



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

CAIO EDUARDO SORIA ROQUE

PRÉ-PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES OBTIDAS
ATRAVÉS DE *Bacillus subtilis* CBMAI - 1302

CAMPINAS

2020

CAIO EDUARDO SORIA ROQUE

PRÉ-PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES OBTIDAS ATRAVÉS DE
Bacillus subtilis CBMAI - 1302

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Supervisor/Orientador: Professor Doutor Elias Basile Tambourgi

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO CAIO
EDUARDO SORIA ROQUE, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

R685p Roque, Caio Eduardo Soria, 1994-
Pré-purificação e caracterização de proteases obtidas através de *Bacillus subtilis* CBMAI - 1302 / Caio Eduardo Soria Roque. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Protease. 2. Biossíntese. 3. Bacillus subtilis. 4. Precipitação. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Prepurification and characterization of proteases obtained by *Bacillus subtilis* CBMAI -1302

Palavras-chave em inglês:

Protease

Biosynthesis

Bacillus subtilis

Precipitation

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Arislete Dantas de Aquino

Priscila Gava Mazzola

Data de defesa: 03-06-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6379-2875>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1366951809947143>

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Caio Eduardo Soria Roque, em 03 de junho de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Elias Balise Tambourgi - Presidente e Orientador
FEQ / UNICAMP

Prof^ª. Dra. Arislete Dantas de Aquino
DEQ / UFPR
Videoconferência

Prof^ª. Dra. Priscila Gava Mazzola
FCF / UNICAMP
Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Aquilo que se faz por amor está
sempre além do bem e do mal.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter tornado a realização desse sonho possível e por ter me dado força para superar os diversos obstáculos. Aos meus pais, Benedito e Marli, pelo amor, cuidado e por sempre me apoiarem e ajudarem, da forma que podiam, para que eu conseguisse finalizar esse projeto. E à minha querida irmã, Fernanda, por todo o carinho e pelas horas de descontração.

Ao professor Dr. Elias Basile Tambourgi não só pela oportunidade de trabalhar com ele, mas também por ter me acolhido em um momento de dificuldade. Sempre me lembrarei do senhor.

Ao professor Antônio Carlos Luz Lisboa, por seus ensinamentos e pelas agradáveis conversas que tivemos. A professora Telma Teixeira Franco por todas as dicas e pelos ensinamentos que compartilhou.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em especial, agrago à Fabiane Suassuna, a Aline Pinelli, a Maria Tereza Casamassa e ao Fabrício dos Santos.

Aos amigos de laboratório Jorge, Diego, Gabrielle, Nathiele, Ana Carolina, Wilson Murilo e a Natália por toda ajuda que deram e pela agradável convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, mas não foram mencionados o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (processo n.º 88887.338715/2019-00).

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo n.º 130027/2019-7).

RESUMO

As proteases são enzimas responsáveis por catalisar a quebra de ligações peptídicas, muito utilizadas no processamento de diversos produtos industriais, devido à sua biodegradabilidade. Elas são produzidas, em sua grande maioria, por processos fermentativos, sendo as bactérias do gênero *Bacillus* bastante exploradas. A elevada demanda dessas enzimas, associada com os altos custos por trás da etapa de “*downstream*”, tornam necessária a investigação de novos organismos, assim como melhores condições de produção e técnicas de purificação menos dispendiosas. Nesse contexto, a precipitação, que é uma técnica simples, barata e rápida, mostra-se como uma boa alternativa. Este trabalho visa, portanto, avaliar a aplicação da precipitação como técnica de purificação para proteases obtidas a partir de microrganismos, além de caracterizá-las bioquimicamente. As enzimas foram obtidas através de uma linhagem de bactérias do gênero *Bacillus subtilis*. Para a precipitação foram utilizados três solventes orgânicos diferentes e um sal. A caracterização estudou o pH e temperatura ideais, a influência de alguns íons metálicos, inibidores e os parâmetros cinéticos. A produção obtida foi de 20,2 U/mL. O melhor resultado na precipitação foi obtido com a utilização de sulfato de amônio, obtendo-se uma recuperação de 58% da atividade proteolítica. Contudo, a técnica não foi muito eficiente em purificar, mas sim em concentrar as biomoléculas. Foi observado a existência de uma relação entre a concentração inicial de enzimas e a recuperação obtida. A caracterização mostrou que as proteases possuem pH e temperatura ideais em torno de 11,0 e 45 °C, respectivamente, além de serem fortemente inibidas pelo EDTA e por metais como mercúrio, cobre e níquel. A alta estabilidade, a baixas temperaturas, evidenciou a grande aplicabilidade da enzima para a indústria de detergentes.

Palavras-Chave: Protease alcalinas, Biossíntese, Precipitação, *Bacillus subtilis*, Sulfato de Amônio, Estabilidade, Recuperação, Concentração, Temperatura, Peltier, Inibidores.

ABSTRACT

Proteases are enzymes responsible for catalyzing the rupture of peptide bonds, widely used in the processing of many industrial products, due to their biodegradability. They are produced mostly by fermentative processes, with bacteria from the *Bacillus* genus being extensively explored. The high demand for these enzymes, associated with the high costs behind the downstream stage, makes it necessary to investigate new organisms, as well as better production conditions and low-cost purification techniques. In this context, precipitation, which is a simple, cheap and fast technique, proves to be a good alternative. Therefore, this project aims to evaluate the application of precipitation as a purification technique for proteases obtained from microorganisms, besides of characterize them biochemically. The enzymes were obtained by a *Bacillus subtilis* strain. In the precipitation, three different organic solvents and one salt were used. The characterization studied the ideal pH and temperature, the influence of some metal ions, inhibitors and also the kinetic parameters. The production obtained was 20.2 U/mL. The best results in precipitation was obtained using ammonium sulfate, providing a recovery of 58% of proteolytic activity. However, the technique was not very efficient in purifying, but in concentrating the biomolecules. A relationship between the initial enzyme concentration and the enzyme recovery was also identified. The characterization showed that the obtained protease has an ideal pH and temperature of 11.0 and 45 °C, respectively. It also was strong inhibited by EDTA and by the metals mercury, copper and nickel. Moreover, the high stability at low temperatures obtained showed great applicability of the enzyme for the detergent industry.

Keywords: Alkaline protease, Biosynthesis, Precipitation, *Bacillus subtilis*, ammonium sulphate, Stability, Recovery, Concentration, Temperature, Peltier, Inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Grupos de protease identificados.	19
Figura 2	– Equipamento utilizado na fermentação.	39
Figura 3	– Variação da temperatura no interior da caixa ao longo das 72 horas.	48
Figura 4	– Recuperação em função da concentração inicial de enzimas.	54
Figura 5	– Influência do pH no extrato bruto (A) e no extrato pré-purificado (B).	56
Figura 6	– Estabilidade da enzima pré-purificada em relação à variação de pH.	57
Figura 7	– Influência da temperatura no extrato bruto (A) e no extrato pré-purificado (B).	58
Figura 8	– Estabilidade da enzima pré-purificada em relação à variação de temperatura.	59
Figura 9	– Efeito dos íons metálicos na enzima pré-purificada.	60
Figura 10	– Gráfico de Lineweaver-Burk para a enzima estudada.	62
Figura 11	– Curva de calibração para proteínas totais.	78
Figura 12	– Cadastro de acesso ao patrimônio genético no SISGEN.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Principais propriedades dos grupos de protease.	19
Tabela 2	–	Principais fontes de carbono e nitrogênio.	25
Tabela 3	–	Principais métodos de precipitação disponíveis.	29
Tabela 4	–	Material utilizado para o cultivo das bactérias e biossíntese.	36
Tabela 5	–	Material utilizado para os estudos de precipitação.	36
Tabela 6	–	Material utilizado para a caracterização da enzima.	37
Tabela 7	–	Equipamentos utilizados para o cultivo das bactérias e biossíntese.	38
Tabela 8	–	Equipamentos utilizados para os estudos de precipitação.	38
Tabela 9	–	Equipamentos utilizados para a caracterização da enzima.	38
Tabela 10	–	Precipitação fracionada com acetona.	51
Tabela 11	–	Precipitação fracionada com metanol.	51
Tabela 12	–	Precipitação fracionada com etanol.	51
Tabela 13	–	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.	52
Tabela 14	–	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.	53
Tabela 15	–	Efeito do inibidor e dos surfactantes na atividade da enzima pré-purificada.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AIDS	Do inglês “ <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> ”
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCCR	“ <i>Business Communications Company Research</i> ”
BSA	Do inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.
d.C.	Depois de Cristo
DESQ	Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos
EDTA	Do inglês “ <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FEQ	Faculdade de Engenharia Química
LCD	Do inglês “ <i>Liquid Crystal Display</i> ”
LPSII	Laboratório de Processos de Separação II
PA	Do inglês “ <i>pro analyze</i> ”
SD	Do inglês “ <i>Secure Digital</i> ”
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SmF	Do inglês “ <i>Submerged Fermentation</i> ”
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidades de enzima
UV-VIS	Ultravioleta-visível
[S]	Concentração de substrato enzimático

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 PROTEASES	18
2.1.1 Aspectos gerais	18
2.1.2 Mecanismo de ação	21
2.1.3 Hidrólise Enzimática	22
2.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES	23
2.2.1 Biossíntese das proteases	23
2.2.2 Purificação das enzimas	25
2.2.3 Precipitação	27
2.3 CARACTERIZAÇÃO	30
2.3.1 Influência de diversos fatores na atividade da enzima	30
2.3.1.1 pH	31
2.3.1.2 Temperatura	32
2.3.1.3 Agentes inibidores	32
2.3.1.4 Íons metálicos	33
2.3.1.5 Parâmetros cinéticos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	35
3.1.1 Cepa de bactérias <i>Bacillus subtilis</i>	35
3.1.2 Material utilizado	35
3.1.3 Equipamento utilizado	37
3.2 MÉTODOS	39
3.2.1 Cultivo dos microrganismos	39

3.2.2	Inóculo	40
3.2.3	Fermentação e preparo do extrato enzimático	40
3.2.4	Atividade enzimática	41
3.2.5	Proteínas totais	41
3.2.6	Ensaio de precipitação	41
3.2.6.1	Efeito da concentração inicial de enzimas	42
3.2.7	Caracterização bioquímica	43
3.2.7.1	Efeito do pH na atividade proteolítica	43
3.2.7.2	Efeito da temperatura na atividade proteolítica	44
3.2.7.3	Efeito de íons metálicos	44
3.2.7.4	Efeito de inibidores e surfactantes	44
3.2.7.5	Parâmetros cinéticos	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1	BIOSSÍNTESE DA ENZIMA	46
4.1.1	Controle da temperatura	47
4.2	PRECIPITAÇÃO DA ENZIMA	50
4.2.1	Influência da concentração inicial da enzima	53
4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	55
4.3.1	Efeito do pH na atividade enzimática	55
4.3.2	Efeito da temperatura na atividade enzimática	57
4.3.3	Efeito de íons metálicos na atividade enzimática	59
4.3.4	Efeito dos surfactantes e do inibidor na atividade enzimática	61
4.3.5	Parâmetros cinéticos	62
5.	CONCLUSÕES	64
6.	TRABALHOS FUTUROS	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

APÊNDICES-----78

ANEXOS -----79

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As enzimas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade, há registros da produção de coalho pelos egípcios por volta de 6000 a.C., num processo em que utilizavam tecidos do estômago de ruminantes, ricos em proteases ácidas. Da mesma forma, o látex da figueira, que é rico na enzima ficina, também foi utilizado para a produção de queijos na antiguidade. Há ainda registros de usos medicinais do látex da figueira e do próprio fruto da árvore, pelos assírios, egípcios, sumérios e pelos habitantes de Pompeia, cidade italiana destruída em 79 d.C., os usos iam desde a remoção de excrecências da pele, até dores no estômago e má digestão, ou ainda como laxativo (Leonel e Sampaio, 2011; Fernandes, 2013).

Contudo, a presença de catalisadores biológicos só foi oficialmente reconhecida e começou a ser estudada durante o século XVIII. Sendo que, a exploração comercial propriamente dita das enzimas se iniciou durante a primeira guerra mundial, quando, devido a difícil situação em que o mundo se encontrava, o desenvolvimento de processos de bioconversão visando a obtenção, em larga escala, de vários produtos biotecnológicos como ácidos orgânicos, vacinas, vitaminas e enzimas foi iniciado. (Nelson e Cox, 2014; Bhunia *et al.*, 2012).

Porém, alguns setores ofereceram resistência ao uso de enzimas em seus produtos, graças à desconfiança gerada após incidentes que ocorreram em fábricas inglesas de detergentes em 1969, em que o uso de enzimas, na forma de pó, em detergentes foi relacionado ao desenvolvimento de asma nos trabalhadores expostos ao produto, assim como alergias desenvolvidas pelas pessoas que utilizaram os detergentes. O problema foi resolvido posteriormente em 1971, quando pesquisadores americanos, através da encapsulação das enzimas, refutaram qualquer risco de reação alérgica ligado às enzimas (Flindt, 1969; McAuliffe, 2012; Bernstein, 1972).

Atualmente, a aplicação de enzimas tem se disseminado nas mais diversas áreas, devido às vantagens que elas trazem quando comparadas à síntese via processos químicos, como por exemplo sua biodegradabilidade, característica muito apreciada nos dias de hoje, em

que busca-se cada vez mais processos limpos e ecologicamente amigáveis. Esse fato, aliado ao crescente aumento populacional vivenciado nas últimas décadas, tem impulsionado o mercado e aumentado a demanda por essas biomoléculas (Dewan, 2018; Ward *et al.*, 2009).

De acordo com dados divulgados em relatório técnico pela “*Business Communications Company Research*”, o mercado global de enzimas movimentou, em 2018, 5,5 bilhões de dólares e a expectativa é que esse número suba para 7 bilhões até 2023. Todavia, o mercado brasileiro ainda é pequeno, pois a maior parte das enzimas aqui consumidas ainda é importada (Monteiro e Silva, 2009).

Porém, segundo informações divulgadas em relatório técnico pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) do Governo Federal, o cenário é promissor, já que, devido ao advento da química verde, há programas de incentivo que fomentam a produção nacional de produtos biotecnológicos, uma vez que o Brasil tem grande potencial para a produção de produtos biosustentáveis.

Entre os grupos de enzimas conhecidos, um dos maiores é o das proteases. Ele é responsável por aproximadamente 60% das enzimas comercializadas mundialmente, sendo o subgrupo das serina proteases alcalinas, o que apresenta a maior porcentagem de vendas, chegando a 35% do total de enzimas de origem microbianas comercializadas. Tamanha demanda é garantida, principalmente, pelas indústrias de detergentes, processamento do couro e da carne, que são as maiores consumidoras dessa enzima (Bhunia *et al.*, 2012; Rani *et al.*, 2012).

Assim como outras enzimas comercializadas, as serina proteases alcalinas são produtos extracelulares de vários microrganismos pertencentes ao grupo dos bacilos. De modo que o gênero *Bacillus sp* seja o mais explorado comercialmente. Contudo, o uso das proteases apresenta desvantagens em relação a sua estabilidade, característica imprescindível para um bom catalisador industrial. Os problemas podem ser desde a inativação térmica até a autodigestão da enzima, dependendo das condições de manuseio (Anwar e Saleemuddin, 1998).

Embora segundo Bhunia *et al.* (2012), seja comum o uso comercial do caldo fermentado que contém as enzimas sem prévia purificação, Takagi (1993) afirma que a etapa de purificação é importante para uma melhor compreensão do funcionamento da enzima, bem como um estudo mais preciso de sua composição e suas características.

Desse modo, faz-se importante a investigação de novos organismos que ofereçam maior estabilidade ao produto, assim como diminuam o gasto relacionado à produção, que de

acordo com Harrison (2014) deve-se, em sua maior parte, ao processo de purificação, pois geralmente ele é composto de várias etapas, devido à da complexidade do meio.

1.1 OBJETIVOS

Caracterizar as enzimas produzidas, através da linhagem de *Bacillus subtilis* escolhida, em relação a parâmetros bioquímicos selecionados, bem como verificar a aplicação da precipitação com metanol, acetona, etanol ou sulfato de amônio como possível método de pré-purificação das proteases de interesse.

Ao longo do desenvolvimento do projeto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Produzir, utilizando fermentação submersa (SmF) e via *Bacillus subtilis* CBMAI-1302, as proteases a serem estudadas;
- Determinar qual dos agentes precipitantes propostos proporciona a maior recuperação das enzimas de interesse;
- Verificar a influência da concentração enzimática inicial durante o processo de precipitação;
- Avaliar o impacto da precipitação na recuperação da enzima;
- Caracterizar o extrato enzimático obtido, visando-se obter os melhores valores de temperatura e pH para a atividade enzimática, assim como verificar o comportamento das enzimas na presença de alguns íons metálicos e agentes inibidores. Deseja-se também verificar a estabilidade da enzima nos intervalos de pH e temperatura escolhidos;
- Obter a curva cinética associada a enzima.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES

2.1.1 Aspectos gerais

As proteases são um grande grupo de enzimas responsáveis por catalisar o rompimento de ligações peptídicas de proteínas, sendo classificadas como hidrolases, já que necessitam da presença de água para desempenhar sua função, e são, por vezes, também chamadas de enzimas proteolíticas (Murray, 2011).

