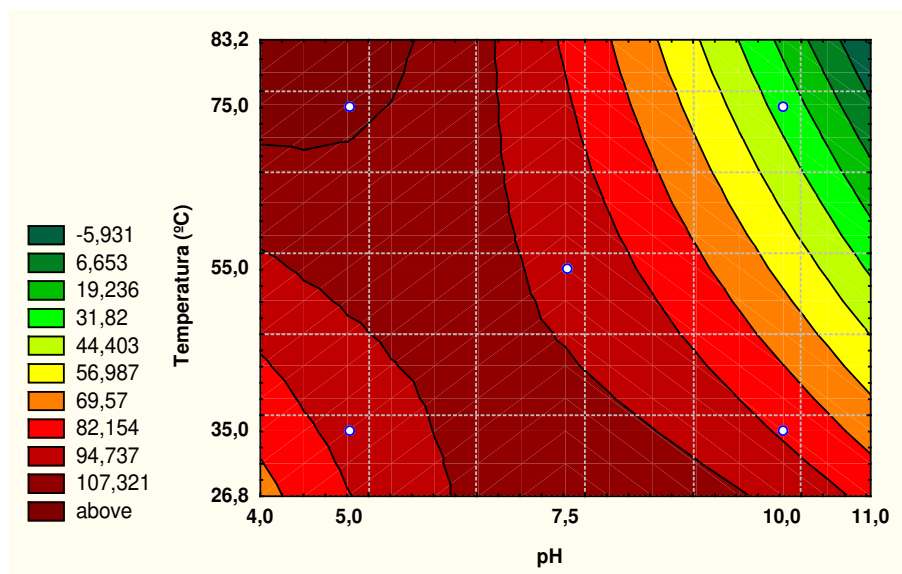


Figura 3.12 - Área de contorno do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da protease purificada após tratamento durante 4 horas na presença de DTT (10 µg/mL).

Tabela 3.12 - Análise de variância do efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease purificada após tratamento por 4 horas na presença de DTT (10 µg/mL), $R^2 = 0,87$, $p < 0,05$

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	$F_{4,6}$
Regressão	7226,34	4	1806,58	9,94	3,18
Resíduo	1090,16	6	181,69		
Falta de ajuste	1085,95	4			
Erro puro	4,21	2			
Total	8316,50	10			

A atividade de protease residual após o tratamento durante 4 horas na presença de DTT (10 µg/mL) pode ser representada pela equação polinomial: Porcentagem de atividade de protease residual = $91,09 - 22,15 \text{ pH} - 15,01 \text{ pH}^2 - 7,48 \text{ T} - 19,10 \text{ pH T}$, onde pH e T representam os valores de pH e temperatura

(°C) codificados. Este modelo estatístico apresentou-se significativo e preditivo, conforme mostra a Tabela 3.12.

Em 1982, KITAMURA verificou que a Zymolyase B, a protease do complexo enzimático produzido por *Arthrobacter luteus*, apresentou estabilidade em pH entre 7,0 e 12,0. E mostrou-se estável quando incubada em temperaturas inferiores a 60 °C durante 15 minutos.

A protease alcalina de *Bacillus* sp alcalofílico apresentou estabilidade a 50 °C mas foi inativada após 10 minutos a 60 °C (FUJIWARA & YAMAMOTO, 1987). A protease alcalina de *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20 apresentou estabilidade em pH entre 6,0 e 8,5 e em temperaturas inferiores a 40 °C (PHADATARE *et al.*, 1993).

A protease alcalina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 apresentou estabilidade a 50 °C por 15 minutos mas perdeu cerca de 49% da atividade após 1 hora na mesma temperatura (MABROUK *et al.*, 1999) e a protease alcalina de *B. horikoshii* apresentou estabilidade a 50 °C por 1 hora e em pH entre 6,0 e 12,0 (JOO *et al.*, 2002). *Bacillus mojavenensis* produziu uma protease alcalina que apresentou estabilidade em pH entre 7,0 e 11,5 por 48 horas e perdeu 50 % de sua atividade quando tratada a 60 °C por 150 minutos, 65 °C por 15 minutos e a 70 °C por 7 minutos (BEG & GUPTA, 2003).

A protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* apresentou excelente estabilidade em temperaturas elevadas quando comparada a dados de estabilidade de proteases alcalinas encontrados na literatura.

Conclusões

A protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi purificada 16,8 vezes através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em colunas de troca iônica DEAE-Sepharose e Q-Sepharose com rendimento de 7,8%. A enzima apresentou massa molecular estimada em 55 kDa por cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200.

A protease purificada apresentou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,027 mg/mL e 6,25 U/mg, respectivamente para o substrato caseína. A enzima foi ativada na presença de $FeCl_3$ e azida sódica. Os compostos $HgCl_2$ e iodoacetamida inibiram fracamente a atividade enzimática. O composto fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) foi o que apresentou maior efeito inibitório, 16,6%.

A atividade ótima da protease foi observada em temperaturas entre 50-64 °C, e em pH entre 7,0-8,0. A enzima mostrou estabilidade após incubação a 83,0 °C por até 4 horas, na faixa de pH de 6,0-8,0 na presença de DTT (10 µg/mL). A protease também se mostrou estável nessas condições na presença de cisteína 5 mM.

Referências Bibliográficas

- ADAMITSCH, B. F., KARNER, F., HAMPEL, W. Proteolytic activity of a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 227-229, 2003.
- BEG, Q. K., GUPTA, R. Purification and characterization of a oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 294-304, 2003.
- DANIELS, L., HANSON, R. S., PHILLIPS, J. A. Chemical Analysis In: Methods for General and Molecular Bacteriology. Gerharat, Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R., eds. American Society for Microbiology, Washington, p. 512-554, 1994. ISBN 1-55581-048-9
- FUJIWARA, N., YAMAMOTO, K. Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 3, p. 345-348, 1987.
- FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, Y., SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1975-1977, 1978.
- JOO, H. S., KUMAR, C. G., PARK, G. C., KIM, K. T., PAIK, S. R., CHANG, C. S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 155-159, 2002.
- JOO, H. S., KUMAR, C. G., PARK, G. C., PAIK, S. R., CHANG, C. S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 267-272, 2003.
- KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2093-2099, 1982.
- MABROUK, S. S., HASHEM, A. M., EL-SHAYEB, N. M. A., ISMAIL, A. M. S., ABDEL-FATTAH, A. F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 155-159, 1999.
- MANE, R. R., BAPAT, M. A study of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM 2713. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 6, p. 578-583, 2001.
- NELSON, G., YOUNG, T. W. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 1461-1469, 1987.
- OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.
- PHADATARE, S. U., DESHPANDE, V. V., SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and

- compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 1, p. 72-76, 1993.
- PONCE-NOYOLA, T., TORRE, M. Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture, **Bioresource Technology**, v. 78, p. 285-291, 2001.
- ROMERO, F. J., GARCIA, L. A., SALAS, J. A., DÍAZ, M. QUIRÓS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.
- ROWLEY, B. I., BULL, T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879-899, 1977.
- SAEKI, K., IWATA, J., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification and characterization of an alkaline protease from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 554-556, 1994a.
- SAEKI, K., IWATA, J., YAMAZAKI, S., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 407-412, 1994b.
- SANDHU, D. K., WADHWA, V., BAGGA, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 21-25, 1989.
- TOMASCHOVÁ, J., BUCHINGER, W., HAMPEL, W., ZEMANOVIC, J. Purification and characterization of extracellular proteinase produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9172. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 499-503, 1998.
- TUNGA, R., SHRIVASTAVA, B., BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1553-1558, 2003.
- USUI, T., OGUCHI, M. Purification of a protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 535-537, 1986.
- VENTON, A. M., ASENJO, J. A. Two extracellular proteases from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n. 3, p. 171-176, 1990.

Capítulo 4 - Aplicação da protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 na lise da parede celular de levedura e no isolamento de polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Estudou-se a aplicação da protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 na lise da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e na obtenção de β -1,3-glucana e a manana-proteína. Nos processos convencionais para o isolamento do polissacarídeo β -glucana, são usadas condições de pH extremas que provocam sua degradação. Um método que combina tratamento físico e enzimático utilizando a protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* 191, permitiu o isolamento da β -glucana de *S. cerevisiae* com pureza de 87,4 % e rendimento de 33,7 %. Este processo de isolamento da glucana também gerou outro produto, a manana-proteína da parede celular, que apresentou atividade antioxidante.

Palavras-chave: lise celular, glucana, manana-proteína, parede celular de levedura, *Cellulosimicrobium cellulans*, protease alcalina

Introdução

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é organizada em duas camadas que são compostas por quatro macromoléculas principais: manana-proteína, β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina. Estes componentes estão unidos por ligações covalentes. A manana-proteína corresponde a aproximadamente 30% (LEE *et al.*, 2001) do peso seco da parede celular, e compõe a camada mais externa da parede, estando ligada covalentemente às cadeias de β -1,6-glucana. A β -1,6-glucana corresponde à cerca de 5 % do peso seco da parede, são moléculas relativamente pequenas com cerca de 140 resíduos de glicose. Mais da metade da parede celular (50-60 %) é formada por β -1,3-glucana

(SUPHANTARIKA *et al.*, 2003), que é composta predominantemente por moléculas lineares consistindo de cerca de 1500 resíduos de glicose, dos quais cerca de 40 a 50 resíduos estão envolvidos em ligações através do carbono C-6 com moléculas de β -1,6-glucana e quitina (KAPTEYN *et al.*, 1999).

A β -glucana é encontrada também na parede celular de fungos, em cereais como aveia, trigo, centeio, milho, entre outros (GENÇ *et al.*, 2001). Os estudos sobre a composição das β -glucanas tiveram grande avanço após a observação de problemas em filtros utilizados nos processos de produção de cerveja, onde observou-se o aparecimento de um material gelatinoso. Este material foi identificado como o polissacarídeo β -glucana (VIS & LORENZ, 1997).

As β -1,3-glucanas apresentam habilidade para estimular o sistema imunológico (LEE *et al.*, 2001). Devido a esta função biológica, este polissacarídeo pode exercer efeito benéfico contra uma série de doenças. A maior parte das β -glucanas exibiram atividade imunomodulatória quando administradas intravenosa ou intraperitonealmente, mas o problema que elas apresentam é sua insolubilidade. Por isso, alguns processos de derivação como a carboximetilação e a sulfoetilação, e alguns processos físicos como o tratamento com ultrassom, tem sido propostos com o objetivo de aumentar a solubilidade das glucanas (SANDULÁ *et al.*, 1999).

As glucanas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e do fungo *Aspergillus niger* tem sido muito estudadas. Os processos convencionais para a extração de glucana envolvem tratamentos com álcali e/ou ácido à quente. Estes processos causam a degradação de uma parte da cadeia polimérica resultando em baixo rendimento e na redução dos efeitos benéficos.