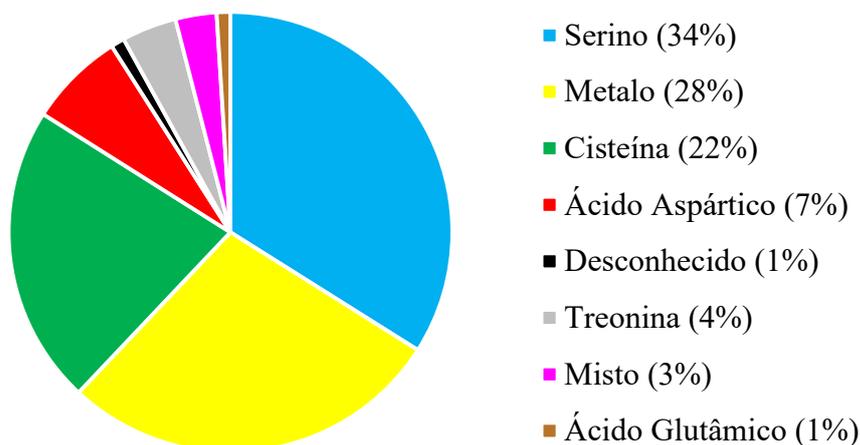
As enzimas proteolíticas podem ser divididas em dois subgrupos, dependendo da região em que atuam nas biomoléculas, de modo que se a enzima for capaz de atuar nas extremidades da proteína, clivando peptídeos N-terminais ou C-terminais, ela pertencerá ao subgrupo das exopeptidases, enquanto que, se a enzima quebrar peptídeos internos da proteína, ela pertencerá ao subgrupo das endopeptidases. Para fins industriais, o segundo subgrupo é o mais importante (Murray, 2011; Ward *et al.*, 2009).

Milhares de proteases tem sido isoladas e caracterizadas ao longo dos anos, porém entre elas apenas algumas são comercialmente relevantes, pois elas apresentam diferenças em suas propriedades, como o tipo de substrato ideal, local do sítio ativo, perfil de estabilidade e mecanismo catalítico. Estas diferenças são causadas pela alteração do grupo catalítico das enzimas, o que faz com que sejam separadas ainda em 6 subgrupos, em função do grupo catalítico que contêm, que pode ser serina, cisteína, ácido aspártico, metalo, treonina e ácido glutâmico. Sendo o mais abundante o das serino proteases, conforme mostrado na Figura 1 (Murray, 2011; Fedatto, 2004).

É possível também separar as proteases em relação ao pH ideal para que desempenhem sua máxima atividade enzimática. Desse modo, elas podem ser divididas em ácidas, para as enzimas com pH ideal de 2 a 5, sendo os fungos, os principais produtores de proteases ácidas. Neutras, para as que apresentam valores de pH ideal próximos de 7, tendo

como principal fonte as plantas. E, por fim, as alcalinas, que são as que apresentam pH entre 8 e 11; as principais produtoras de proteases alcalinas são as bactérias, principalmente as do gênero *Bacillus* (Murray, 2011; Fedatto, 2004).

Figura 1 – Grupos de protease identificados.



Fonte: Adaptado de Contesini *et al.* (2017).

De fato, o grupo catalítico é responsável por várias alterações no funcionamento da enzima, assim sendo as propriedades ideais de cada enzima variam em função do grupo catalítico que elas contêm, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais propriedades dos grupos de protease.

Classificação	Massa molar (KDa)	pH ideal	Temperatura ideal (°C)
Proteases Aspárticas	30 - 45	3 - 5	40 - 55
Cisteína-proteases	34 - 35	2 - 3	40 - 55
Metallo-proteases	19 - 37	5 - 7	65 - 85
Serina-proteases	18 - 35	6 - 11	50 - 70

Fonte: Aguilar e Sato, 2018.

Diversos tipos de proteases apresentam importância comercial, em especial as neutras e as alcalinas, em virtude de propriedades significativas que elas exibem. A principal aplicação encontra-se no setor de produção de detergentes, graças ao seu caráter alcalofílico e a sua elevada estabilidade quando em contato com certos detergentes e surfactantes. O uso

dessas enzimas também revolucionou a produção de produtos de limpeza, já que tornou possível a remoção de depósitos proteicos, principalmente manchas de sangue, pigmentos e certos lipídios de forma menos agressiva e sem a necessidade de aquecer ou agitar excessivamente a roupa, o que prolonga a vida útil do produto (Rani *et al.*, 2012; Contesini *et al.*, 2017; Hmidet *et al.*, 2009).

Outro segmento que é um grande consumidor de proteases é o da indústria têxtil e do couro, já que as enzimas proteolíticas ajudam a reduzir a toxicidade dos efluentes do processamento do couro durante o bronzeamento e também facilitam o processo de depilação, uma vez que as queratinases tem ação comprovada na remoção de pelos, cabelos, unhas e penas, além de melhorar a qualidade da pele durante o tratamento. Elas também aumentam a resistência de fibras de tecidos ao encolhimento e podem ser utilizadas no tratamento da lã (Ward *et al.*, 2009; Contesini *et al.*, 2017).

A indústria de alimentos também utiliza proteases em diversos setores. No setor de laticínios elas são utilizadas para produzir queijos. São também utilizadas na panificação, como um modificador do glúten, para a diversificação de produtos. Desempenham também um papel importante na produção de cervejas, promovendo a solubilização de proteínas da cevada, e também na prevenção da precipitação de polifenóis e oligossacarídeos. Na indústria da carne, essas enzimas são muito utilizadas no processo de amaciamento, através da hidrólise de proteínas fibrosas, como o colágeno (Rani *et al.*, 2012; Fernandes, 2013).

Outros segmentos menores que utilizam as proteases são os da produção de aditivos de rações animais, tratamento de resíduos e desenvolvimento de fármacos. Contudo, este último é um setor promissor, já que a síntese de fármacos através de enzimas tende a ser mais amigável com o ambiente. (Contesini *et al.*, 2017; Anwar e Saleemuddin, 1998).

As aplicações industriais são exemplos do uso de proteases extracelulares, onde sua habilidade de catalisar a quebra de grandes moléculas proteicas é explorada. Todavia, a ação intracelular dessas enzimas desempenha importantes papéis nos organismos, tanto em processos fisiológicos, destinados a manter o funcionamento saudável do organismo, quanto em processos de desenvolvimento de patógenos (Rani *et al.*, 2012).

Diversos processos de regulação fisiológica executados pelos organismos só são possíveis graças à ação das proteases, uma vez que a ocorrência desses processos é uma resposta à ativação de zimogênios, que são precursores proteicos inativos sintetizados pelos organismos. Essa ativação se dá por meio de uma clivagem proteolítica, o que torna a proteína ativa e produz

uma resposta rápida e irreversível a determinado estímulo (Neurath e Walsh, 1976; Tremacoldi, 2009).

Alguns processos dependentes do mecanismo de ativação de zimogênios são a coagulação sanguínea, o crescimento celular, o catabolismo proteico, a apoptose celular, o transporte através de membranas, a liberação de certos hormônios como a insulina e a formação de esporos em bactérias (Neurath e Walsh, 1976; Chang e Yang, 2000).

Embora sejam muito importantes para diversos processos realizados pelo organismo, as proteases também podem oferecer riscos em certas condições, visto que são capazes de destruir proteínas que compõem células e tecidos, facilitando a proliferação, adesão, migração e invasão do organismo por células patogênicas, este processo é observado em doenças como o câncer, aids, candidíase, malária, Zika, dengue e também em doenças causadas por fitopatógenos em plantas (Thomas *et al.*, 2018; Cunico *et al.*, 2008; Tremacoldi, 2009).

Esse fato tem fomentado o desenvolvimento de inibidores enzimáticos, que são substâncias que provocam a inativação das proteases, através da formação de complexos entre a enzima e proteínas inibidoras. Alguns medicamentos utilizados contra doenças que dependem de enzimas proteolíticas para seu desenvolvimento têm como princípio ativo inibidores de proteases, é o caso, como exemplo, do Atazanavir, medicamento que compõem o coquetel utilizado no tratamento de pacientes soro positivos para HIV. Ou ainda, do Suramin, droga que vem sendo estudada por se mostrar eficaz contra a replicação do vírus Zika (Neurath, 1984; Rani *et al.*, 2012; Cunico *et al.* 2007; Voss e Nitsche, 2020).

2.1.2 Mecanismo de ação

O principal fator ligado ao mecanismo de ação da enzima é o grupo catalítico que ela contém, uma vez que essa informação definirá sua especificidade, as propriedades biocatalíticas que ela vai possuir e também a região do polipeptídeo em que a enzima vai atuar. Desse modo, aminoproteases e carboxiproteases, que são exopeptidases, irão atuar nas extremidades da proteína, liberando, no primeiro caso, apenas um aminoácido, dipeptídeos ou tripeptídeos, e no segundo caso, apenas um aminoácido ou dipeptídeos (Ward *et al.*, 2009; Rawlings e Bateman, 2019).

As carboxipeptidases podem apresentar 3 dos 6 grupos catalíticos conhecidos, dividindo-se então em serina-carboxipeptidases, metalo-carboxipeptidases e cisteína-carboxipeptidases. Já nas endopeptidases, que atuam no interior dos peptídeos, é possível encontrar os 6 grupos catalíticos. São eles: Serina-endopeptidases, cisteína-endopeptidases,

aspártico-endopeptidases, metalo-endopeptidases, treonina-endopeptidases e proteases do ácido glutâmico (Ward *et al.*, 2009; Zanin e Moraes, 2004).

No caso das serina proteases, grupo mais abundante, o sítio ativo contém três resíduos, sendo um serina (Ser), um histidina (His) e um ácido aspártico (Asp), também conhecido como tríade catalítica. A quebra de peptídeos por essas enzimas, tende a seguir uma reação de duas etapas. Inicialmente, é formado, por meio de uma reação de acilação, um intermediário enzima-peptídeo que em seguida sofre um ataque nucleofílico pelas moléculas de água, resultando na separação do intermediário e liberação do peptídeo (Rao *et al.*, 1998; Rani *et al.*, 2012).

As proteases do ácido aspártico apresentam em seu sítio ativo resíduos de ácido aspártico (Asp), treonina (Thr) e glicina (Gly) e seu mecanismo de ação se caracteriza por apresentar uma catálise do tipo ácido-base. As metalo proteases, por outro lado, vão depender da ligação de um íon metálico bivalente a um resíduo do tipo “His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) motif”, para que realizem a clivagem do peptídeo. A especificidade das metaloproteinasas muda de acordo com o íon metálico utilizado (Rao *et al.*, 1998; Rani *et al.*, 2012).

Já as cisteína proteases vão realizar a hidrólise de derivados do ácido carboxílico, em um mecanismo de duplo sentido que envolve a formação geral ácido-base e também a hidrólise de um intermediário acil-tiol. As proteases do ácido glutâmico contêm o sítio ativo ácido glutâmico e glutamina que atuam, juntamente com as moléculas de água, como nucleófilos para quebrar os peptídeos da proteína em um mecanismo ácido-base distinto do das proteases aspárticas (Rao *et al.*, 1998).

Por fim, as treoninas proteases apresentam um mecanismo distinto e complexo de clivagem proteolítica que ainda contém algumas lacunas, contudo sabe-se que o seu mecanismo é semelhante ao das serino proteases, de modo que utiliza um sistema complexo para ativar os nucleófilos hidroxila secundários para que executem a catálise (Sieber *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2009).

2.1.3 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática tem sido uma tendência nos últimos anos, devido ao caráter renovável que ela proporciona aos processos em que é aplicada. A modificação de moléculas através de enzimas vem mudando a definição do que são resíduos industriais, assim como a forma de produção de diversos setores. Dentre eles, biocombustíveis, petroquímico e biotecnológico (Ogeda e Petri, 2010; Silva *et al.*, 2015).

Quando utilizada para modificar proteínas a hidrólise enzimática fornece alguns peptídeos bioativos, que apresentam alto valor agregado, graças as propriedades biológicas desejáveis que eles exibem, como atividades anti-hipertensiva, imunoestimulante, antioxidante e até mesmo inibição ao crescimento de certos microrganismos patogênicos como *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* (Contesini *et al.*, 2017; Daroit *et al.*, 2012).

De acordo com Aguilar e Sato (2018), o uso de proteases para promover a hidrólise enzimática é uma das mais promissoras aplicações para essas enzimas, uma vez que os produtos gerados possuem alto valor agregado. O processo é facilitado ainda, pela capacidade de modificação de vários grupos funcionais oferecidos por essas enzimas. Contudo, como os custos associados a essas reações são altos, é necessário o uso de fontes enzimáticas mais baratas.

Nesse contexto, é comum o uso de proteases derivadas de subprodutos, ou provenientes de microrganismos, especificamente das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, por fornecerem hidrolisados proteicos de ótima qualidade e com aplicações mais nobres, como a formulação de alimentos para crianças e alimentos específicos para dietas terapêuticas (Contesini *et al.*, 2017; Aguilar e Sato, 2018).

2.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES

2.2.1 Biossíntese das proteases

Os processos fermentativos, baseiam-se na biossíntese de produtos por organismos vivos e são encontrados com frequência na produção de bioprodutos, por causa da maior facilidade que oferecem para a produção dos compostos desejados e também significativa redução no impacto ambiental, se comparados com a síntese química (Lima *et al.*, 2001).

É possível, de acordo com Rani *et al.* (2012), obter as enzimas proteolíticas de diversas fontes, como plantas, animais e microrganismos. Contudo, a capacidade de produção oferecida pelas células animais e vegetais não acompanham a demanda atual dessas enzimas, tornando as células microbianas (bactérias e fungos) excelentes fontes, devido, principalmente, à diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética que oferecem. De fato, dois terços do total de proteases produzidas são de origem microbiana (Gupta *et al.*, 2003; Sathishkumar *et al.*, 2015).

Dentre os microrganismos utilizados para a obtenção de enzimas proteolíticas, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo um dos grupos mais

explorados, uma vez que 50% do total de enzimas comercializadas são produzidas por bacilos (Ward *et al.*, 2009).

O grande interesse industrial por esse grupo de bactérias, deve-se, principalmente, a alta capacidade de secreção proteica que elas oferecem, que só é superada por microrganismos recombinantes. Porém, suas vantagens se estendem muito além disso, já que não são, com exceção do grupo *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*, patogênicas, apresentam produção extracelular, facilitando a purificação, e também se desenvolvem utilizando várias fontes de nutrientes (Contesini *et al.*, 2017; Bhunia *et al.* 2012).

Como grande parte dos integrantes do gênero, o *Bacillus subtilis* é uma espécie de bactérias gram-positivas e aeróbias facultativas, que apresentam formato de bastonete, e possuem a capacidade de formar endósporos, podem ser facilmente encontradas no solo e são vastamente exploradas na indústria, devido a sua versatilidade, pois produzem, dentre outros compostos, antibióticos (bacitracina), biossurfactantes (surfactina) e enzimas (amilases e proteases) (Nakano e Zuber, 1998; Jönk *et al.*, 2015; Pant *et al.*, 2015).

Para a produção de proteases através de *Bacillus*, Contesini *et al.* (2017) afirmam que o processo fermentativo mais utilizado atualmente é a fermentação submersa (SmF), que corresponde a 90% do uso industrial. Esse método envolve o cultivo das células em um meio isolado contendo nutrientes, oferecendo assim redução de contaminantes e tendo ainda como vantagens a exigência de menores investimentos, curto período de crescimento celular e de estar bem definido cientificamente.

De acordo com Aguilar e Sato (2018), a duração do processo fermentativo, utilizando bactérias, tende a levar de 2 a 4 dias, e chega a produzir cerca de 30 g/L de enzimas. Todavia, para bactérias do grupo *Bacillus*, Contesini *et al.* (2017) reportam duração próxima de 48 horas para a fermentação na maioria dos gêneros e produção de até 2992 U/mL, utilizando melhoramento genético.

Sathishkumar *et al.* (2015) também relatam maior produção de enzimas após 48 horas, utilizando bactérias *Bacillus subtilis*, provenientes de ascídias marinhas.

Para uma elevada produção, há dois fatores que são críticos, segundo Aguilar e Sato (2018), pois vão influenciar diretamente no crescimento do microrganismo. O primeiro deles é a composição do meio, sendo essa variável responsável por até 30% do custo total associado à produção. O segundo engloba os parâmetros físico-químicos como temperatura de incubação, pH do meio, aeração durante o processo e tempo de duração da fermentação.

Em linhas gerais, diversas fontes de carbono e nitrogênio podem ser utilizadas na biossíntese das proteases, a Tabela 2, adaptada de Bhunia *et al.* (2012), contém as principais.

Tabela 2: Principais fontes de carbono e nitrogênio.

Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio
Melaço (cana ou beterraba)	Extrato de levedura
Soro de leite	Extrato de semente de algodão
n-Alcanos	Sangue seco
Gasóleo	Caseína
Esgoto doméstico	Farinha de amendoim
Resíduos de celulose	Farinha de soja

Fonte: Adaptado de Bhunia *et al.* (2012).

Para a fermentação utilizando microrganismos do gênero *Bacillus subtilis*, Moorthy e Baskar (2013) obtiveram elevada produção com meio à base de melaço, de modo análogo, Kim *et al.* (2016) conseguiram uma produção considerável utilizando frutose e extrato de levedura. Pant *et al.* (2015), por outro lado, encontraram, após otimizações do meio, galactose e peptona como as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, alcançando uma produção de 263 U/mL.

Alguns autores testaram ainda resíduos como substrato para a produção de enzimas proteolíticas, deixando assim o processo ainda mais amigável ao ambiente. Sathishkumar *et al.* (2015) alcançaram uma boa produção através do uso de resíduos agrícolas, enquanto Hakim *et al.* (2018) empregaram resíduos orgânicos urbanos em estado sólido para a produção obtendo resultados positivos.

2.2.2 Purificação das enzimas

A etapa de separação da proteína de interesse do meio em que foi produzida, comumente conhecida como “*downstream*”, é a parte mais dispendiosa de todo o processo de produção de biomoléculas, em consequência da grande quantidade de operações que geralmente são necessárias para isolar o produto de interesse, uma vez que ele costuma estar contido em um meio complexo e repleto de substâncias, e também ao alto custo por trás de algumas dessas operações (Walsh, 2014; Harrison, 2014).