A remoção das proteínas da parede celular e de polissacarídeos álcali solúveis pelo tratamento com hidróxido de sódio ou potássio tem sido considerada eficiente, mas durante este tratamento, os lipídeos da parede celular são hidrolisados em glicerol e ácidos graxos devido à condição alcalina. Foram publicados alguns trabalhos baseados no tratamento da levedura ou da parede celular com NaOH ou KOH à quente, preferencialmente em concentrações de 0,75 a 1,0 M e temperaturas entre 60 e 100°C. Posteriormente, o resíduo é lavado

com água ou ácido para a remoção da parte solúvel e para a neutralização da mistura, e em seguida o resíduo é tratado com solventes orgânicos para a remoção dos lipídeos, mas o tratamento com álcali ou ácido à quente provoca a degradação da cadeia de glucana (FREIMUND *et al.*, 2003).

FREIMUND *et al.* (2003) apresentaram um método de isolamento da β -1,3-glucana de *Saccharomyces cerevisiae* que consistiu de um processo físico combinado com um tratamento enzimático. O tratamento físico foi uma extração à quente (125°C por 5 horas) em solução aquosa de pH neutro, seguido de um tratamento enzimático com a protease comercial Savinase. A pureza da glucana obtida foi de 92% e o rendimento foi 87%. Este processo de isolamento da glucana gerou um subproduto também benéfico à saúde, a manana-proteína, que é um composto que apresenta algumas atividades biológicas como a atividade antioxidante.

KRIZKOVÁ *et al.* (2001) estudaram a atividade antimutagênica e antioxidante das mananas extraídas da parede celular das leveduras *Candida utilis*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Eles constataram que a manana da parede celular destas leveduras apresenta importantes características como boa solubilidade e massa molecular relativamente pequena (15-30KDa). O efeito antimutagênico destes polímeros foi exercido através de diferentes modos de ação e eles apresentaram boa atividade antioxidante.

O presente trabalho teve o objetivo de estudar a aplicação da protease na lise da parede celular de levedura e isolar glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se a protease alcalina purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191, um microrganismo que secreta um complexo enzimático capaz de lisar a parede celular de leveduras. E também estudar o efeito da ação desta protease sobre a atividade antioxidante da manana-proteína extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Material e Métodos

Reagente e Material específico

Caseína bovina, ácido tricloroacético e clorofórmio (Merck Co). Solventes com pureza para as análises químicas. β -caroteno, ácido linoléico e glicose (Sigma). Parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente em Dyno-Mil e desidratada.

Protease alcalina de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 produzida em meio contendo 8% de células desidratadas de levedura; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em solução tampão fosfato 0,15M e pH 8,0 e purificada 16,8 vezes através da precipitação fracionada com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica com resinas DEAE-Sepharose e Q-Sepharose.

Determinação da atividade de protease

A atividade de protease no extrato enzimático purificado de *C. cellulans* 191 foi determinada utilizando-se caseína como substrato (OBATA *et al.*, 1977). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução de caseína 2 %, 1 mL de solução tampão fosfato 0,15 M (pH 8,0) e 0,5 mL de solução enzimática, foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 0,4M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi medida a 280 nm, utilizando como controle o meio de reação onde a solução enzimática foi substituída por água. Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade de enzima necessária para produzir aumento na absorbância do filtrado igual a 1,0 após 30 minutos de reação (ROWLEY & BULL, 1977).

Determinação da atividade de glucanase

A determinação da atividade de glucanase foi realizada segundo SAEKI *et al.* (1994) com pequenas modificações. A mistura de reação contendo 250 μL de

extrato enzimático e 250 µL de solução 1% de laminarina em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 foi incubada a 55 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada por aquecimento em banho de ebulição por 5 minutos. Em seguida determinou-se a quantidade de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.

Uma unidade de atividade foi considerada a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcares redutores por minutos de reação, nas condições descritas. Utilizou-se glicose como padrão de açúcar redutor.

Aplicação da protease purificada de C. cellulans 191 na lise celular de levedura

Para a determinação da atividade lítica da protease purificada utilizou-se as metodologias proposta por VENTOM & ASENJO (1991) e OBATA *et al.* (1977), com algumas modificações. A mistura contendo 2 mL de suspensão de células de cultura *Saccharomyces cerevisiae* de 16 horas com densidade ótica de 1,7 a 660nm; 1,5 mL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5) e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30 °C, com agitação em intervalos regulares, durante 1 hora. Simultaneamente, incubou-se como referência um controle onde no lugar da solução enzimática acrescentou-se tampão fosfato 0,1M (pH7,5). A atividade lítica foi calculada como descrito a seguir:

$$\text{Absorbância relativa} = \frac{\text{DO}_{\text{inicial da amostra}} - \text{DO}_{\text{final da amostra}}}{\text{DO}_{\text{inicial do controle}} - \text{DO}_{\text{final do controle}}}$$

Uma unidade de atividade lítica foi considerada aquela necessária para obter-se absorbância relativa de 0,1 nas condições do ensaio.

Determinou-se a atividade lítica da protease purificada contendo 0,14 U de protease/mL e, como controle positivo, uma preparação enzimática de β-1,3-glucanase de *C. cellulans* parcialmente purificada contendo atividade de 0,14 U/mL.

Aplicação da protease purificada de *C. cellulans* 191 na obtenção de polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae*

A Figura 4.1 ilustra o procedimento para a obtenção da glucana e manana-proteína da parede celular de *S. cerevisiae*.

Obtenção da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente

A suspensão de 2,0 Kg de levedura comercial em 8,0 L de água destilada, resfriada a 5°C, foi submetida a tratamento em Dyno Mill utilizando-se fluxo de 80,0 mL/min. a 2.500 rpm e pérolas de vidro de 0,02-0,05 mm de diâmetro. Após o tratamento, esta suspensão de massa celular lisada mecanicamente foi centrifugada a 12.300 x g por 15 minutos a 5°C, e o precipitado foi lavado com água destilada e liofilizado.

Extração de lipídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Os lipídeos da parede celular da levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mil foram removidos à temperatura ambiente utilizando-se uma mistura dos solventes hexano e metanol na proporção de 4:1 (v:v) durante 30 minutos (FREIMUND *et al.*, 2003).

Extração da glucana bruta à quente

A extração à quente foi realizada segundo ASSIS (1996) com algumas adaptações. A suspensão de 5 % (m/v) de parede celular desengordurada em tampão fosfato 50mM pH 7,0 foi tratada a 121°C por 2 horas em autoclave. Após o

Parede celular de levedura extraída mecanicamente

Extração de lipídeos com
hexano:metanol (4:1)

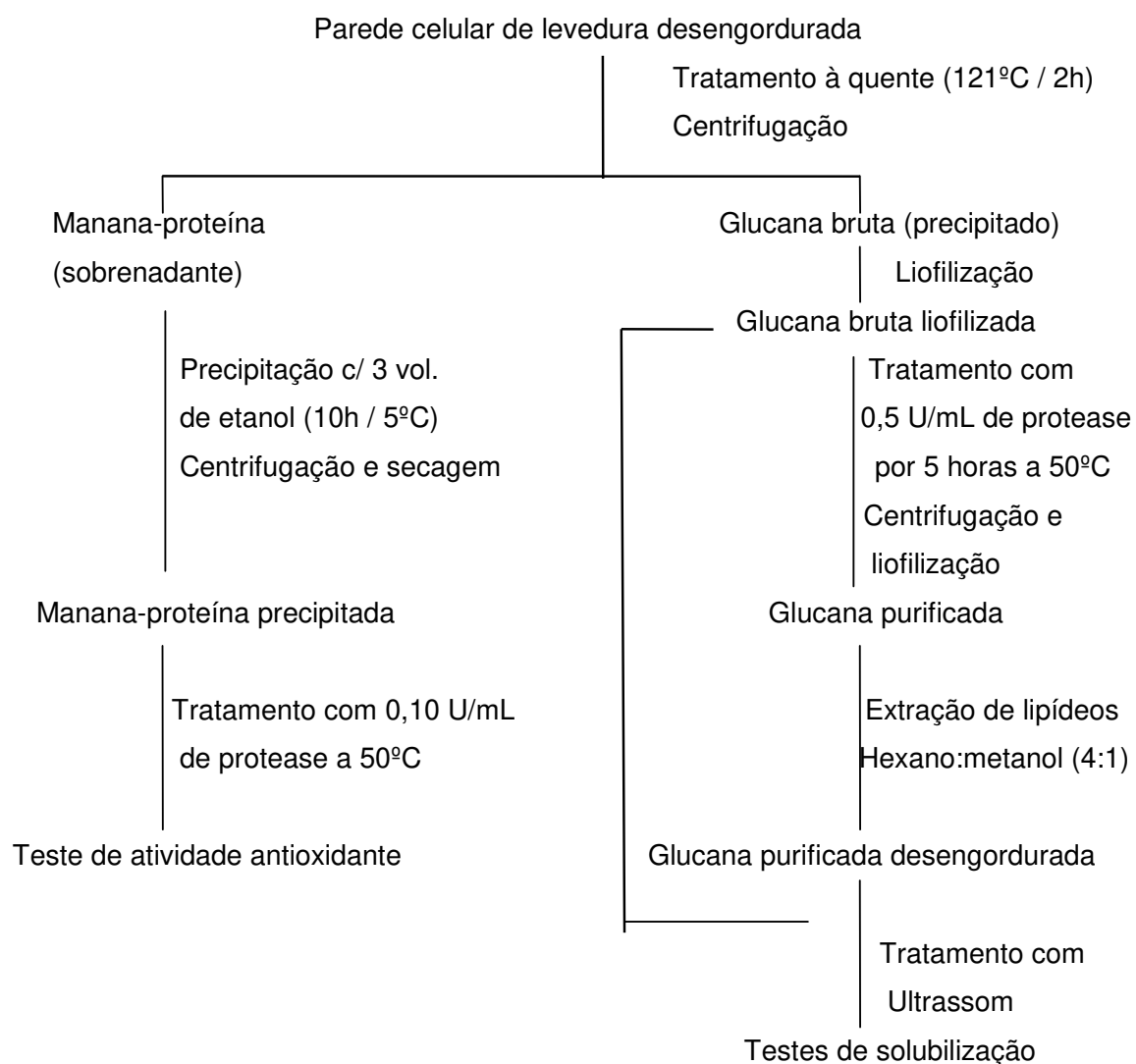


Figura 4.1 - Procedimento para o isolamento dos compostos da parede celular da levedura *S. cerevisiae* e testes

resfriamento, esta suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 5 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com a mesma solução tampão, liofilizado e foi utilizado como glucana bruta para o tratamento enzimático com a protease

alcalina. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado para a obtenção da manana-proteína da parede celular.

Precipitação da manana-proteína com etanol

O sobrenadante da centrifugação foi utilizado para a obtenção de manana-proteína. Adicionou-se três volumes de etanol ao sobrenadante para a precipitação da manana-proteínas. Após um pernoite a 5 °C, o precipitado foi separado por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos e o solvente foi evaporado. A manana-proteína foi utilizada como substrato para a protease alcalina de *C. cellulans* 191 no estudo da obtenção de compostos com atividade antioxidante.