De acordo com Li *et al.* (2019) a etapa de purificação é ainda, uma das fases mais desafiadoras do processo de produção de um bioproduto, pois requer o desenvolvimento de uma estratégia minuciosa que encontre o equilíbrio entre a pureza do produto, o custo do processo e recuperação da atividade da biomolécula alvo.

Um fator agravante ao processo de purificação é a possível perda de atividade da biomolécula, pois diversas proteínas tendem a sofrer inativação, ou até desnaturação, durante a etapa de “*downstream*”. Isso ocorre através de modificações conformacionais, que na pior das hipóteses, são irreversíveis resultando em maiores custos do processo, já que serão necessárias outras etapas para recuperar as proteínas (Jozala *et al.*, 2016; Weijers e Van’t Riet, 1992a).

No caso das enzimas, Weijers e Van’t Riet (1992a) afirmam que a estabilidade é ainda mais importante, já que o termo estabilidade pode referir-se à estabilidade conformacional da biomolécula e também a estabilidade catalítica. Enquanto a primeira refere-se a capacidade da enzima em manter-se em um estado tridimensional compacto e globular de mínima energia livre, conhecido como estado nativo, à segunda está ligada a capacidade da biomolécula de manter sua função biocatalítica, independente das condições do meio em que está inserida (Jozala *et al.*, 2016).

A purificação é geralmente composta por três etapas, na primeira delas, chamada clarificação, a principal preocupação é remover as impurezas mais fáceis e abundantes do meio, para isso, operações unitárias como centrifugação e filtração são utilizadas. A segunda etapa, conhecida por captura, preocupa-se em concentrar a biomolécula de interesse e, com essa finalidade, técnicas como precipitação, extração por solvente e diálise são aplicadas. A etapa final da purificação é o polimento, nessa fase o objetivo é a remoção das substâncias mais difíceis de separar, o que faz com que essa seja a parte mais cara do processo, já que utiliza técnicas de alta resolução como a cromatografia (Harrison, 2014; Forciniti, 2008; Li *et al.*, 2019).

Nesse sentido, encontrar operações unitárias eficientes, com boa seletividade, que ofereçam purificações satisfatórias, e cumpram o objetivo de cada etapa deve ser uma preocupação durante o desenvolvimento do trem de purificação, uma vez que a escolha da operação errada trará prejuízos ao processo (Forciniti, 2008).

Embora os métodos de separação costumem variar, de acordo com o tipo de substância que se deseja separar, Ibrahim-Granet e Bertrand (1996), afirmam que para as proteases a grande maioria das técnicas de separação conhecidas podem ser utilizadas com bons resultados. Contudo, há algumas técnicas cromatográficas mais específicas que se mostram

especialmente eficazes na purificação de proteases. São elas cromatografia de afinidade com antibióticos imobilizados e cromatografia de afinidade com certos corantes imobilizados. Ambas as técnicas se baseiam em interações hidrofóbicas entre a enzima e os ligantes imobilizados para garantir a separação (Stepanov *et al.*, 1981).

2.2.3 Precipitação

Dentre as diversas técnicas disponíveis para a purificação de biomoléculas, a precipitação é a mais utilizada, principalmente, para isolar o material de interesse, pois promove ao mesmo tempo a concentração e a purificação da proteína desejada. Essa versatilidade, faz com que ela possa ser utilizada em mais de uma etapa do trem de purificação, garantindo bons resultados no processo e diminuindo os custos (Bhunia *et al.*, 2012; Forciniti, 2008).

A precipitação é uma técnica antiga, já que os primeiros registros do seu uso datam de 1789. Entretanto, a sua aplicação na purificação de proteínas foi iniciada apenas durante a segunda guerra mundial, para o fracionamento dos componentes do sangue humano (Dos Santos *et al.*, 2017). Desde então, diversas pesquisas foram realizadas e, graças a isso, hoje a técnica é empregada no processo de obtenção de diversos bioprodutos como ovalbumina, lipase, elastase, protease e lactose, sendo que, de acordo com Gagnon (2012), a técnica apresenta potencial para ser usada em muitos outros processos.

Não por acaso, essa operação foi uma das primeiras técnicas a serem utilizadas na separação de biomoléculas, já que a lista de vantagens que apresenta frente às demais é extensa, dentre elas destacam-se à sua simplicidade e facilidade de execução, diversas opções de agentes precipitantes, facilidade de ampliação de escala, rapidez e baixo custo. Em contrapartida, a técnica deixa a desejar em termos de resolução, já que não possui elevada capacidade de purificação, principalmente se for executada em uma única etapa (Pessoa Junior e Kilikian, 2005; Dos Santos *et al.*, 2017).

Desse modo, a precipitação é comumente utilizada em etapas iniciais da purificação, para redução de impurezas abundantes. Contudo, para meios com menor teor de impurezas, como os provenientes de fermentações utilizando bactérias que produzem proteínas extracelulares, a precipitação mostra-se bastante eficiente, podendo, de acordo com o grau de pureza exigido, realizar a purificação em uma única etapa (Pessoa Junior e Kilikian, 2005; Bhunia *et al.*, 2012).

Existem duas estratégias principais que podem ser empregadas para que a precipitação ocorra, a primeira delas é a promoção de uma redução da concentração da proteína

no meio, através da adição de grandes quantidades de um agente químico que provoque a alteração da natureza do solvente em sua totalidade, tais como solventes orgânicos ou sais neutros. A segunda, envolve a utilização de agentes químicos que possuam interações diretas com a proteína alvo, nesse caso, pequenas adições de agentes como, ácidos, bases ou certos íons metálicos são suficientes (Bell *et al.*, 1983).

Independente da estratégia utilizada, o objetivo é o mesmo: consiste em gerar uma perturbação química ou física, provocada pelo agente precipitante, que tende a promover a formação de conglomerados proteicos insolúveis, visíveis a olho nu, e que posteriormente irão depender de operações de separação sólido-líquido, como filtração ou centrifugação, para ser separado da solução (Hatti-Kaul e Mattiasson, 2003).

Um dos fatores mais importantes que deve ser levado em consideração ao se utilizar a precipitação é a solubilidade da proteína, uma vez que o principal objetivo é reduzir esta solubilidade a um ponto em que ela não seja mais solúvel no meio em que está contida (Englard e Seifter, 1990).

As principais variáveis ligadas à solubilidade são a temperatura e o pH, sendo o segundo especialmente importante, já que alterações no pH provocam mudanças nas cargas elétricas superficiais das proteínas, e essas cargas são responsáveis por determinar o grau de solubilidade da molécula. Tão importante é a importância do controle dessas cargas que a variável mais utilizada para se estudar a precipitação de um composto é o ponto isoelétrico (pI), que indica o pH no qual a carga global da biomolécula é zero, tendo assim a mínima solubilidade possível (Pessoa Junior e Kilikian, 2005; Bell *et al.*, 1983).

O tipo de agente precipitante utilizado também é um parâmetro importante, uma vez que vai definir qual o método de precipitação que será utilizado, já que ao modificar o tipo de agente o princípio de interação entre as moléculas, pelo qual o controle de cargas elétricas da proteína é feito também muda (Pessoa Junior e Kilikian, 2005). A Tabela 3 lista os principais métodos de precipitação disponíveis, assim como suas vantagens e desvantagens.

Como já mencionado, a vasta quantidade de agentes precipitantes existentes é um grande atrativo dessa técnica, dentre esses, os mais utilizados são os sais neutros, em especial o sulfato de amônio. No entanto, a precipitação através de solventes orgânicos como acetona, metanol, etanol e butanol mostra-se promissora e vem sendo aplicada na purificação de diversas proteínas (Englard e Seifter, 1990; Gupta *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2016).

O diferencial que faz com que o sulfato de amônio seja o agente precipitante mais utilizado, são suas inúmeras vantagens em relação aos outros sais, esse sal possui alta

solubilidade, mesmo em temperaturas próximas de zero, é barato, pode ser facilmente obtido e também possui ação estabilizante sobre as proteínas, característica essa muito atrativa. Porém, há alguns fatores que exigem cautela em seu uso, sendo os principais seu caráter corrosivo, que causa maior manutenção dos equipamentos e também a necessidade de tratamento dos efluentes, já que pode provocar eutrofização (Bell *et al.*, 1983; Bhunia *et al.*, 2012).

Tabela 3 – Principais métodos de precipitação disponíveis.

Precipitante	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Sais neutros	Interações hidrofóbicas pela redução da camada de hidratação da proteína	- Baixo custo - Uso universal	- Corrosivo - Liberação de amônia em pH alcalino
Polímeros não-iônicos	Exclusão da proteína da fase aquosa reduzindo a quantidade de água disponível para a solvatação da proteína	- Pequena quantidade de precipitante	- Aumento da viscosidade
Calor	Interações hidrofóbicas e interferência das moléculas de água nas ligações de hidrogênio	- Baixo custo - Simplicidade	- Risco de desnaturação
Polieletrólitos	Ligação com a molécula de proteína atuando como agente flocculante	- Pequena quantidade de precipitante	- Risco de desnaturação
Precipitação isoelétrica	Neutralização da carga global da proteína pela alteração do pH do meio	- Pequena quantidade de precipitante	- Risco de desnaturação
Sais metálicos	Formação de complexos	- Pequena quantidade de precipitante	- Risco de desnaturação
Solventes orgânicos	Redução da constante dielétrica do meio aumentando as interações eletrostáticas intermoleculares	- Facilidade de reciclagem - Fácil recuperação do precipitado	- Risco de desnaturação - Inflamável e explosivo

Fonte: Adaptado de Pessoa Junior e Kilikian, 2005

Diversos autores reportam bons resultados ao associarem a precipitação com técnicas cromatográficas durante o processo de purificação de proteases, destacam-se Li *et al.* (2018), Dorra *et al.* (2018), Benmrad *et al.* (2018) e Rekik *et al.* (2019).

Pant *et al.* (2015), Sathishkumar *et al.* (2015), Farhadian *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2000) obtiveram bons resultados ao utilizar a precipitação com sulfato de amônio nas etapas iniciais da purificação de proteases provenientes de *Bacillus subtilis*.

Marathe *et al.* (2018) também purificaram enzimas provenientes da mesma bactéria, porém utilizando precipitação isoelétrica. De modo análogo, Rai e Mukherjee (2010) e Xu *et al.* (2019) combinaram precipitação com etanol e métodos cromatográficos para purificar proteases do mesmo gênero de *Bacillus*.

Thakur *et al.* (2018) purificaram proteases de *Bacillus sp* utilizando precipitação com etanol. Da mesma forma, Wahab e Ahmed (2018) também utilizaram etanol para purificar proteases provenientes de *Aspergius niger*. Da Silva *et al.* (2018), por outro lado, usaram acetona na purificação de proteases de *Aspergillus tamari*. Enquanto, Soares *et al.* (2011) avaliaram o uso de etanol e sulfato de amônio na precipitação de bromelina. Por fim, Pinheiro *et al.* (2016) e Watanabe *et al.* (2009) estudaram a influência da quantidade de solventes orgânicos e sais, além da concentração inicial de proteínas na precipitação de lisozima.

2.3 CARACTERIZAÇÃO

2.3.1 Influência de diversos fatores na atividade da enzima

De acordo com Anwar e Saleemuddin (1998), uma desvantagem do uso das proteases é sua propensão à inativação, o que exige cautela tanto no manuseio quanto na forma de armazenamento dessas enzimas. Nesse sentido, é possível notar que a estabilidade da enzima produzida é um fator limitante na escolha do microrganismo que se vai trabalhar e, por esse motivo, executar a caracterização da enzima produzida é fundamental para a definição de tais parâmetros.

Os problemas com a estabilidade e os riscos de inativação tem gerado um maior interesse por enzimas que sejam mais resistentes à altas temperaturas e agentes inativantes, como alguns solventes orgânicos, e também por técnicas de melhoramento genético. Outra estratégia promissora para superar essa dificuldade é a imobilização da enzima, uma vez que isso a torna mais estável, principalmente para ser armazenada (Thakur *et al.*, 2018; Kasana *et al.*, 2011; Anwar e Saleemuddin, 1998).

Outro fator importante, segundo Aguilar e Sato (2018) é que enzimas produzidas por diferentes microrganismos, ou até mesmo por microrganismos da mesma espécie, porém de linhagens diferentes, apresentam diferenças em seu comportamento bioquímico, devido à

alteração das melhores condições para que a biomolécula desempenhe sua máxima atividade biológica, sendo necessário conhecer essas condições.

Çalık *et al.* (2001) afirmam que alterações de parâmetros como temperatura e pH, podem não só influenciar na síntese do produto desejado, como também provocar a inativação dos produtos formados. De maneira análoga, Zhang *et al.* (2019) asseguram que os íons Ca^{2+} em certas concentrações, aumentam a atividade enzimática das proteases na produção via *Bacillus*.

Para uma segura avaliação das características bioquímicas da enzima, os parâmetros que são frequentemente escolhidos são a temperatura e o pH, nos quais ela tende a alcançar sua máxima atividade catalítica, estabilidade enzimática frente a variações nos valores de temperatura e do pH, efeito de alguns íons metálicos, efeito de inibidores e também os parâmetros cinéticos associados à enzima (Silva *et al.*, 2009; Sayem *et al.*, 2006; Sathishkumar *et al.*, 2015).

2.3.1.1 pH

Ao se trabalhar com proteases, o pH é o principal parâmetro utilizado para identificar a qual grupo a enzima pertence, isto é, se ela é uma protease alcalina, ácida ou neutra. Além disso, alguns autores reportam variações no pH como sendo um fator potencialmente responsável pela perda na atividade ou até a inativação de enzimas, pois a maior parte das enzimas tende a perder significativamente sua atividade quando submetidas a variações em torno de seu pH ideal (Patel *et al.*, 2019; Farhadian *et al.*, 2015; Hakim *et al.*, 2018).

Nesse cenário, as enzimas produzidas por bactérias do grupo *Bacillus* são promissoras, já que, em conformidade com Contesini *et al.* (2017), além de apresentarem valor de pH ideal no intervalo entre 6 e 10, sendo em sua maior parte alcalinas, também apresentam uma notável estabilidade à alteração desses valores, o que garante o melhor desempenho em condições operacionais menos amigáveis.

Sathishkumar *et al.* (2015) reportam que proteases obtidas a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis* provaram ser consideravelmente estáveis, exibindo atividade superior a 60% no intervalo de pH entre 5 e 12, e 100% com valores de pH compreendidos entre 9 e 11. Yang *et al.* (2000) por outro lado, reportaram menor estabilidade ao trabalhar com bactérias do mesmo gênero, mantendo a estabilidade apenas no intervalo entre 7 e 9.

2.3.1.2 Temperatura

Assim como o pH, a temperatura também é um fator diretamente ligado com a estabilidade e perda de atividade de enzimas, de acordo com Sayem *et al.* (2006), uma variação de aproximadamente 10 °C pode fazer com que certas linhagens de enzimas rane parte de sua atividade, além de acelerar a perda da atividade remanescente. Por esse motivo, especial atenção é dada à enzimas que sejam mais resistentes a variações na temperatura, conhecidas como enzimas termoestáveis (Abu-Kudhir *et al.*, 2019; Promchai *et al.*, 2018).

Segundo Pant *et al.* (2015), proteases provenientes de bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se por serem termoestáveis e, por isso, sempre tiveram alta demanda industrial. Além disso, Contesini *et al.* (2017) afirmam que bactérias desse gênero apresentam significativa estabilidade em um grande intervalo de temperaturas, variando de 37 °C a 60 °C.

Thakur *et al.* (2018) reportaram boa estabilidade térmica ao trabalhar com proteases obtidas por uma linhagem de *Bacillus subtilis*, eles observaram que a temperatura ideal para máxima atividade foi de 65 °C e ela se mostrou capaz de manter 75% dessa atividade a 75 °C. Promchai *et al.* (2018), de modo análogo, ao comparar proteases produzidas por uma linhagem de *Halobacterium salinarum* com as de uma linhagem recombinante de *Bacillus subtilis*, concluíram que a segunda é mais apropriada para o uso industrial, já que é mais resistente a temperatura, apresentando temperatura ideal em torno de 60 °C.

2.3.1.3 Agentes inibidores

Os agentes inibidores de proteases são reguladores de atividade que reduzem ou inibem a atividade acentuada ou descontrolada das enzimas do gênero. Podendo ser encontrados em diversos organismos, desde tecidos animais e vegetais até microrganismos. Estes inibidores tem importantes papéis na inativação de enzimas envolvidas no desenvolvimento de certas doenças humanas como câncer, hepatite, AIDS e trombose (Cotabarren *et al.*, 2020; Monteiro e Silva, 2009).

Contudo, a ação de inibidores prejudica a catálise enzimática em alguns produtos, como é o caso dos detergentes industriais, que constituem o maior mercado para as proteases; Alguns surfactantes, como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Triton X-100 são reportados como inibidores de proteases, quando presentes em certas concentrações no produto final. Nesse sentido, os mecanismos de inibição das proteases vêm sendo estudado há algum tempo, com o intuito de tornar os produtos mais estáveis (Shamsi *et al.*, 2016; Hammani *et al.*, 2018).

Helal *et al.* (2012) reportam boa estabilidade de proteases provenientes de microrganismo do gênero *Bacillus subtilis* ao surfactante Triton X-100 com concentração em torno de 1% porém, um aumento da concentração do reagente para 5% resultou na perda de 21% da atividade da enzima. De modo análogo, a presença do detergente SDS na concentração de 1% em solução, fez com que houvesse uma perda de atividade de 40%.

2.3.1.4 Íons metálicos

A influência de íons metálicos é um parâmetro frequentemente estudado na caracterização de enzimas, já que, de acordo com Zhang *et al.* (2019) eles agem como ativadores para elas, sendo responsáveis não só por modificar sua atividade, como também sua estabilidade. Desse modo, é comum o uso de íons metálicos como estabilizantes com o objetivo de aumentar o tempo de armazenamento das enzimas (Sayem *et al.*, 2006).

Para proteases provenientes de bactérias do grupo *Bacillus*, a presença de íons dos metais cálcio, manganês e magnésio são frequentemente reportadas como benéficas, pois atuam na manutenção da conformação ativa da enzima, aumentando assim a sua atividade. Por outro lado, os íons dos metais mercúrio, níquel, zinco e cobre comumente são reportados como inibidores de atividade (Hammani *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Hakim *et al.*, 2018).

Hakim *et al.* (2018) relatam o efeito positivo ao utilizar os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em proteases produzidas a partir da bactéria *Bacillus subtilis*. Segundo os autores, a atividade chegou a ser aumentada em até 25% na presença desses íons, porém na presença dos íons Fe^{3+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} a atividade foi fortemente inibida. Os autores afirmam ainda que as informações de interações com metais podem ser utilizadas para identificar a qual família pertence a protease estudada.

2.3.1.5 Parâmetros cinéticos

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos tentando descrever os mecanismos catalíticos das reações enzimáticas, dentre eles, especial atenção é dada para o modelo cinético de Henri-Michaelis-Menten. Uma vez que, a equação proveniente desse modelo, permite obter informações importantes para a utilização de enzimas a nível industrial, como a velocidade das reações enzimáticas ou ainda o grau de afinidade e a ligação entre enzimas provenientes de diferentes fontes e um dado substrato (Monteiro e Silva, 2009).

Os dois parâmetros obtidos pela equação de Henri-Michaelis-Menten permitem descrever a atividade de uma enzima, pois irão informar a quantidade máxima de produto

formado em um dado tempo (V_{max}) e, através da constante de Michaelis (K_m), qual a concentração de substrato em que se obtém uma velocidade de reação igual a metade da máxima velocidade obtida (Dorra *et al.*, 2018; Monteiro e Silva, 2009).

Desse modo, obter os parâmetros cinéticos associados à novas linhagens enzimáticas é muito importante, pois permite quantificar quão vantajoso é o seu uso frente às outras enzimas existentes, visto que os parâmetros cinéticos estão ligados diretamente à eficiência catalítica da enzima (Dorra *et al.*, 2018).

Farhadian *et al.* (2015) reportam valores dos parâmetros de V_{max} e K_m de 1183 M/min e 2,499 mg/mL, respectivamente, ao trabalharem com proteases provenientes de *Bacillus subtilis*. De modo análogo, Suberu *et al.* (2019) obtiveram valores de K_m iguais a 2,80 mg/mL, utilizando enzimas provenientes de bactérias do mesmo gênero. Vale ressaltar que ambos os autores utilizaram caseína como substrato.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentado o material e os métodos utilizados ao longo de todo o processo de obtenção, pré-purificação e caracterização da protease aqui estudada.

Os ensaios experimentais deste trabalho, que compreendem desde o cultivo das bactérias e execução das fermentações até a realização dos estudos de precipitação e caracterização da enzima, foram conduzidos no Laboratório de Processos de Separação II (LPSII) do Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos (DESQ) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Cepa de bactérias *Bacillus subtilis*

A cepa da bactéria *Bacillus Subtilis*, utilizada para obter a enzima, foi adquirida pelo LPSII junto à Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, onde encontra-se armazenada sob o código CBMAI - 1302. E o laudo de autorização da utilização do microrganismo, gerado pelo SISGEN, encontra-se no final deste trabalho, sob forma de anexo.

3.1.2 Material utilizado

Todos os reagentes e sais utilizados foram de pureza analítica. As Tabela 4, 5 e 6 listam os nomes, as aplicações e os respectivos fornecedores para os reagentes utilizados em cada uma das 3 etapas que compuseram este trabalho.

Tabela 4 – Material utilizado para o cultivo das bactérias e biossíntese.

Reagente	Aplicação	Fornecedor
Ágar bacteriológico	Cultivo da bactéria	VWR
Dextrose anidra (Glucose) P.A.	Inóculo	Dinâmica [®]
Extrato de carne	Cultivo da bactéria	OXOID
Extrato de levedura	Fermentação	KASVI
Fosfato de sódio bibásico anidro P.A.	Ajuste de pH	Synth [®]
Leite em pó desnatado	Fermentação	Piracanjuba
Peptona bacteriológica	Cultivo da bactéria e inóculo	KASVI

Tabela 5 – Material utilizado para os estudos de precipitação.

Reagente	Aplicação	Fornecedor
Acetona P.A.	Agente precipitante	Synth [®]
Álcool etílico P.A.	Agente precipitante	Dinâmica [®]
Fosfato de sódio bibásico anidro P.A.	Tampão	Synth [®]
Fosfato de sódio monobásico anidro P.A.	Tampão	Synth [®]
Metanol P.A.	Agente precipitante	Chemco
Sulfato de amônio P.A.	Agente precipitante	Synth [®]

Tabela 6 – Material utilizado para a caracterização da enzima.

Reagente	Aplicação	Fornecedor
Ácido cítrico anidro P.A.	Tampão	Synth [®]
Ácido clorídrico P.A.	Tampão	Synth [®]
Ácido tricloroacético (TCA) P.A.	Atividade	Dinâmica [®]
Álcool etílico 95% P.A.	Atividade	ECIBRA
Azocaseína	Atividade	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de sódio P.A.	Tampão	Synth [®]
Carbonato de sódio anidro P.A.	Tampão	CAQ
Citrato de sódio dihidratado P.A.	Tampão	Synth [®]
Cloreto de cálcio dihidratado P.A.	Caracterização	Synth [®]
Cloreto de mercúrio (II) anidro	Caracterização	Química moderna
Cloreto de níquel (II) anidro	Caracterização	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 90% puro	Caracterização	Synth [®]
EDTA sal dissódico P.A.	Caracterização	Synth [®]
Fosfato de sódio bibásico anidro P.A.	Tampão	Synth [®]
Fosfato de sódio monobásico anidro P.A.	Tampão	Synth [®]
Hidróxido de sódio P.A.	Tampão e atividade	Synth [®]
Reagente Colorimétrico de Bradford	Proteínas totais	Bio-Rad
Sulfato de cobre (II) pentahidratado P.A.	Caracterização	Synth [®]
Sulfato de ferro (II) heptahidratado P.A.	Caracterização	Avantor
Sulfato de magnésio heptahidratado P.A.	Caracterização	ECIBRA
Sulfato de manganês (II) monohidratado P.A.	Caracterização	Ludwig
Sulfato de zinco (II) heptahidratado P.A.	Caracterização	Synth [®]
Tris-hidroximetil aminometano P.A.	Tampão	Synth [®]
Triton X-100	Caracterização	CAQ

3.1.3 Equipamento utilizado

A seguir, são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, as especificações técnicas, as aplicações e os respectivos fornecedores para os equipamentos utilizados em cada uma das 3 etapas que compuseram este estudo.

Tabela 7 – Equipamentos utilizados para o cultivo das bactérias e biossíntese.

Equipamento	Aplicação	Fornecedor
Agitador magnético C-MAG HS 4	Preparo soluções	IKA
Agitador orbital AJX-SK180	Condução das fermentações	Micronal
Alça de platina	Inocular bactérias	-
Autoclave 12L analógica	Esterilizar soluções	Stermax
Balança analítica AUY220	Pesagem de reagentes	Shimadzu
Bico de Bunsen	Inocular bactérias	-
Centrífuga refrigerada Velocity 14R	Separar células	Dynamica
Destilador portátil	Preparo de soluções	Bio Water System
Espectrofotômetro AJX-1900	Verificar D.O.	Micronal
Estufa 515	Crescimento das bactérias	Fanem
Freezer CVU26	Conservar microrganismos	Consul
Peagâmetro PH-221	Ajuste de pH	Lutron

Tabela 8 – Equipamentos utilizados para os estudos de precipitação.

Equipamento	Aplicação	Fornecedor
Agitador magnético C-MAG HS 4	Preparo soluções	IKA
Banho ultratermostato 521-2D V1	Ensaio de precipitação	Ethik Technology
Barra magnética	Preparo soluções	-
Béquer encamisado de vidro	Ensaio de precipitação	PYREX®
Centrífuga refrigerada Velocity 14R	Precipitação e quantificação	Dynamica
Termômetro de precisão ETS-D5	Ensaio de precipitação	IKA

Tabela 9 – Equipamentos utilizados para a caracterização da enzima.

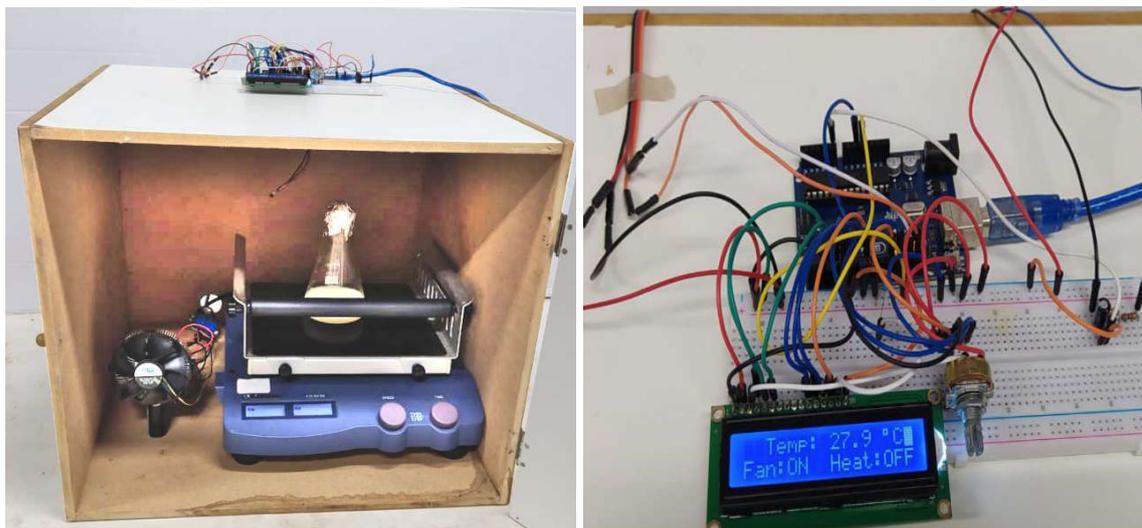
Equipamento	Aplicação	Fornecedor
Agitador magnético C-MAG HS 4	Preparo tampões	IKA
Banho ultratermostato 521-2D V1	Ensaio de caracterização	Ethik Technology
Barra magnética	Preparo tampões	-
Centrífuga refrigerada Velocity 14R	Quantificação	Dynamica
Espectrofotômetro AJX-1900	Quantificação	Micronal

Para a execução das fermentações foi adaptado o equipamento mostrado na Figura 2, com o intuito de controlar a temperatura ao longo do processo. Dessa forma, o agitador orbital foi utilizado dentro de uma caixa de madeira com dimensões 46 cm x 46 cm x 39 cm. Dentro da caixa, foi instalado um sistema controlador de temperatura, construído utilizando um microcontrolador Arduino Uno, um display LCD 16x2, um módulo de relé de dois canais, um sensor de temperatura LM35, um cooler com dissipador de calor, um módulo Peltier e uma fonte de alimentação.

O equipamento construído possuía dois principais objetivos: o primeiro era manter a temperatura dentro da caixa homogênea, através de uma ventoinha que reduzia a formação de gradientes de temperatura e o segundo era aquecer o ar no interior da câmara, sempre que este estivesse abaixo de 27,8 °C.

O dispositivo construído foi previamente testado e se mostrou capaz de manter a variação de temperatura dentro de um intervalo satisfatório.

Figura 2 – Equipamento utilizado na fermentação.



3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo dos microrganismos

As bactérias foram cultivadas e replicadas obedecendo a metodologia de Ehrhardt (2015), desse modo, foram realizados repiques mensais da cepa original de bactérias adquirida.

Os repiques foram realizados em tubos de vidro, nos quais foram adicionados 3 mL do meio ágar nutriente (ANVISA, 2004), composto por 0,3% de extrato de carne, 0,5% de peptona e 1,5% de ágar bacteriológico dissolvidos em água destilada. Em seguida, os tubos

foram autoclavados por 15 minutos e deixados em repouso até atingirem temperatura ambiente. Decorrido esse período, procedeu-se com a inoculação, através da alça de platina e bico de Bunsen. Após a inoculação, os tubos foram incubados na temperatura de 37 °C por 24 horas para crescimento das colônias de bactérias e depois foram mantidos sob refrigeração a 4 °C.

3.2.2 Inóculo

O meio utilizado para o inóculo foi elaborado de acordo com a metodologia de Melani *et al.* (2019), desse modo, foi preparado, com ajuda de um agitador magnético, a solução composta por 4% de dextrose anidra e 1% de peptona, enquanto o pH foi ajustado para 7,0 com solução de fosfato de sódio bibásico 0,5 M. Em seguida, foram transferidos 50 mL dessa solução para Erlenmeyers de 200 mL, que foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos.

Após a solução esfriar, a bactéria foi inoculada, em ambiente asséptico, utilizando-se a alça de platina e o bico de Bunsen, a partir de um dos tubos de repique preparados. Depois, o Erlenmeyer foi vedado e conduzido a incubação agitada de 200 rpm e 28 °C, por 48 horas no aparato descrito anteriormente na Figura 2.

Após o período de incubação, foi retirada uma alíquota, visando-se analisar a densidade ótica a 625 nm, a leitura obtida foi utilizada para ajustar o volume de inóculo a ser adicionado no meio de fermentação, tomando por base que a absorbância ideal deveria estar no intervalo entre 0,08 a 0,1.

3.2.3 Fermentação e preparo do extrato enzimático

O meio fermentativo também foi baseado em Melani *et al.* (2019), contudo contou com algumas modificações recomendadas pela própria autora, que está desenvolvendo sua pesquisa no mesmo laboratório em que esta Dissertação foi elaborada.

Dessa forma, o meio utilizado na fermentação foi composto por 1,74 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de leite em pó desnatado. 100 mL do meio foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL que foi, em seguida, autoclavado a 120 °C por 15 minutos. Depois, com base no valor de densidade ótica ideal, 10 mL do inóculo foram transferidos para o meio de fermentação esterilizado, com a ajuda de uma pipeta de vidro, e ele foi submetido a incubação agitada de 200 rpm e 28 °C por 60 horas no aparato da Figura 2.

Decorrido o tempo da fermentação, o material foi centrifugado a 3.500x G por 15 minutos e a 20 °C, visando separação das bactérias. O sobrenadante foi coletado e dividido em iguais volumes de 20 mL em tubos Falcon que foram, em seguida, congelados visando a

conservação da atividade enzimática, enquanto que o pellet de bactérias formado foi autoclavado e devidamente descartado.

3.2.4 Atividade enzimática

Para a determinação da atividade proteolítica foi utilizado o método colorimétrico utilizado por Charney e Tomarelli (1947), desse modo, 125 µL do extrato enzimático foram adicionados em tubo Eppendorf juntamente com 125 µL de solução de azocaseína 1%, solubilizada em etanol e com o tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). O tubo foi incubado a 37 °C por 15 minutos e logo em seguida, foram adicionados 750 µL de solução de TCA 5%. O material foi então centrifugado por 5 minutos a 6.000x G, o sobrenadante foi separado e a ele adicionou-se 1 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 M.

Por fim, a leitura da solução foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 440 nm. A quantificação é baseada na interpretação de que uma unidade de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para produzir um incremento de uma unidade na densidade ótica a 440 nm em 1 hora.

3.2.5 Proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (1976), técnica que explora a capacidade das proteínas de ligarem-se a corantes. Nas análises, foi utilizado o Reagente colorimétrico de Bradford, fornecido pela Bio-Rad. O procedimento consistiu em pipetar 20 µL do extrato enzimático para um tubo Eppendorf, seguido da adição de 1 mL do Reagente diluído em água na proporção 1:4. A mistura foi agitada e incubada à temperatura ambiente por, 5 minutos, depois foi analisada em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 595 nm.

A curva de determinação foi construída tendo-se como padrão a proteína albumina do soro bovino (BSA) e encontra-se, como apêndice, no final desta dissertação.

3.2.6 Ensaio de precipitação

Para os experimentos de precipitação, foram utilizados etanol, acetona, metanol e sulfato de amônio como agentes precipitantes, com o intuito de verificar qual deles seria o mais apropriado para a enzima estudada. Todos os agentes foram resfriados a -5 °C antes das análises.

Os ensaios foram executados, com base na metodologia proposta por England e Seifter (1990). Desse modo, adicionou-se o agente precipitante em, previamente resfriado, em diversas concentrações (20, 40, 60 e 80% p/v), por gotejamento, ao extrato bruto enzimático, o volume do extrato enzimático foi de 20 mL.

Durante a adição do agente, a solução foi submetida a agitação e sob refrigeração constante em temperaturas em torno de 0 °C. Ao atingir a concentração pretendida para o agente precipitante, a mistura foi deixada em repouso por 20 minutos, para que atingisse o equilíbrio termodinâmico. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6.500x G por 20 minutos e a 0 °C. O pellet resultante foi ressuspenso em solução tampão de fosfato 0,1 M e pH 7, para a posterior determinação de proteínas totais e atividade proteolítica, enquanto o sobrenadante foi descartado de maneira apropriada.