Tratamento da glucana bruta liofilizada com a protease alcalina de C. cellulans 191

Para o tratamento da glucana bruta com a protease alcalina, uma suspensão de 5 % do liofilizado obtido após a extração à quente (glucana bruta liofilizada) em solução tampão fosfato 50 mM pH 8,0 e solução enzimática suficiente para que a atividade de protease fosse de 0,5 U/mL de mistura de reação foi incubada a 50 °C durante 5 horas, com agitação mecânica em intervalos regulares. A reação enzimática foi paralisada pelo aquecimento em banho de ebulição por 10 minutos. Os resíduos insolúveis foram separados por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos e lavados duas vezes com água destilada. Para as análises propostas, o sedimento foi desengordurado, segundo a metodologia descrita anteriormente e submetido a tratamento com ultrassom como descrito a seguir.

Hidratação e tratamento das glucanas bruta e purificada com ultrassom

O tratamento com ultrassom foi realizado segundo MISLOVICOVÁ *et al.* (2000), com algumas modificações. Para o tratamento da glucana bruta (não

tratada com a protease) e da glucana purificada (após tratamento com a protease, Figura 4.1), utilizou-se 100 mg de glucana em 25 mL de água, o pH da mistura foi ajustado para 7,0 e submeteu-se a mistura ao tratamento com ultrassom (Unique, mod. USC2850, 120 W, 25 KHz) durante os intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Estudou-se também a solubilização com ultrassom das glucanas previamente hidratadas. Para isso, as glucanas bruta e purificada foram submetidas previamente a um tratamento de hidratação em solução alcalina de NaOH 1 M por 24 horas. Foram utilizadas as massas 50, 100 e 200 mg de glucana em 25 mL de meio de hidratação. Após a hidratação, as amostras foram neutralizadas com HCl concentrado e a suspensão de glucana foi tratada em equipamento de ultrassom durante intervalos de tempo de 10, 20 e 30 minutos. A temperatura foi conservada em 25°C.

Após os tratamentos, a glucana insolúvel foi separada por centrifugação a 10.000 x g durante 15 minutos e determinaram-se os carboidratos totais solúveis no sobrenadante pelo método descrito por DUBOIS *et al.* (1956).

Tratamento da manana-proteína com a protease alcalina de C. cellulans 191

O meio de reação contendo 0,5 % (m/v) de manana-proteína liofilizada em tampão fosfato 50 mM pH 8,0 e protease alcalina com atividade de 0,1 U/mL de meio de reação foi incubado a 50°C. Em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos, foram retiradas alíquotas para determinação da atividade antioxidante.

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico, de acordo com HAMMERSCHMIDT & PRATT (1978) com algumas modificações. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 60 mg de ácido linoléico (Sigma Co.), 200 mg de Tween 80 e 5 mg de β -caroteno (Sigma Co.), que foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio.

Posteriormente, o clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório a 40 °C. O resíduo da evaporação foi dissolvido em 50 mL de água deionizada e oxigenada sob agitação vigorosa. Alíquotas de 0,5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL da amostra. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm no tempo inicial e em intervalos de 60 minutos. A reação de oxidação foi conduzida a 40 °C. Foram utilizados controles que continham água ao invés da amostra. A taxa de branqueamento do β -caroteno foi determinada pela diferença entre a absorbância inicial e a absorbância final, a 470 nm, dividido pelo tempo de incubação (horas). O índice de antioxidação foi calculado pela razão entre a taxa de branqueamento do controle e a taxa de branqueamento da amostra, conforme sugerido por PRATT & BIRAC (1979).

Métodos analíticos

Determinação de carboidratos totais

Os polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae* foram submetidos à hidrólise ácida de acordo com a metodologia descrita DALLIES *et al.* (1998) com algumas adaptações. As amostras de 1 mg de glucana em duplicata foram tratada com 75 μ L de ácido sulfúrico 72 % (p/p) e deixada à temperatura ambiente por 3 horas. Após este intervalo de tempo, acrescentou-se água destilada e deionizada até o volume final de 1 mL, desta forma a concentração final de ácido sulfúrico foi de 2 N. Seguiu-se o tratamento térmico em ebulição por 4 horas. Após o resfriamento e a conservação em banho de gelo, o hidrolisado foi diluído com 9 mL de água destilada e deionizada. Os íons sulfato foram precipitados pela adição de solução saturada de hidróxido de bário até que o pH da solução atingisse a neutralidade. O volume foi ajustado para 25 mL e o sulfato de bário foi removido por centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado como solução de monossacarídeos para as análises de quantificação. A quantificação de carboidratos totais foi realizada na solução obtida após a hidrólise com ácido sulfúrico utilizando-se a metodologia proposta por DUBOIS *et al.* (1956).

Determinação do conteúdo de proteína

O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com a metodologia de Lowry como descrita por PETERSON (1977).

Resultados e discussão

Aplicação da protease purificada de C. cellulans 191 na lise da parede celular de S. cerevisiae

A protease purificada *Cellulosimicrobium cellulans* 191 contendo 0,14 U de protease/mL foi capaz de lisar células viáveis de *S. cerevisiae* apresentando atividade lítica de 21,5 U.

Utilizando-se como controle positivo, uma preparação enzimática de β -1,3-glucanase com atividade de 0,14 U de glucanase/mL, obteve-se atividade lítica de 42,4 U.