Com os resultados obtidos, calculou-se os parâmetros utilizados para avaliar o procedimento: Atividade Específica (Equação 1), Fator de Purificação (Equação 2), Recuperação (Equação 3) e Rendimento (Equação 4).

$$\textit{Atividade Específica} = \frac{\textit{Atividade enzimática}}{\textit{Proteínas totais}} \quad (1)$$

$$\textit{Fator de Purificação} = \frac{\textit{Atividade Específica na fração}}{\textit{Atividade Específica inicial}} \quad (2)$$

$$\textit{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\textit{Atividade enzimática na fração}}{\textit{Atividade enzimática inicial}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

$$\textit{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\textit{Proteínas totais na fração}}{\textit{Proteínas totais inicial}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

3.2.6.1 Efeito da concentração inicial de enzimas

O melhor agente precipitante encontrado foi utilizado para testar a influência da concentração inicial de enzimas no processo de precipitação, e para verificar se a quantidade de enzimas em solução tem algum efeito sobre a quantidade de enzimas que é recuperada. Dessa forma, diluiu-se o extrato enzimático com água, de modo que ele apresentasse 20, 40, 60, 80 e 100% da atividade proteolítica inicial do extrato bruto enzimático, e realizou-se a precipitação

fracionada, nas mesmas condições anteriores e com as mesmas quantidades do agente precipitante adicionados por fração, já que a alíquota utilizada não foi alterada. Em seguida, determinou-se a atividade enzimática e a concentração de proteínas, assim como nos ensaios de precipitação.

3.2.7 Caracterização bioquímica

Para caracterizar bioquimicamente as enzimas obtidas, foram avaliados os valores do pH e da temperatura ideais para a atividade, bem como a estabilidade da enzima frente a variação dos valores de pH e temperatura. Também foram avaliadas a influência de alguns íons metálicos, o efeito de algumas substâncias apontadas como inibidoras na literatura e, por último, os parâmetros cinéticos, associados a enzima estudada, obtidos através da construção da curva cinética. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.7.1 Efeito do pH na atividade proteolítica

Para avaliar o melhor valor de pH para a atividade proteolítica, recorreu-se ao método de determinação 3.2.4 utilizando-se, ao invés da solução de tampão fosfato em pH 7, as seguintes soluções tampão: citrato (pH 5,0 e 6,0), fosfato (pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), Tris-HCl (pH 8,5 e 9,0), bicarbonato-carbonato (pH 9,5; 10,0; 10,5) e fosfato-NaOH (pH 11,0; 11,5 e 12,0). Os demais parâmetros do método não foram alterados.

Calculou-se a atividade residual, de acordo com a Equação 5, e, considerando o maior valor obtido como 100%, obteve-se a atividade relativa, através da Equação 6.

$$\textit{Atividade Residual (\%)} = \left(\frac{\textit{Atividade enzimática na condição específica}}{\textit{Atividade enzimática nas condições-padrão}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

$$\textit{Atividade Relativa (\%)} = \left(\frac{\textit{Atividade Residual na condição específica}}{\textit{Atividade Residual de 100\%}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Para verificar a estabilidade da enzima frente a variação no pH foi utilizado a metodologia de Gimenes (2018), de modo que a enzima pré-purificada foi incubada nos valores de pH citados anteriormente em iguais volumes de amostra e de solução tampão e a 45 °C durante 6 horas, de maneira que as alíquotas fossem retiradas após decorridos 0, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos e submetidas ao teste de atividade enzimática nas condições-

padrão, a atividade proteolítica residual foi calculada, adotando-se a atividade enzimática inicial como 100%.

3.2.7.2 Efeito da temperatura na atividade proteolítica

A determinação da temperatura ideal para as enzimas estudadas, também foi feita seguindo o método 3.2.4 alterando-se, porém, a temperatura de incubação do método de 37 °C pelas seguintes temperaturas: 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 e 90 °C. Os demais parâmetros do método foram mantidos, com exceção do pH, que foi alterado para o melhor valor de pH identificado nos experimentos anteriores. Calculou-se a atividade residual e a atividade relativa, de modo análogo à caracterização do efeito do pH.

A análise da resistência térmica da enzima, foi feita com base na metodologia de Gimenes (2018), assim sendo, a enzima pré-purificada foi incubada nas temperaturas descritas acima, em tubos Eppendorf contendo iguais volumes de extrato enzimático e de solução tampão de fosfato-NaOH no valor de pH igual a 11 durante 6 horas, de modo que fossem retiradas alíquotas após 0, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos e submetidas ao teste de atividade enzimática nas condições padrão, a atividade proteolítica residual foi calculada, adotando-se a atividade enzimática inicial como 100%.

3.2.7.3 Efeito de íons metálicos

Para avaliar eventuais efeitos de inibição ou ativação da enzima, foi utilizada a metodologia de Wang *et al.* (2013), de modo que a enzima pré-purificada foi incubada em tubos Eppendorf com os seguintes sais: MgSO₄, CaCl₂, MnSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, NiCl₂ e HgCl₂ nas concentrações de 5 mM e 10 mM, de maneira que cada tubo contivesse apenas um dos sais citados. A solução foi incubada por 1 hora a 45 °C e pH 11. Em seguida, a atividade proteolítica foi determinada pelo método padrão e a variação percentual em relação a atividade inicial foi calculada.

3.2.7.4 Efeito de inibidores e surfactantes

Com o intuito de verificar a interação da enzima pré-purificada com alguns compostos reportados como inibidores na literatura (Patel *et al.*, 2019; Farhadian *et al.*, 2015), a amostra foi incubada, em tubos Eppendorf, com soluções contendo Triton X-100, SDS e EDTA nas concentrações de 5 mM e 10 mM, de modo que cada tubo contivesse apenas um dos reagentes. A solução foi incubada por 1 hora a 45 °C e pH 11. Em seguida, a atividade

proteolítica foi determinada pelo método padrão e a atividade residual foi calculada, tendo a solução enzimática sem a presença de nenhum dos compostos como controle.

3.2.7.5 Parâmetros cinéticos

Foram obtidos ainda os parâmetros cinéticos associados a reação das proteases pré-purificadas. Utilizou-se a metodologia descrita por Gimenes (2018), assim, as enzimas foram incubadas em soluções com diferentes concentrações de azocaseína (0,003% a 0,648%) em soluções tampão de fosfato com pH igual a 11, por um minuto e a temperatura de 45 °C.

Em seguida a atividade proteolítica foi determinada e os resultados utilizados para obter a Constante de Michaelis (K_m) e a Taxa Máxima de Reação (V_{max}) através da aplicação da equação de Michaelis-Menten (Equação 7) e da equação do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Equação 8).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (8)$$

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica utilizada na pré-purificação foi escolhida levando em consideração as características do caldo fermentado obtido. Enquanto a caracterização foi realizada considerando parâmetros comumente relatados na literatura como sendo fundamentais para a correta identificação do biocatalisador utilizado.

4.1 BIODISSÍNTESE DA ENZIMA

A fermentação foi a etapa inicial do processo, sendo responsável por produzir a matéria-prima utilizada nesse estudo, ou seja, as proteases. Para isso, foi seguido o procedimento e a composição do meio indicados por Melani *et al.* (2019) realizando-se, porém, algumas modificações indicadas pela própria autora.

Enquanto o artigo publicado pela autora indicava a utilização de três etapas para a produção da enzima (pré-inóculo, inóculo e fermentação), a metodologia utilizada deixou de lado a primeira etapa, substituindo-a por um inóculo com maior volume e maior tempo de cultivo e a composição foi mantida a mesma.

O meio de fermentação, por outro lado, teve sua composição alterada. O artigo indicava a utilização de glucose (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,5%) e farinha de soja (5%), contudo a autora recomendou a substituição desses componentes por extrato de levedura (0,174%) e leite em pó desnatado (1%), por essa composição fornecer maior produção de enzima em ensaios preliminares. Pant *et al.* (2015) corroboram essa modificação, uma vez que, ao estudarem a melhor composição do meio para a produção de proteases, através de *Bacillus subtilis*, encontraram as maiores produções utilizando galactose, que é um monossacarídeo obtido do leite.

A otimização do meio de produção utilizado para a produção das enzimas, não fez parte do escopo desse trabalho, já que isso já vem sendo estudado por Melani *et al.* (2019), no

mesmo grupo de pesquisa. Dessa forma, os únicos parâmetros ligados à produção que foram modificados, estão associados ao controle da temperatura ao longo do processo.

4.1.1 Controle da temperatura

O processo de fermentação estava sendo executado dentro de uma caixa de madeira, com o intuito de manter a temperatura constante durante a fermentação, uma vez que devido a sua baixa condutividade térmica, a madeira atua como isolante térmico. Dentro da caixa, havia um agitador orbital, responsável por manter a eficiência na agitação dos Erlenmeyers.

Contudo, observou-se que a utilização da caixa de madeira não surtia o efeito desejado, uma vez que o processo ficava muito à mercê do clima, fazendo com que a temperatura variasse demais ao longo do dia, mantendo-se distante dos 28 °C, temperatura ideal recomendada por Melani *et al.* (2019) para a condução da fermentação. Isso estava impactando diretamente na produção da enzima, que estava alcançando, no máximo, 3,1 U/mL. Quantidade insuficiente para realizar os estudos propostos nesse trabalho.

Para resolver o problema, inicialmente foi construído um datalogger de temperatura, dispositivo destinado a registrar as temperaturas de um local ou objeto ao longo de um intervalo de tempo. Para a construção do dispositivo utilizou-se um microcontrolador Arduino Uno, um sensor de temperatura e um módulo de cartão SD, com o cartão SD. Ele foi instalado no interior da caixa de madeira, permitindo assim medir a variação de temperatura experimentada pelos Erlenmeyers no interior da caixa, o que possibilitou tomar providências para corrigi-la.

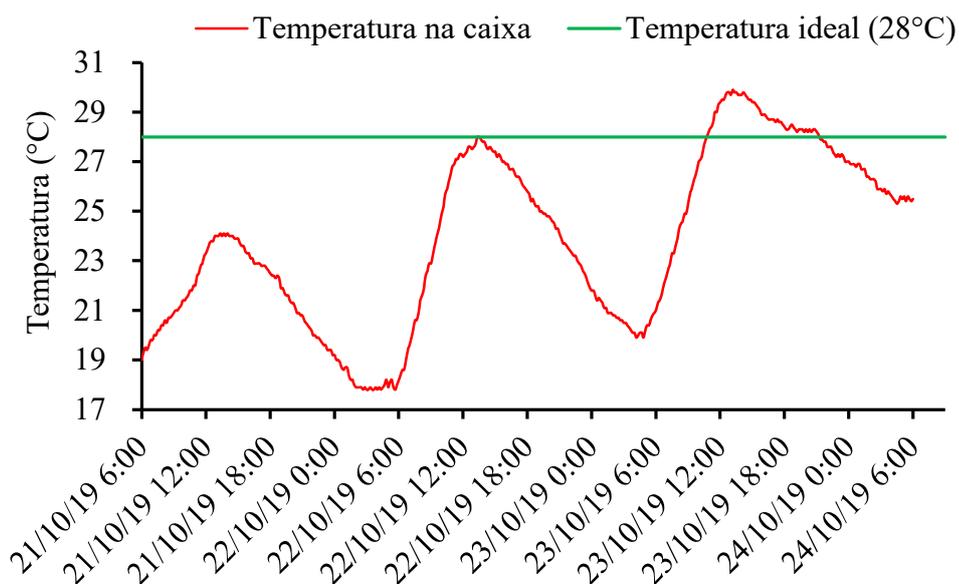
Deixou-se, então, o datalogger funcionando durante 3 dias seguidos (72h), registrando a temperatura no ambiente a cada 10 minutos. Os dados obtidos foram utilizados na construção do gráfico representado na Figura 3, que descreve o comportamento da temperatura no período analisado, assim como a reta que indica a temperatura ideal de 28 °C, indicada para o processo.

Como é possível observar a partir da análise da figura, nos dias analisados, a temperatura se manteve abaixo do esperado na maior parte do tempo, chegando, nas primeiras 24 horas, a estar 10 °C abaixo da temperatura ideal. Nas últimas 24 horas, porém, ela se manteve acima dos 28 °C desejáveis, alcançando, em alguns momentos, 30 °C.

Esta intensa variação de temperatura é prejudicial para o bom andamento do processo, já que Çalik *et al.* (2001) afirmam que a etapa de crescimento das bactérias é influenciada por uma série de reações enzimática complexas e não completamente entendidas

ainda, fazendo com que alterações na temperatura provoquem mudanças imprevisíveis nessas reações. Esse fato faz com que geralmente seja recomendado trabalhar com temperaturas constantes ao longo da fermentação, para dessa forma evitar efeitos inesperados, que vão impactar diretamente na síntese do bioproduto (Bhunia *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2009).

Figura 3 - Variação da temperatura no interior da caixa ao longo das 72 horas.



Tendo isso em mente, pensou-se em uma estratégia para manter a temperatura no interior da caixa o mais próximo possível de 28 °C. Sendo que os dados coletados com o datalogger permitiram verificar que o principal problema era temperaturas abaixo do valor desejado.

Construiu-se então o equipamento apresentado na Figura 2 do capítulo anterior para resolver o problema. O qual contava com um sensor de temperatura, que executava medições no interior da caixa a cada 30 segundos e essas informações eram utilizadas para definir se o aquecimento, conseguido através de uma pastilha termoelétrica, também conhecida como módulo Peltier, seria acionado ou não. Caso a temperatura registrada fosse menor ou igual a 27,8 °C, o aquecimento era acionado, através de um sinal enviado ao módulo relé, integrado ao Arduino. O aquecimento permanecia ligado até a temperatura registrada ser maior ou igual a 28,5 °C.

A temperatura de acionamento e de desligamento do aquecimento foram definidas através de métodos empíricos, levando em consideração o tempo que era necessário para a caixa trocar a quantidade de calor que era fornecida a cada vez que a pastilha era acionada.

A ventilação, por outro lado, que era conseguida pela ventoinha, ficava ligada direto, sendo importante para a homogeneização do ar interno e para a dissipação do calor, fornecido pelo módulo Peltier, no interior da câmara.

O dispositivo se mostrou capaz de manter a variação de temperatura menor ou igual a 1 °C. Esse melhor controle do processo mostrou-se positivo para a produção das enzimas, já que nos experimentos conduzidos após essa modificação foram obtidas produções de até 20,2 U/mL de enzimas, representando uma produção 6,5 vezes maior que a obtida sem o controle de temperatura.

Contudo, a produção obtida não pode ser considerada alta, uma vez que Contesini *et al.* (2017), afirmam que as produções de enzimas por bactérias do grupo *Bacillus subtilis*, comumente variam entre 55 e 578,5 U/mL, de acordo com a linhagem utilizada.

Hakim *et al.* (2018) afirmam que um fator que pode estar associado a menor produção de enzimas é a forma de condução dos experimentos, uma vez que fermentações conduzidas em biorreatores tendem a produzir de 2 a 2,5 vezes mais enzimas do que as realizadas em frascos agitados.

A variação de temperatura após a adoção do novo sistema, embora pequena, também pode ser vista como uma causa em potencial para a produção alcançada, visto a importância que é dada para esse parâmetro na literatura. Contudo, especificamente para bactérias do gênero *Bacillus Subtilis*, Sharma *et al.* (2017) identificaram que essa bactéria apresenta significativa variação de temperatura ideal para a produção de proteases, de acordo com a linhagem utilizada. Os valores de temperatura ideal variam desde 28 até 70 °C, sendo, porém, 37 °C a temperatura mais recorrente.

Esse fato leva a crer que bactérias desse gênero são capazes de suportar pequenas variações na temperatura durante seu desenvolvimento, principalmente se a variação for próxima de 37 °C, faixa comum e recorrente nessa espécie.

Levando tudo isso em conta, a produção obtida é satisfatória, uma vez que o objetivo desse trabalho foi caracterizar a enzima e avaliar o impacto da precipitação em sua recuperação, de modo que a otimização da produção das enzimas não foi um dos objetivos dessa pesquisa. Além disso, autores como Soares *et al.* (2011), Gimenes (2018) e Santos (2019) reportam resultados positivos ao realizar precipitações de proteases presentes em concentrações menores que 20 U/mL no extrato enzimático.

4.2 PRECIPITAÇÃO DA ENZIMA

A etapa de pré-purificação foi executada logo em seguida a produção das enzimas. Diversas são as técnicas disponíveis para serem utilizadas na etapa inicial da purificação, devendo as características do meio serem observadas para orientar a escolha. Tendo-se em mente que o objetivo dessa etapa é recuperar a enzima, já que ela encontra-se diluída em um meio geralmente complexo (Harrison, 2014).

De acordo com Bhunia *et al.* (2012), uma das grandes vantagens dos *Bacillus*, especialmente do gênero *Bacillus subtilis*, é o fato de produzirem enzimas extracelulares, o que garante baixa concentração de contaminantes no caldo fermentado, já que não é necessário romper as células. Além disso, Contesini *et al.* (2017) afirmam que o menor período de crescimento requerido por essas bactérias colabora para a redução de contaminantes.

Desse modo, a técnica escolhida para a concentração das proteases foi a precipitação, uma vez que é uma técnica flexível, sendo capaz de, simultaneamente, concentrar as proteínas e também purificá-las, visto que a concentração de impurezas tende a ser baixa. Ademais, essa técnica é vastamente reportada na literatura para a purificação de proteases (Sathishkumar *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2019; Farhadian *et al.*, 2015; Marathe *et al.*, 2018).

O primeiro passo da etapa de precipitação foi definir qual agente precipitante seria mais apropriado para essas enzimas. Selecionou-se, então, quatro agentes para serem testados. O primeiro deles foi o sulfato de amônio, esse sal foi escolhido por ser o sal mais recomendado para precipitação de proteases pela literatura (Bhunia *et al.*, 2012; Contesini *et al.*, 2017; Sathishkumar *et al.*, 2015).