OBATA *et al.* (1977) verificaram que a protease purificada de *Oerskovia* sp CK, um microrganismo lítico, foi capaz de lisar células viáveis de levedura. FUNATSU *et al.* (1978) estudaram a protease purificada de *Arthrobacter luteus*, e verificaram que esta protease purificada também foi capaz de lisar células de levedura. A protease purificada do microrganismo lítico *Rhizoctonia solani*, estudada por USUI & OGUCHI (1986), não foi capaz de lisar células de levedura.

Aplicação da protease purificada de C. cellulans 191 na obtenção de polissacarídeos da parede celular de S. cerevisiae

Extração de lipídeos da parede celular de levedura

Antes do tratamento à quente, foram removidos os lipídeos da parede celular conforme descrito anteriormente. Esta remoção com solvente orgânico à temperatura ambiente, foi capaz de extrair lipídeos que corresponderam a cerca de 5,3 % da massa inicial da parede celular.

Tratamento à quente para obtenção da glucana bruta

FREIMUND *et al.* (2003) propôs o tratamento à quente (125 °C) por 5 horas em solução aquosa com pH neutralizado pela adição de NaOH para a extração da manana-proteína e ASSIS (1996) propôs um tratamento a 121 °C em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,0 durante 30 minutos, com a mesma finalidade. No presente trabalho, os dois procedimentos citados foram testados. O tratamento em solução aquosa provocou degradação maior dos componentes da parede que o tratamento em solução tampão. O tempo de tratamento de 5 horas foi considerado excessivo.

Este tratamento também teve o objetivo de extrair componentes solubilizáveis da parede celular, principalmente a manana-proteína. Os melhores resultados foram observados quando o tratamento foi realizado em solução tampão fosfato 50 mM pH 7,0 por 2 horas.

A Tabela 4.1 mostra que este tratamento separou a maior parte da proteína da parede celular. Inicialmente, a parede apresentava 23,2 % de proteína e após este tratamento apresentou 9,4 %.

O rendimento de carboidratos totais deste processo foi de 51 %, ou seja, permaneceram insolúveis cerca de 51 % dos carboidratos totais existentes na parede celular antes do tratamento, o restante dos carboidratos foi solubilizado juntamente com a proteína por se tratar do polissacarídeo manana, ou foi degradado pelo tratamento. A glucana bruta obtida após o tratamento à quente apresentou 60,6 % de carboidratos totais.

O tratamento proposto por FREIMUND *et al.* (2003), no qual a extração à quente ocorreu a 125 °C durante 5 horas, apresentou rendimento de 64 % e a glucana insolúvel obtida por este tratamento apresentou 63 % de carboidratos totais.

Tratamento da glucana bruta liofilizada com a protease alcalina de C. cellulans 191

Para a remoção do restante da proteína, que não foi extraída pelo tratamento à quente, fez-se o tratamento enzimático da glucana bruta com a protease alcalina purificada de *C. cellulans* 191. A degradação excessiva da glucana que é observada nos processos convencionais com tratamento alcalinos ou ácidos pode ser evitada pela introdução deste tratamento enzimático para a remoção da maior parte da proteína da parede.

A glucana bruta obtida após o tratamento à quente foi tratada com a protease alcalina a 50 °C em pH 8,0 durante 5 horas. Após este tratamento, o resíduo insolúvel foi separado por centrifugação.

A análise deste precipitado mostrou que a ação enzimática promoveu a remoção de proteína e também de carboidratos. A glucana purificada após o tratamento enzimático apresentou 7,0 % de proteína e 66,7 % de carboidratos totais. O rendimento de glucana purificada após o tratamento enzimático foi de 38,2 % (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Rendimento e composição da glucana da parede celular de *S. cerevisiae* durante o processo de isolamento

Fração	Massa total (g)	Carboidrato total		Proteína		Rend. de glucana (%)
		(g)	(%)	(g)	(%)	
parede celular desengordurada	100,0	47,9	47,9	23,2	23,2	100,0
glucana bruta após tratamento à quente	40,3	24,4	60,6	3,6	9,4	51,0
glucana purificada após tratamento enzimático	27,4	18,3	66,7	1,9	7,0	38,2
glucana purificada desengordurada	18,5	16,1	87,4	1,7	9,2	33,7

O tratamento enzimático da glucana com a protease comercial Savinase, estudado por FREIMUND *et al.* (2003), apresentou rendimento de 35 % e a glucana obtida deste tratamento apresentou pureza de 69 %.

A glucana insolúvel obtida após o tratamento enzimático foi desengordurada como descrito anteriormente e utilizada para o estudo da solubilização pelo tratamento com ultrassom.

Tratamento das glucanas bruta e purificada de S. cerevisiae com ultrassom

O tratamento físico da glucana com ultrassom teve como objetivo sua solubilização, o que foi avaliado pela determinação de carboidratos totais solúveis antes e depois da exposição ao ultrassom. O estudo foi realizado com a glucana bruta (antes do tratamento com a protease alcalina) e glucana purificada (após o tratamento com a protease alcalina).

Tabela 4.2 - Porcentagem de carboidratos totais solubilizados pelo tratamento em ultrassom de amostras de glucana da parede celular de *S. cerevisiae* bruta e purificada

Tempo de tratamento com ultrassom (minutos)	Glucana bruta	Glucana purificada
	% de carboidratos totais solubilizados	
0	0,0	0,0
15	0,0	0,2
30	0,4	0,2
60	2,1	0,2
120	3,3	0,3

A Tabela 4.2 apresenta a solubilização pelo tratamento com ultrassom das glucanas bruta e purificada. Observou-se nestes resultados, a baixa solubilidade da glucana apesar do tratamento com ultrassom. Este tratamento foi capaz de solubilizar cerca de dez vezes mais carboidratos da glucana bruta em relação à glucana purificada. Provavelmente esta diferença se deva à remoção de carboidratos observada durante o tratamento enzimático com a protease alcalina.

Para o aumento da solubilidade da glucana, fez-se a sua hidratação prévia com solução de NaOH 1 M durante 24 horas, para isso massas de 50, 100 e 200 mg de glucana bruta e purificada foram hidratadas previamente e submetidas ao tratamento com ultrassom.

A hidratação em solução 1,0 M de NaOH antes do tratamento com ultrassom permitiu melhor solubilização da glucana de levedura (Tabela 4.3) em comparação com a glucana não hidratada apresentada na Tabela 4.2.

Observou-se que o tratamento da glucana bruta e glucana purificada com NaOH 1 M permitiu a solubilização de polissacarídeos, sem o tratamento com ultrassom.

O tratamento com ultrassom após a hidratação foi capaz de aumentar a solubilização da glucana bruta de 9,9 para 14,7 %, quando o tempo de tratamento foi de 30 minutos e a concentração inicial de glucana foi 200mg/25 mL. O mesmo tratamento para a glucana purificada foi capaz de aumentar a solubilização de 9,7 para 12,4 %.

Tabela 4.3 - Porcentagem de carboidratos totais solubilizados pelo tratamento em ultrassom de amostras de glucana da parede celular de *S. cerevisiae* antes e depois do tratamento enzimático, previamente hidratadas

Amostra (mg/25 mL)	Glucana bruta				Glucana purificada			
Tempo de ultrassom (min.)	0	10	20	30	0	10	20	30
50	11,6	11,8	-	11,3	10,3	10,6	14,2	14,7
100	12,1	12,2	12,5	14,6	10,1	11,0	12,1	12,3
200	9,9	12,0	12,9	14,7	9,7	10,7	10,5	12,4

De uma forma geral, quanto maior foi o tempo de tratamento com ultrassom, maior foi a solubilização de carboidratos. MISLOVICOVÁ *et al.* (2000) também obteve este resultado quando estudou a solubilização do complexo

glucana-quitina da parede celular de *Aspergillus niger* através do tratamento com ultrassom.

As concentrações de 100 e 200mg/25mL apresentaram porcentagem de carboidratos solubilizados após o tratamento em ultrassom maior que a concentração de 50mg/25mL para a glucana bruta. Mas, o contrário foi observado para a glucana purificada.

A solubilização da glucana bruta foi maior em quase todos os tratamentos quando comparada à glucana purificada. Isso provavelmente se deva ao fato do tratamento enzimático com a protease alcalina ter solubilizado uma parte dos carboidratos da glucana bruta.

MISLOVICOVÁ *et al.* (2000) publicaram que o tratamento da glucana-quitina de *Aspergillus niger* com ultrassom durante 20 minutos aumentou a solubilização de carboidratos de 7,6 para 12,2 % quando a concentração inicial foi de 50mg/25mL. Para a glucana de levedura (Tabela 4.3) observou-se o aumento na solubilidade de 10,3 para 14,2 % quando a glucana purificada foi submetida a um tratamento idêntico.

Tratamento da manana-proteína com a protease alcalina purificada de C. cellulans 191 e estudo da atividade antioxidante

O índice de antioxição da manana-proteína obtida após o tratamento à quente foi 1,3. Após 30 minutos de reação com a protease alcalina, o índice de antioxição foi aumentado para 2,4; como mostra a Figura 4.2.

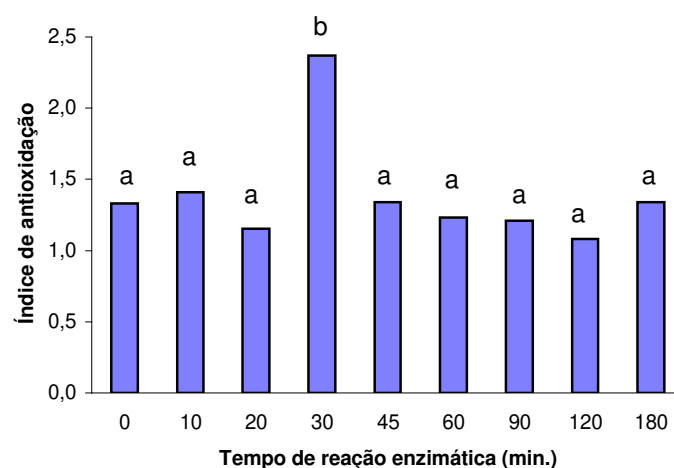


Figura 4.2 - Índice de antioxição da manana-proteína tratada com a protease alcalina de *C. cellulans* 191 (Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ - Teste de Tukey)

O tratamento da manana-proteína com a protease alcalina durante 10 e 20 minutos não promoveu alteração significativa na atividade antioxidante em comparação com a manana-proteína não tratada enzimaticamente. Observou-se apenas um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) após o tratamento durante 30 minutos.

Em períodos de incubação superiores (45-180 min.) não foi observado aumento na atividade antioxidante do hidrolisado de manana-proteína obtido pelo tratamento com a protease alcalina.

Conclusões

A protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi capaz de lisar células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

O polissacarídeo glucana da parede celular de *S. cerevisiae* foi isolado através de um procedimento que combina tratamento físico e enzimático com a protease alcalina purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Esse processo apresentou 33,7% de rendimento de glucana, com pureza de 87,4%. O tratamento das glucanas bruta e purificada com NaOH 1,0M aumentou a solubilidade das mesmas. Porém, o tratamento com ultrassom não aumentou significativamente a solubilização dos polissacarídeos.