Os outros três agentes precipitantes foram solventes orgânicos, pois de acordo com Englard e Seifter (1990) acetona, etanol e metanol são os três solventes orgânicos mais adequados para precipitação de proteínas.

Os resultados obtidos com os ensaios de precipitação utilizando acetona, metanol, etanol e sulfato de amônio como agentes precipitantes, encontram-se nas Tabelas 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

Dentre os agentes testados, metanol e acetona não forneceram bons resultados, pois, como é possível observar nas Tabelas 10 e 11, ambos apresentaram baixos valores de recuperação da atividade específica, rendimento e fator de purificação, não sendo boas opções para a recuperação dessa enzima em especial.

Tabela 10 – Precipitação fracionada com acetona.

Concentração de acetona (%)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
0	27,44 ± 2,18	-	-	-
20	9,09 ± 1,09	5,01	0,33	15,12
40	20,19 ± 3,23	14,01	0,74	19,03
60	20,28 ± 2,89	16,68	0,74	22,57
80	7,20 ± 1,13	4,07	0,26	15,53

Tabela 11 – Precipitação fracionada com metanol.

Concentração de metanol (%)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
0	29,25 ± 1,97	-	-	-
20	35,81 ± 3,44	13,66	1,22	11,16
40	34,84 ± 3,12	14,83	1,19	12,45
60	36,24 ± 2,89	13,06	1,24	10,54
80	27,23 ± 2,23	11,55	0,93	12,40

Tabela 12 – Precipitação fracionada com etanol.

Concentração de etanol (%)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
0	26,99 ± 1,57	-	-	-
20	12,71 ± 1,31	12,15	0,47	25,81
40	23,25 ± 2,12	6,84	0,86	7,94
60	45,91 ± 3,48	19,20	1,70	11,29
80	10,15 ± 1,19	3,98	0,38	10,59

Tabela 13 – Precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Concentração de sulfato de amônio (%)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
0	25,47 ± 1,62	-	-	-
20	19,97 ± 2,05	6,56	0,78	8,37
40	28,08 ± 2,57	8,95	1,10	8,12
60	24,25 ± 1,49	23,63	0,95	24,82
80	40,52 ± 3,31	44,78	1,59	28,15

Outro ponto negativo desses agentes é que a recuperação da atividade obtida não se concentra em uma única faixa de saturação do agente precipitante, mas sim se divide ao longo do procedimento. Isso prejudica a concentração da enzima, já que ela aparece em diversas concentrações diferentes dos agentes, reduzindo a capacidade de concentração da técnica. Contudo, o resultado é compreensível, já que há poucos trabalhos reportando sucesso utilizando metanol ou acetona na recuperação de proteases de *Bacillus*.

Dentre os solventes orgânicos utilizados, o etanol é o mais recomendado na literatura para a precipitação de proteases (Thakur *et al.*, 2018; Wahab e Ahmed, 2018). Contudo, os resultados com etanol também não foram satisfatórios, conforme apresentado pela Tabela 12, pois embora tenha tido recuperação um pouco maior que os outros dois, ele também se mostrou pouco seletivo, de modo que a enzima foi recuperada em duas frações não sucessivas (20 e 60%). Além disso, os três solventes orgânicos parecem ter provocado uma inibição da atividade da enzima, uma vez que a atividade recuperada foi menor que 100% em todos eles.

A análise da Tabela 13 permite concluir que o melhor agente precipitante, dentre os utilizados, para as enzimas estudadas foi o sulfato de amônio, pois foi o que apresentou melhor seletividade e recuperação, uma vez que grande parte da atividade é recuperada na fração de 80% de saturação do sal.

Porém, embora tenha ficado claro que a fração de 80% foi a melhor para a recuperação da enzima, é possível notar que a fração de 60% contém uma quantidade significativa de enzimas. Assim sendo, como já se definiu o sulfato de amônio como o melhor agente precipitante para a enzima estudada, buscou-se, através de cortes na precipitação, encontrar a faixa ideal de saturação desse sal para essa enzima, e assim obter a maior recuperação possível nessa etapa.

O primeiro corte realizado foi feito de 0 a 50%, em uma única etapa, e depois seguiu-se até 100% de saturação variando-se de 5 em 5%, isso permitiu identificar com maior precisão o intervalo ideal de saturação para uma maior recuperação dessa enzima. Em seguida, realizou-se o segundo corte, apresentado na Tabela 14, que foi feito para isolar a faixa entre 55 e 90%, em que se observou maior recuperação da enzima.

Tabela 14 – Precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Concentração de sulfato de amônio (%)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
0	26,01 ± 1,78	-	-	-
55	18,35 ± 1,34	26,62	0,71	37,73
90	47,00 ± 3,62	58,12	1,81	32,17

Observando a Tabela 14, é possível notar que o corte na saturação de sulfato de amônio na faixa de 55 a 90% permitiu recuperar 58,12% de atividade da enzima, forneceu um fator de purificação de 1,81 e um rendimento, nessa fração, de 32,17%. Isso leva a concluir que, embora tenha sido eficaz em concentrar a enzima, a técnica de precipitação não se mostrou capaz de purificá-la, uma vez que o fator de purificação foi baixo e a quantidade de proteínas na fração foi elevada.

Contudo, os resultados obtidos estão condizentes com os encontrados por outros autores na literatura, já que Pant *et al.* (2015) Sathishkumar *et al.* (2015), Farhadian *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2000), também utilizaram a precipitação com sulfato de amônio como técnica de concentração para purificar proteases provenientes de *Bacillus subtilis*, sendo necessário, em seguida, utilizar técnicas cromatográficas para alcançar elevadas purificações.

Ademais, Sathishkumar *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2000) reportaram, na etapa de precipitação de proteases com sulfato de amônio, valores de recuperação próximos ao encontrado nesse trabalho, sendo de 58,69% e 71%, respectivamente.

4.2.1 Influência da concentração inicial da enzima

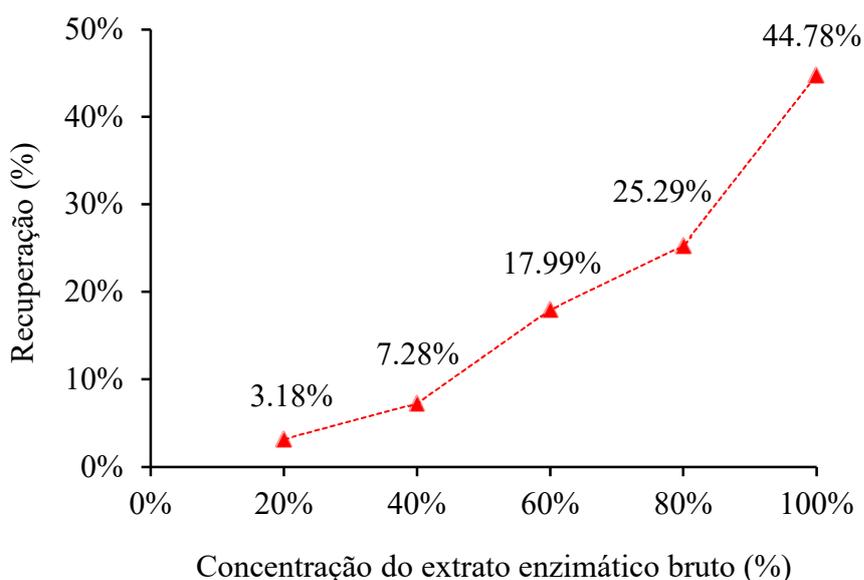
Como foi possível verificar na Tabela 14, mesmo após realizar cortes na precipitação e aumentar a quantidade recuperada de enzima, é possível notar que parte da

atividade proteolítica é perdida ao longo do processo, já que a atividade enzimática total recuperada ao final do experimento é de aproximadamente 85%.

Para investigar uma possível causa dessa perda de atividade realizou-se o estudo da influência de baixas concentrações iniciais de enzima no processo de recuperação. Já que alguns autores como Shih *et al.* (1992) e Pinheiro *et al.* (2016) sugerem que a composição do precipitado é afetada pela concentração inicial da biomolécula estudada, ademais do tipo de agente precipitante utilizado.

Após a realização das precipitações com soluções enzimáticas diluídas serem realizadas, os valores de recuperação em cada procedimento foram utilizados para construir o gráfico apresentado na Figura 4, que relaciona a recuperação na fração de 80% de cada experimento, que é a fração de maior recuperação, com a concentração inicial de enzimas utilizada (20, 40, 60 ou 80%), determinada previamente.

Figura 4 - Recuperação em função da concentração inicial de enzimas.



Após a análise da figura, foi possível concluir que a recuperação das proteases produzidas aumenta na medida que a concentração inicial de enzimas também aumenta, de modo que na fração de 100%, ou seja, com o extrato enzimático utilizado sem diluição alguma, ele atinge o máximo de 44,78%.

Esse fato pode estar relacionado com as condições básicas apresentadas por Forciniti (2008) para que a precipitação ocorra, sendo, segundo o autor, necessário que o pH

esteja próximo do pI da biomolécula e também que haja uma concentração suficiente da enzima para que haja precipitação.

Além disso, os estudos conduzidos por Pinheiro *et al.* (2016), Watanabe *et al.* (2009) e Shih *et al.* (1992) deixam claro que há alguns fatores como a concentração inicial de proteínas no meio, interações do agente precipitante escolhido com a biomolécula alvo e também o equilíbrio de fases durante o experimento, que podem interferir negativamente no processo de precipitação, reduzindo a recuperação.

Ademais, é importante destacar que autores como Pant *et al.* (2015) e Farhadian *et al.* (2015), que também utilizaram precipitação com sulfato de amônio para recuperar proteases provenientes de *Bacillus subtilis*, reportaram recuperações acima de 91%, na fração de maior recuperação, sendo que no caso de Pant *et al.* (2015), ela passa de 100%. E coincidentemente ambos reportaram altas produções de enzimas, sendo maiores que 236 U/mL. Esse fato ajuda a corroborar o argumento de que uma alta produção é fundamental para uma alta recuperação enzimática.

Contudo, para identificar até que ponto a concentração inicial influencia no processo, seria necessário conhecer as proteínas que compõem o meio e avaliar a influência de cada uma delas, de maneira análoga ao que foi feito por Pinheiro *et al.* (2016), enquanto estudava a enzima lisozima, avaliando a concentração de proteínas totais, o efeito na solubilidade da enzima e o coeficiente de partição da solução.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

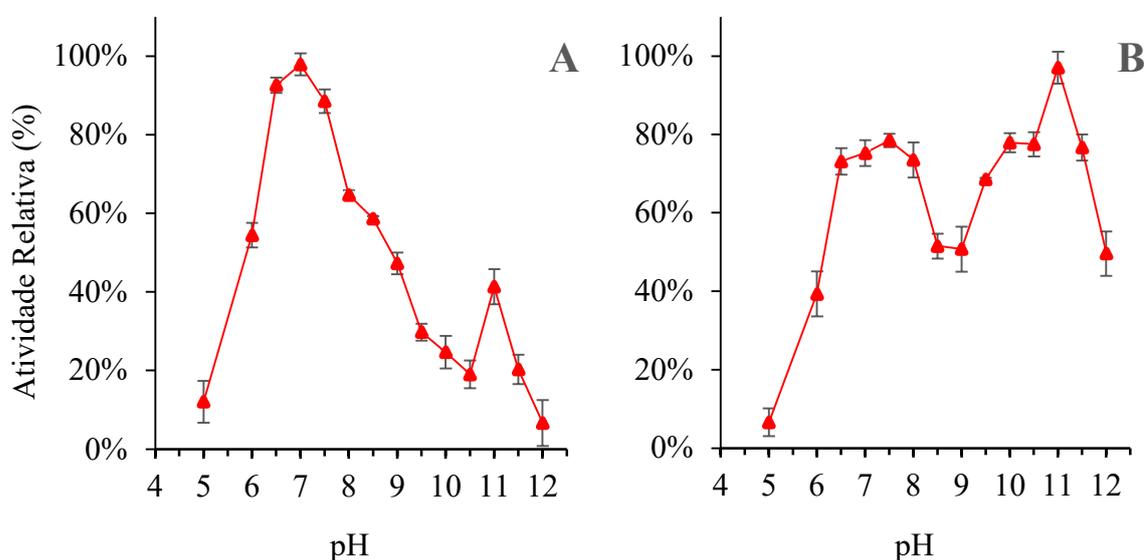
A etapa final do trabalho compreendeu a caracterização bioquímica das enzimas, uma vez que, não há relatos na literatura sobre esse estudo para as proteases produzidas pela linhagem de bactérias utilizadas nesse trabalho.

4.3.1 Efeito do pH na atividade enzimática

O primeiro parâmetro em que a enzima foi testada foi o pH. Após a determinação da atividade enzimática residual da enzima, depois da incubação em diversos valores de pH entre 5 e 12, os resultados foram utilizados para calcular a atividade relativa e dispostos em forma gráfica, na Figura 5, visando demonstrar a influência do pH no extrato enzimático bruto (A) e também no extrato enzimático pré-purificado (B).

Como é possível notar, o pH ideal obtido para o extrato enzimático bruto é 7. Contudo, para o extrato enzimático pré-purificado, o valor do pH ideal foi de 11 resultado mais condizente com o reportado pela literatura, já que as proteases obtidas através de bacilos tendem a ser alcalinas (Gupta *et al.*, 2003). É possível notar também, que já no gráfico referente ao extrato bruto, existia um aumento da atividade no pH 11, que não obedecia o padrão de decrescimento da figura nessa região. O processo de precipitação, ao qual o extrato pré-purificado foi submetido, intensificou essa região, devido à concentração das enzimas e diminuição de proteínas interferentes.

Figura 5 - Influência do pH no extrato bruto (A) e no extrato pré-purificado (B).

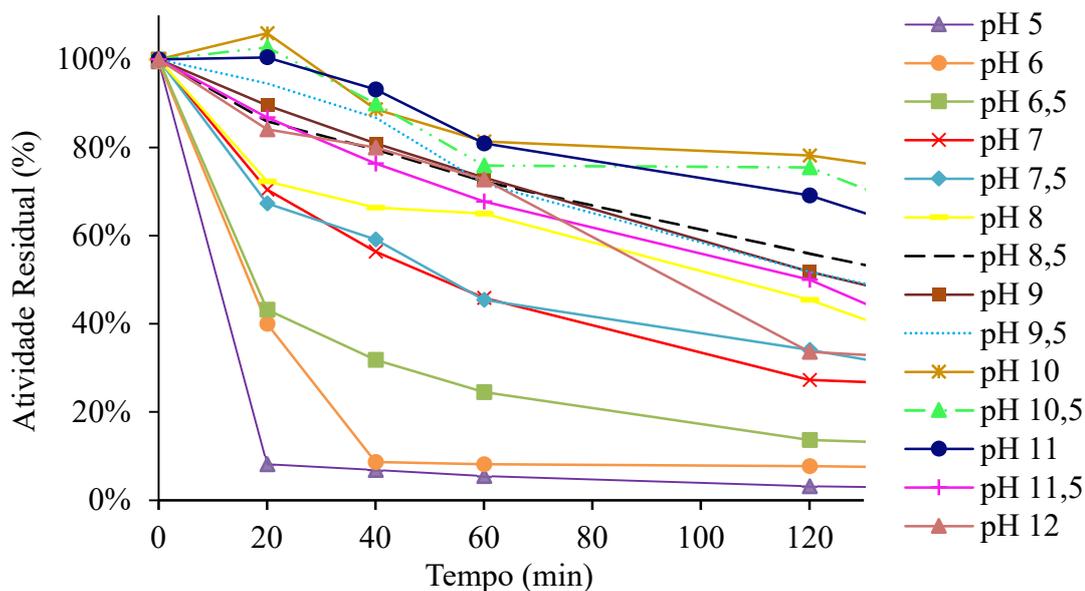


Sathishkumar *et al.* (2015) e Hakim *et al.* (2018) reportam valor de pH ideal de 9, enquanto Ahmed *et al.* (2011) obtiveram pH ótimo de 10 para proteases provenientes de *Bacillus Subtilis*. Hakim *et al.* (2018) afirmam ainda que as proteases provenientes de bacilos têm o pH ideal geralmente entre 8 e 12, variando de acordo com o substrato utilizado.

Para os estudos de estabilidade frente ao pH foi utilizado apenas o extrato pré-purificado. Dessa forma, obteve-se o gráfico da Figura 6, em que são mostrados os perfis de atividade residual das enzimas ao longo de 2 horas, para cada pH testado.

Embora o experimento tenha durado 6 horas, são apresentados dados referentes apenas as 2 horas iniciais, pois após esse período a atividade da enzima foi perdida em grande parte dos valores de pH testados.

Figura 6 - Estabilidade da enzima pré-purificada em relação à variação de pH.



De acordo com a figura, é possível identificar a faixa de pH entre 10 e 11 como a que a enzima apresenta maior estabilidade para o intervalo de tempo estudado. Além de apresentar mais de 100% de atividade nos primeiros 20 minutos, mantendo cerca de 80% dessa atividade após duas horas, ela reteve mais de 60% da atividade inicial após as 6 h. Esse fato evidencia o potencial de aplicação dessas enzimas na indústria de detergentes, já que enzimas resistentes à altos valores de pH são importantes nesse setor, de acordo com Gupta *et al.* (2003).

Na faixa de pH de 5 a 6,5 e de 11,5 a 12, por outro lado, a enzima apresentou rápida perda de atividade. Nos valores de pH entre 7 e 9,5 a perda foi lenta, porém, ao final das 6 h, ela reteve pouco mais de 20% da atividade em todos esses casos.