A protease alcalina de *C. cellulans* 191 foi capaz de aumentar a atividade antioxidante da manana-proteína purificada da parede celular de *S. cerevisiae* após 30 minutos de reação, utilizando-se 0,5 % (m/v) de manana-proteína e 0,1U de protease/mL de meio de reação. Este aumento na atividade antioxidante foi significativo ao nível de $p < 0,05$.

Referências Bibliográficas

- ASSIS, E. M. Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise. Campinas, 1996. 115 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DALLIES, N. FRANÇOIS, J., PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1297-1306, 1998.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FREIMUND, S., SAUTER, M., KAPPELI, O., DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003.
- FUNATSU, M., HONGROCK, O., AIZONO, Y., SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1975-1977, 1978.
- GENÇ, H., OZDEMIR, M., DEMIRBAS, A. Analysis of mixed-linked (1-3), (1-4)- β -D-glucans in cereal grains from turkey. **Food Chemistry**, v. 73, p. 221-224, 2001.
- HAMMERSCHMIDT, P. A., PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 2, p. 556-559, 1978.
- KAPTEYN, J. C., ENDE, H. V. D., KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 373-383, 1999.
- KRIZKOVÁ, L., DURACKOVÁ, Z., SANDULA, J., SASINKOVÁ, V., KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, n. 1-2, p. 213-222, 2001.
- LEE, J. N., LEE, D. Y., JI, I. H., KIM, G. E., KIM, H. N., SOHN, J., KIM, S., KIM, C. W. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 837-841, 2001.
- MISLOVICOVÁ, D., MASÁROVÁ, J., BENDZÁLOVÁ, K., SOLTÉS, L., MACHOVÁ, E. Sonication of chitin-glucan, preparation of water-soluble fractions and characterization by HPLC. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 7, p. 63-68, 2000.

- OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.
- PETERSON, G. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.
- PRATT, D. E., BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 6, p. 1720-1722, 1979.
- ROWLEY, B. I., BULL, T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879-899, 1977.
- SAEKI, K., IWATA, J., YAMAZAKI, S., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 407-412, 1994.
- SANDULÁ, J., KOGAN, G., KACURAKOVÁ, M., MACHOVÁ, E. Microbial (1-3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 247-253, 1999.
- SUPHANTHARIKA, M., KHUNRAE, P., THANARDKIT, P., VERDUYN, C. Preparation of brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 55-60, 2003.
- USUI, T., OGUCHI, M. Purification of a protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 535-537, 1986.
- VENTOM, A. M., ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.
- VIS, R. B., LORENZ, K. β -glucans: importance in brewing and methods of analysis. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 30, p. 331-336, 1997.

CONCLUSÕES FINAIS

1. A máxima produção de protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em meio de cultura composto por 8,0 % de células de levedura desidratadas; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e em solução tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0 ocorreu após 24 horas de fermentação a 27 °C e agitação de 150 rpm.
2. A otimização do meio de cultura proporcionou aumento de cerca de 36 vezes na atividade de protease em relação a atividade no meio de cultura inicial. A otimização das condições de fermentação resultou em aumento na produção de protease de cerca de 20% em relação as condições de fermentação iniciais.
3. A protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi purificada 16,8 vezes através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em colunas de troca iônica DEAE-Sepharose e Q-Sepharose com rendimento de 7,8%. A enzima apresentou massa molecular estimada em 55 kDa por cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200.
4. A protease purificada apresentou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,027 mg/mL e 6,25 U/mg, respectivamente para o substrato caseína. A enzima foi ativada na presença de FeCl_3 e azida sódica. Os compostos HgCl_2 e iodoacetamida inibiram fracamente a atividade enzimática. O composto fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) foi o que apresentou maior efeito inibitório; 16,6%.
5. A atividade ótima da protease foi observada em temperaturas entre 50-64 °C, e em pH entre 7,0-8,0. A enzima mostrou estabilidade após incubação a 83,0 °C por até 4 horas, na faixa de pH de 6,0-8,0 na presença de DTT (10 µg/mL). A protease também se mostrou estável nessas condições na presença de cisteína 5 mM.
6. A protease purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi capaz de lisar células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

7. O processo de isolamento da glucana da parede celular de *S. cerevisiae* utilizando-se a protease purificada apresentou 33,7% de rendimento de glucana com pureza de 87,4%.
8. A protease alcalina de *C. cellulans* 191 foi capaz de aumentar a atividade antioxidante da manana-proteína purificada da parede celular de *S. cerevisiae* após 30 minutos de reação, utilizando-se 0,5 % (m/v) de manana-proteína e 0,1U de protease/mL de meio de reação.

Sugestão para Trabalhos Futuros

1. Otimizar a metodologia de isolamento da glucana da parede celular de *S. cerevisiae* proposta neste trabalho e avaliar outros métodos físicos e/ou químicos que promovam o aumento da solubilidade da glucana.
2. Avaliar a capacidade da glucana extraída da parede celular se ligar a compostos lipídicos.
3. Estudar a possibilidade de utilização da manana-proteína isolada da parede celular de *S. cerevisiae*, que apresentou alta atividade antioxidante quando tratada com a protease, como aditivo em alimentos que requerem a utilização de espessantes e antioxidantes. Assim como sua análise toxicológica e sensorial.
4. Hidrolisar a proteína da parede celular de leveduras utilizando a protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191, isolar e estudar os peptídeos obtidos quanto a atividades biológicas como atividade antioxidante e antiinflamatória.
5. Avaliar a capacidade da protease alcalina purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 lisar células de outras leveduras além de *S. cerevisiae* e isolar polissacarídeos da parede celular dessas leveduras.