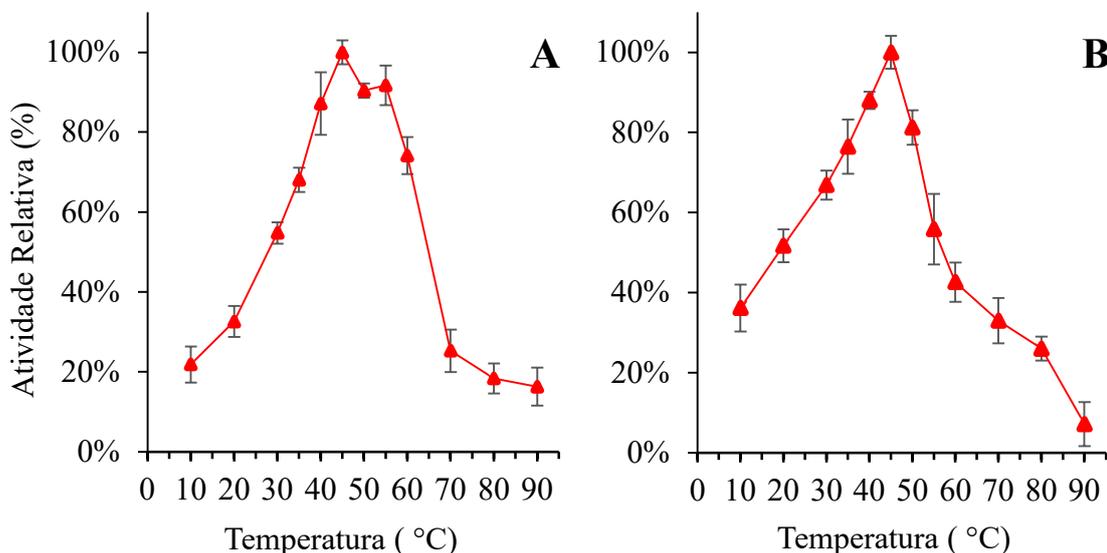
Assim, a faixa de estabilidade encontrada para a enzima estudada foi baixa, tornando sua aplicação mais específica. Uma vez que, Sathishkumar *et al.* (2015) reportam maior estabilidade, ao trabalhar com proteases provenientes do mesmo gênero de bactérias, estando estáveis num intervalo de pH entre 6 e 12. De modo análogo, Hakim *et al.* (2018), relatam atividade no intervalo de pH entre 7 e 12. Porém ambos os autores purificaram completamente a enzima antes dos testes, podendo isso influenciar na comparação.

4.3.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Tendo definido o pH ideal para essa enzima foi feita a caracterização em relação à temperatura. A atividade relativa foi obtida a partir da atividade residual, da mesma forma que

no cálculo do pH. A Figura 7, mostra a influência da temperatura sobre a enzima.

Figura 7 - Influência da temperatura no extrato bruto (A) e no extrato purificado (B).



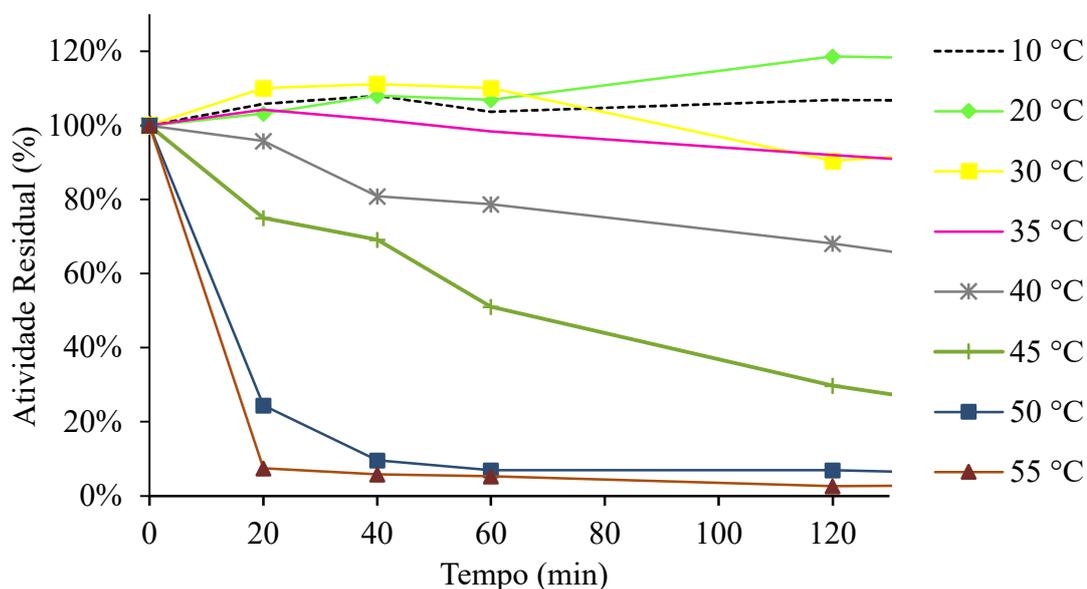
Conforme apresentado na figura, a temperatura ideal encontrada para a máxima atividade da enzima estudada no extrato bruto é 45 °C. Ao contrário do pH, o processo de pré-purificação não alterou a temperatura ideal, de modo que ela permaneceu em 45 °C após a pré-purificação.

Os resultados obtidos concordam com a literatura, já que Farhadian *et al.* (2015) também encontraram temperatura ideal de 45°C para proteases de bactérias do mesmo gênero. Sathishkumar *et al.* (2015), Patel *et al.* (2019) e Yang *et al.* (2000) que também trabalharam com *Bacillus subtilis*, encontraram temperaturas de 50, 40 e 50 °C, respectivamente.

Já para os estudos de estabilidade em relação à temperatura foi utilizado apenas o extrato pré-purificado. Assim, foi construído o gráfico da Figura 8, em que os perfis de atividade residual por temperatura, após a incubação por períodos de 6 h, são apresentados.

A análise da figura revela que a melhor faixa de estabilidade para a enzima está entre 10 °C e 35 °C, de modo que nesse intervalo, a enzima se manteve ativa durante as 6 horas de experimento, alcançando ao final, na temperatura de 20 °C, 125% de atividade residual. Esses resultados novamente direcionam as proteases obtidas para a indústria de detergentes, visto que, em conformidade com Gupta *et al.* (2003) uma exigência desse setor são enzimas que mantenham alta atividade mesmo em baixos valores de temperaturas de lavagem, por volta de 10 a 20 °C.

Figura 8 - Estabilidade da enzima pré-purificada em relação à variação de temperatura.



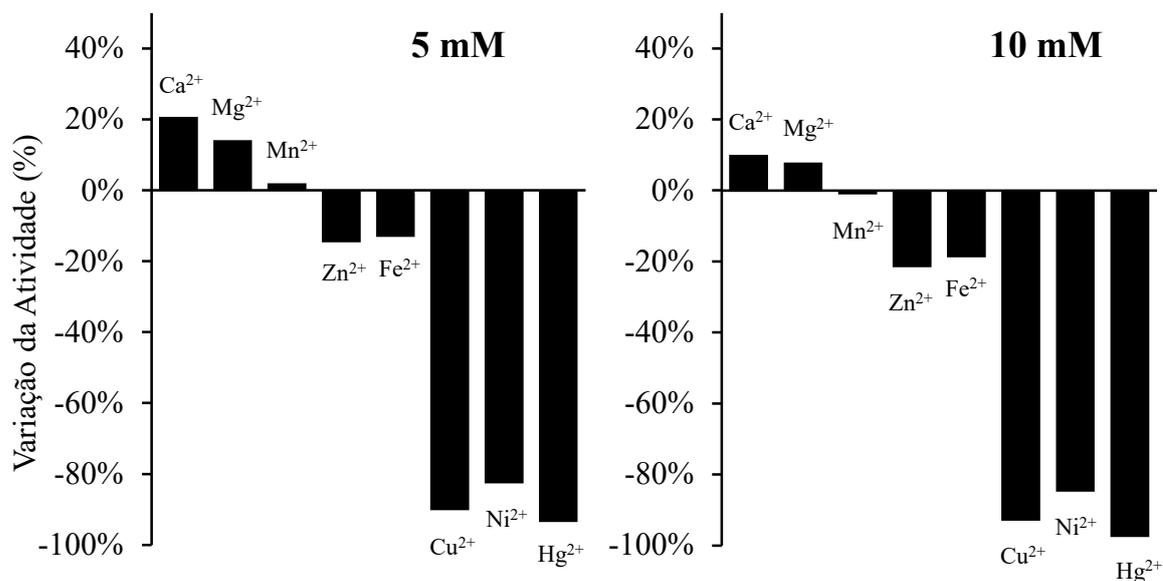
Nas temperaturas entre 40 °C e 55 °C, por outro lado, a atividade foi perdida ao longo do período de incubação, de modo que quanto maior a temperatura, mais rápido a enzima era inativada. Na temperatura de 60 °C e nas superiores, a enzima sofreu inativação logo nos primeiros 20 minutos, o que fez com que esses perfis não fossem incluídos na Figura 8. Isso deixa claro que as proteases aqui estudadas não são termoestáveis.

Para proteases oriundas de microrganismos do mesmo gênero, Yang *et al.* (2000) e Patel *et al.* (2019) reportam estabilidade semelhante à obtida, estando estável no intervalo de 25 a 50 °C e de 20 a 60°C, nessa ordem. Sathishkumar *et al.* (2015) e Farhadian *et al.* (2015) todavia, reportando maior faixa de estabilidade, de maneira que as enzimas por eles estudadas mantiveram-se ativas de 70 a 85 °C, respectivamente. Entretanto, vale destacar que ambos trabalharam com enzimas termoestáveis.

4.3.3 Efeito de íons metálicos na atividade enzimática

A influência de 8 íons metálicos foi investigada nas proteases obtidas, eles foram utilizados em duas concentrações diferentes. Após a incubação de uma hora a atividade proteolítica foi determinada e os resultados utilizados para se obter a variação percentual relativa da atividade enzimática, provocada pelos íons em solução. Os resultados obtidos estão na Figura 9.

Figura 9 - Efeito dos íons metálicos na enzima pré-purificada.



Como é possível observar, grande parte dos íons testados provocou inibição da atividade da enzima. Sendo os íons de mercúrio, cobre e níquel os que causaram maiores reduções, alcançando, no caso do mercúrio, quase 100%. Da mesma maneira, os íons de zinco e ferro também provocaram diminuição da atividade proteolítica, porém de forma mais sutil, alcançando aproximadamente 25% para os íons de zinco, quando presentes na concentração de 10 mM.

Diversos artigos relatam a forte inibição da atividade de proteases, provenientes de *Bacillus subtilis*, por íons dos metais mercúrio, cobre e níquel, dentre eles destacam-se Farhadian *et al.* (2015) e Patel *et al.* (2019). Da mesma maneira, íons de zinco e ferro também são reportados como inibidores moderados de atividade por Sathishkumar *et al.* (2015), Thakur *et al.* (2018) e Hakim *et al.* (2018).

Por outro lado, é possível identificar ainda, na Figura 9, que os íons de cálcio e magnésio aumentaram a atividade da enzima, enquanto os íons de manganês mostraram-se praticamente sem influência sobre a atividade das proteases estudadas. Íons de cálcio e magnésio são reportados por todos os autores acima citados como positivos para a atividade das enzimas, garantindo, em média, um aumento de 20% da atividade proteolítica, quando presentes na concentração de 5 mM.

O aumento da concentração dos íons metálicos de 5 mM para 10 mM causou, de forma geral, uma pequena diminuição da atividade da enzima, até mesmo nos íons de cálcio e

magnésio, tidos anteriormente como positivos. Sathishkumar *et al.* (2015) reporta o mesmo efeito de inibição ao aumentar a concentração dos íons ferro e zinco de 0,1 mM para 5 mM.

4.3.4 Efeito dos surfactantes e do inibidor na atividade enzimática

Dois surfactantes e um inibidor conhecido foram escolhidos para ter sua influência na protease pré-purificada verificada. Eles estavam presentes em duas concentrações (5 mM e 10 mM) nas soluções enzimáticas. Após a incubação de uma hora, e a posterior determinação da atividade proteolítica, foi calculada a atividade residual da enzima e os resultados obtidos foram utilizados para construir a Tabela 15 em que a atividade residual de cada um dos reagentes é comparada com um controle, que embora também tenha sido incubado por uma hora, não recebeu nenhum dos reagentes.

Tabela 15 – Efeito do inibidor e dos surfactantes na atividade da enzima pré-purificada.

Inibidor	Atividade Residual (%)	
	5 mM	10 mM
Controle	100,00%	100,00%
Triton X-100	38,33% ± 0,850%	15,00% ± 0,408%
SDS	86,33% ± 0,624%	82,00% ± 1,080%
EDTA	14,00% ± 0,408%	5,83% ± 0,471%

De acordo com a tabela acima, a enzima foi fortemente inibida pelo EDTA, principalmente quando a concentração do sal foi aumentada para 10 mM. De modo análogo, o surfactante Triton X-100 mostrou-se prejudicial para a atividade da protease estudada, já que mesmo na menor concentração testada, inibiu 62% da sua atividade. Embora o surfactante SDS também tenha inibido parte da atividade da enzima, essa inibição foi bem menor, fazendo com que, mesmo em concentrações de 10 mM, a enzima mantivesse mais de 80% de sua atividade.

Patel *et al.* (2019) e Sathishkumar *et al.* (2015) também reportam baixa inibição, por SDS, das proteases que estudaram. De acordo com os autores, as enzimas mantiveram, em ambos os casos, 85% da atividade após os experimentos. Já para o surfactante Triton X-100 Sathishkumar *et al.* (2015) reporta inibição de 38% da atividade, assim como Farhadian *et al.* (2015) obteve 29% de inibição com o mesmo agente. Os autores também observaram aumento da inibição quando a concentração do surfactante era aumentada.

Os efeitos inibidores do sal EDTA também foram observados por outros autores. Thakur *et al.* (2018) relata apenas 21% de atividade restante após incubar proteases de *Bacillus subtilis* com o sal. Da mesma forma, Patel *et al.* (2019) obteve 84% de inibição da atividade da enzima que estudou pelo sal.

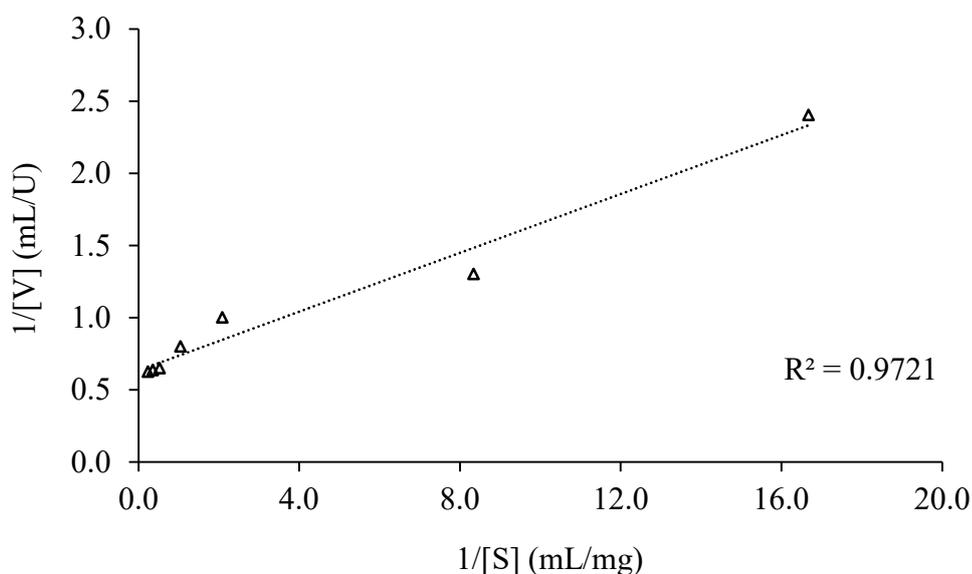
4.3.5 Parâmetros cinéticos

O último fator avaliado na caracterização das proteases foram os parâmetros cinéticos e para obtenção de tais parâmetros foi necessária a construção da curva de saturação enzimática. A construção dessa curva mostra a relação entre a concentração de substrato [S] e a velocidade da reação [V]. Como era esperado, a curva obtida foi a típica curva hiperbólica.

Ela sugere, de acordo com Singh, Gupta e Bajaj (2017) que a curva segue a cinética de Michaelis-Mentel. Assim sendo, utilizou-se a representação de duplo recíproco de Lineweaver-Burk para linearizar a curva e obter os valores de K_m e V_{max} , principais parâmetros utilizados para avaliar a cinética de uma enzima.

A Figura 10, apresenta a curva linearizada, com seu respectivo coeficiente de determinação.

Figura 10 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a enzima estudada.



Os valores obtidos para K_m e V_{max} foram de 0,1605 mg/mL (0,06688 mM) e 1,5755 U/mL, respectivamente. Os resultados estão em concordância com os encontrados por

outros autores que também utilizaram azocaseína como substrato. Abu-Khudir *et al.* (2019) descrevem K_m de 0,68 mg/mL e V_{max} de 166,66 nmol/mL/h, assim como Da Silva *et al.* (2018) relatam K_m de 0,434 mg/mL e V_{max} de 7,739 mg/mL/min. Gimenes (2018), por outro lado, conseguiu um K_m de 0,0318 mM e V_{max} de 24,45 U/mL. Dorra *et al.* (2018) afirma ainda que, para experimentos utilizando azocaseína como substrato, proteases tendem a apresentar um valor de K_m entre 0,08 e 5,1 mg/mL.

Enquanto V_{max} indica a concentração em que todos os sítios ativos da enzima estão ocupados com substrato, evidenciando assim a taxa máxima de reação, o valor de K_m representa a concentração de substrato em que se observa uma velocidade de reação igual a metade do valor de V_{max} . Assim sendo, os baixos valores obtidos para K_m indicam alta afinidade pelo substrato utilizado.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

A protease obtida através da linhagem de *Bacillus subtilis* aqui estudada mostrou-se promissora para a elaboração de detergentes industriais, devido às características bioquímicas encontradas. Ela exibiu alta estabilidade na faixa de temperatura entre 10 e 35 °C e elevada atividade nos valores de pH entre 10 e 11. Além disso, a enzima manteve mais de 80% de sua atividade na presença do surfactante SDS.

A máxima produção alcançada nas fermentações foi de 20,2 U/mL e foi suficiente para realização dos estudos de precipitação propostos. De modo que o sulfato de amônio mostrou-se o agente precipitante mais eficaz, dentre os testados, para a concentração da enzima estudada, oferecendo uma recuperação de 58% da atividade e um fator de purificação de quase duas vezes.

Os estudos de precipitação permitiram ainda identificar uma relação entre a concentração inicial de enzimas e a recuperação da enzima obtida, porém para uma melhor compreensão do fenômeno é necessário realizar outros estudos, visando determinar até que ponto a concentração inicial de enzimas altera os resultados.

CAPÍTULO 6

6. TRABALHOS FUTUROS

Abaixo são apresentadas, em forma de tópicos, sugestões para futuras pesquisas envolvendo as proteases produzidas pela linhagem de bactérias utilizada:

- Estudar minuciosamente as características relacionadas à produção da enzima, abrangendo tanto as fontes de nutrientes como fatores físico-químicos, com o objetivo de aumentar a produção, pensando numa possível ampliação de escala;
- Verificar a influência da concentração inicial de proteínas no processo de precipitação, assim como obter o seu coeficiente de partição e estudar sua solubilidade durante a precipitação;
- Executar a caracterização da enzima após purificá-la até um grau de pureza comercial. Para averiguar se há alterações nos parâmetros ideais aqui reportados;
- Testar o efeito que solventes orgânicos e detergentes industriais exercem sobre a enzima, com o intuito de direcionar melhor seu ramo ideal de aplicação;
- Obter os parâmetros cinéticos dessa enzima utilizando outros substratos, como a caseína e a gelatina, e depois compará-los com os obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-KHUDIR, R.; SALEM, M. M.; ALLAM, N. G.; ALI, E. M. M. Production, partial purification, and biochemical characterization of a thermotolerant alkaline metallo-protease from *Staphylococcus sciuri*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n.1, p. 87-102, 2019.

AHMED, I.; ZIA, M. A.; IQBAL, H. M. Purification and kinetic parameters characterization of an alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* through Submerged Fermentation Technique. **World Applied Sciences Journal**, v. 12, n. 6, p. 751-757, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. (2004) Módulo IV Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. SEPN 515, Edifício Omega. Bloco B, Brasília (DF), CEP 70770-502 1. Ed. 2004.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. 2, p. 253-262, 2018.

ANWAR, A., SALEEMUDDIM, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n.3, p. 175-183, 1998.

BELL, D.; HOARE, M.; DUNNILL, P. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. Springer: Berlin/Heidelberg, v. 26, p.1-72, 1983.

BENMRAD, M. O.; MOUJEHED, E.; ELHOUL, M. B.; MECHRI, S.; BEJAR, S.; ZOUARI, R.; BAFFOUN, A.; JAOUADI, B. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. **International Journal of Biological macromolecules**, v. 119, p. 1002-1016, 2018.

BERNSTEIN, L. I. Enzyme allergy in populations exposed to long-term, low-level concentrations of household laundry products. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 49, n. 4, p. 219-237, 1972.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp.* **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 448-457, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. Química verde no Brasil: 2010-2030. Brasília, DF : 438p. 2010.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 821-846, 2000.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A Colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2017.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M. G.; OBREGÓN, W. D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, 110398, 2020.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; JUNIOR, W. T. V. HIV - Recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Quím. Nova**, vol. 31, n. 8, p. 2111-2117, 2008.

ÇALIK, P.; ÇALIK G.; ÖZDAMAR H. T. Bioprocess development for serine alkaline protease production: A review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 17, p. 1-62, 2001.

DAROIT, D.; CORRÊA, A.; CANALES, M.; COELHO, J., HIDALGO M.; TICHOTA, D. M.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p.335-351, 2012.

DA SILVA, O. S.; DE ALMEIDA, E. M.; DE MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1081-1088, 2018.

DEWAN, S. S. Global markets for enzymes in industrial applications. Wellesley, USA.: Market Research Reports, 2018.

DORRA, G.; INES, K.; IMEN, B. S.; LAURENT, C.; SANA, A.; OLFA, T.; PASCAL, C.; THIERRY, J.; FERID, L. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 342-351, 2018.

DOS SANTOS, R.; CARVALHO, A. L.; ROQUE, A. C. A. Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 41-50, 2017.

EHRHARDT, D. D. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como Substrato. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2015. p. 72 Dissertação (Mestrado).

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: (Ed.). **Guide to protein purification**. San Diego, USA.: Academic Press - Deutscher, 1990.

FARHADIAN, S.; ASOODEH, A.; LAGZIAN, M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 51-58, 2015.

FERNANDES, J. Produção de queijos: Origem dos coalhos. **AGROTEC - Revista técnico-científica agrícola**, n. 8, p. 101-102, 2013.

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004. p. 67. Dissertação (Mestrado).

FLINDT, M. L. H. Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus Subtilis* containing proteolytic enzyme. **The Lancet**, v. 293, n. 7607, p. 1177-1181, 1969.

FORCINITI, D.; **Industrial Bioseparations: Principles and Practice**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008.

GAGNON, P. Technology trends in antibody purification, **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 57-70, 2012.

GIMENES, N. C. Purificação e caracterização de protease de *Aspergillus terreus* VSP-22. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2018. p. 111. Dissertação (Mestrado).

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream process and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2003.

HAKIM, A.; BHUIYAN, F. R.; IQBAL, A.; EMON, T. H.; AHMED, J.; AZAD, A. K. Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. **Heliyon**, v. 4, n. 6, p. 2405-8440, 2018.

HAMMAMI, A.; FAKHFAKH, N.; ABDELHEDI, O.; NASRI, M.; BAYOUDH, A. Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 56-68, 2018.

HARRISON, R. G. Bioseparation Basics. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 110, n. 10, p. 36-42, 2014.

HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. **Isolation and Purification of Proteins**. 1. Ed. New York: Marcel Dekker, 2003.

HELAL, M. M. I.; AMER, H.; ABDELWAHED, N. A. M.; GHOBASHY, M. O. I. Physiological and microbiological studies on purification of alkaline protease from locally isolated *Bacillus subtilis*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 193-203, 2012.

HMIDET, N.; ALI, N. E.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S. K.; NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1–3, p. 71-79, 2009.

IBRAHIM-GRANET, O.; BERTRAND, O. Separation of proteases: old and new approaches. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 684, n. 1–2, p. 239-263, 1996.

JÖNK, M. W.; TODESCATO, D.; MAASS, D.; OLIVEIRA, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Estudo de meio de cultura para *Bacillus subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. Em: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014, v. 1, n. 2, p. 2121-2128. São Paulo: Blucher, 2015.

JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L.; FEITOSA, V. A.; BREYER, C. A.; CARDOSO, S. L.; MAZZOLA, P. G.; NASCIMENTO, L. O.; RANGEL-YAGUI, C. O.; MAGALHÃES, P. O.; OLIVEIRA, M. A.; PESSOA, A. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 51-63, 2016.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262-276, 2011.

KIM, M.; SI, J-B.; REDDY, L.V.; WEE, Y-J. Enhanced production of extracellular proteolytic enzyme excreted by a newly isolated *Bacillus subtilis* FBL-1 through combined utilization of statistical designs and response surface methodology. **RSC Advances**, v. 6, p. 51270-51278, 2016.

LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. (Org.). **A figueira**. São Paulo: Editora Unesp, 2011. ISBN 9788539301874 Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/113695>>. Acesso em: 23 fev. 20.

LI, Y.; STERN, D.; LOCK, L. L.; MILLS, J.; OU, S.; MORROW, W.; XU, X.; GHOSE, S.; LI, Z. J.; CUI, H. Emerging biomaterials for downstream manufacturing of therapeutic proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 95, p. 73-90, 2019.

LI, Z.; SCOTT, S.; HEMAR, Y.; ZHANG, H.; OTTER, D. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food Chemistry**, v. 256, p. 228-234, 2018.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Vol. 3 - Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001.

MARATHE, S. K.; VASHISTHT, M. A.; PRASHANTH, A.; PARVEEN, N.; CHAKRABORTY, S.; NAIR, S. S. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 2018.

MCAULIFFE, J.C. (2012) Industrial Enzymes and Biocatalysis. In: Kent J. (eds) **Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology**. Springer, Boston, MA. p. 1183-1227, 2012.

MELANI, N. B.; SANTOS, G. L.; ROQUE, C. S.; CAMPOS, E. S.; TAMBOURGI, E. B. Influence of incubation time for protease production of *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. Em: Anais do XXII National Bioprocesses Symposium (SHEB) 2019, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2019. Disponível em: <<https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-sheb-2019/papers/influence-of-incubation-time-for-protease-production-of-bacillus-subtilis-in-submerged-fermentation>> Acesso em: 09 mar. 2020.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**. v. 3, p. 9-23, 2009.

MOORTHY, I. M. G.; BASKAR, R. Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* species BGS using response surface methodology and genetic algorithm. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 293-314, 2013.

MURRAY, M-Y. **Comprehensive Biotechnology**. Boston: Elsevier, 2011.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 165–190, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **SCIENCE**, v. 224, n. 4647, p. 350-357 1984.

NEURATH, H.; WALSH, K. A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A review). **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 73, n. 11, p. 3825-3832, 1976.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quím. Nova**, vol. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PANT, G.; PRAKASH, A.; PAVANI, J. V. P.; BERA, S.; DEVIRAM, G. V. N. S.; KUMAR A.; PANCHPURI M.; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, n. 9:1, p. 50-55, 2015.

PATEL, A. R.; MOKASHE, N. U.; CHAUDHARI, D. S.; JADHAV, A. G.; PATIL, U. K. Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 101122, 2019.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005.

PINHEIRO, M. J.; FREITAS S.; MIRANDA E. A.; PESSÔA FILHO, P. A. Solubility of lysozyme in aqueous solution containing ethanol or acetone: unexpected dependence on the initial protein concentration. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 9-13, 2016.

PROMCHAI, R.; BOONCHALEARN, A.; VISESSANGUAN, W.; LUXANANIL, P. Rapid production of extracellular thermostable alkaline halophilic protease originating from an extreme haloarchaeon, *Halobacterium salinarum* by recombinant *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 192-198, 2018.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K.; Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 173-180, 2010.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of current life sciences**, v. 2, n. 1, p. 12-18, 2012.

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

RAWLINGS, N. D.; BATEMAN, A. Origins of peptidases, **Biochimie**, v. 166, p. 4-18, 2019.

REKIK, H.; JAOUADI, N. Z.; GARGOURI, F.; BEJAR, W.; FRIKHA, F.; JMAL, N.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1227-1239, 2019.

SANTOS, G. L. Produção, purificação e caracterização parcial de proteases de *Penicillium citrinum*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2019. p. 67 Dissertação (Mestrado).

SATHISHKUMAR, R.; ANANTHAN, G.; ARUN, J. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 214-220, 2015.

SAYEM, S. M. A.; ALAM, M. J.; HOQ, Md. M. Effect of temperature, pH and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03. **Proceedings-Pakistan Academy of Sciences**, v. 43, n. 4, p. 257-262, 2006.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017.

SHIH, Y.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 10, p. 1155-1164, 1992.

SIEBER, S.; BÖTTCHER, T.; STAUB, I.; ORTH, R. Small molecules as versatile tools for activity-based protein profiling experiments. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. v. 9, p. 629-674, 2010.

SILVA, G. A. B. DA; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; SOARES, M. B. A.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, D.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Enzymatic hydrolysis of non-treated sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas with and without ultrasound assistance, **Renewable Energy**, v. 83, p. 674-679, 2015.

SINGH, S.; GUPTA, P.; BAJAJ, B. K. Characterization of a robust serine protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 88-98, 2017.

SOARES, P.; COELHO, D.; MAZZOLA, P.; SILVEIRA, E.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.; PESSOA JR, A.; TAMBOURGI, E. Studies on bromelain precipitation by ethanol, poly(ethylene glycol) and ammonium sulphate, **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 979-984, 2011.

STEPANOV, V. M.; RUDENSKAYA, G. N.; GAIDA, A. V.; OSTERMAN, A. L. Affinity chromatography of proteolytic enzymes on silica-based biospecific sorbents. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 5, n. 3, p. 177-186, 1981.

SUBERU, Y.; AKANDE, I.; SAMUEL, T.; LAWAL, A.; OLANIRAN, A. Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, 101264, 2019.

TAKAGI, H. Protein engineering on subtilisin. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, v. 3, p. 307-312, 1993.

THAKUR, N.; KUMAR, A.; SHARMA, A.; BHALLA, T. C.; KUMAR, D. Purification and characterization of alkaline, thermostable and organic solvent stable protease from a mutant of *Bacillus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 217-224, 2018.

THOMAS, J.A.; TAN, M.S.Y.; BISSON, C.; BORG, A.; UMREKAR, T. R.; HACKETT, F.; HALE, V. L.; BARRENA, G. V.; FLECK, R. A.; SNIJDERS, A. P.; SAIBIL, H. R.; BLACKMAN, M. J. A protease cascade regulates release of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* from host red blood cells. **Nat Microbiol**, v. 3, p. 447–455, 2018.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, p. 44, 2009.

VOSS, S.; NITSCHKE, C. Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.30, n. 5, 2020.

WAHAB, W. A. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447-458, 2018.

WALSH, G. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology**. 2. Ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014.

WANG, J.; XU, A.; WAN, Y.; LI, Q. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 170, p. 2021–2033, 2013.

WARD, O. P.; RAO M. B.; KULKARNI A. Proteases, production. In: **Encyclopedia of Microbiology**, 3. Ed. San Diego, USA.: Academic Press - English, 2009.

WATANABE, E. O.; POPOVA, E.; MIRANDA, E. A.; MAURER, G.; FILHO, P. A. P. Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt type and temperature. **Fluid Phase Equilibria**, v. 281, n. 1, p. 32-39, 2009.

WEIJERS, S. R.; VAN'T RI ET, K. Enzyme stability in downstream processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotechnology Advances**, v. 10, n. 2, p. 237-249, 1992a.

XU, L.; LU, Y.; CONG, Y.; ZHANG, P.; HAN, J.; SONG, G.; WANG, G.; CHEN, K. Polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* using burdock oligofructose as carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 811-819, 2019.

YANG, J-K.; SHIH, I-L.; TZENG, Y-W.; WANG, S-L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5–6, p. 406-413, 2000.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Em: **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos**; SAIAD, S.; PIETRO, R. C. L. R. eds.; Summa Legis: Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-85, 2004.

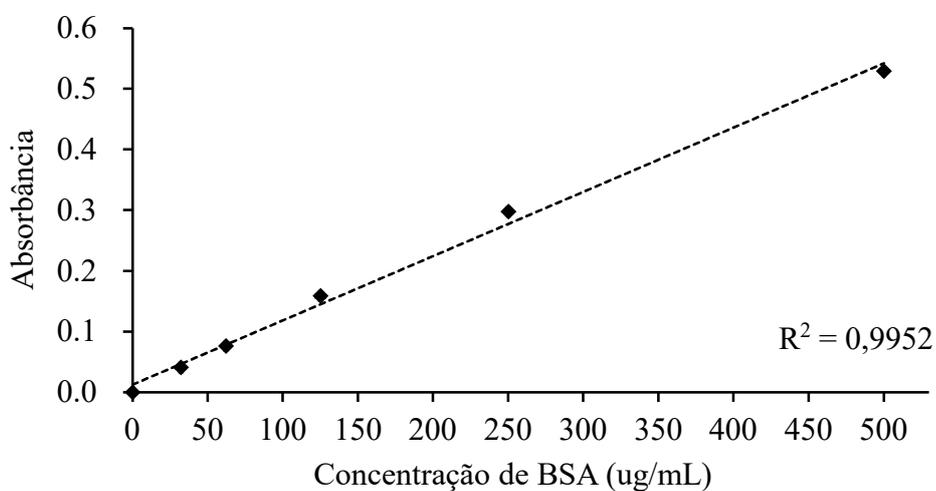
ZHANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, J.; LIU, Y. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of *bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 121-130, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Curva de calibração para proteínas totais.

O soluto utilizado como padrão foi a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) grau padrão (pureza $\geq 98\%$). Foi preparada uma solução-mãe de 2000 ug/mL e em seguida ela foi diluída nas concentrações de 0, 32, 62, 125, 250 e 500 ug/mL. A Figura 11 apresenta a curva de calibração obtida.

Figura 11 – Curva de calibração para proteínas totais.



A regressão linear da Figura 11 forneceu a Equação 7, utilizada no cálculo da concentração de proteínas totais.

$$y = 0,0011x + 0,0127 \quad (9)$$

ANEXOS

ANEXO A: Cadastro de acesso ao patrimônio genético no SISGEN.

Figura 12 – Cadastro de acesso ao patrimônio genético no SISGEN.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AE21468

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AE21468
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie	
Bacillus subtilis	
Título da Atividade:	pesquisa em biotecnologia

Equipe	
Elias Basile Tambourgi	UNICAMP

Data do Cadastro:	13/11/2018 15:22:56
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:41 de 24/04/2019.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**