



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

NATÁLIA BITTENCOURT MELANI

COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS
PARA RECUPERAÇÃO *IN SITU* E *EX SITU* DE PROTEASE
MICROBIANA.

CAMPINAS-SP

2023

NATÁLIA BITTENCOURT MELANI

COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS
PARA RECUPERAÇÃO *IN SITU* E *EX SITU* DE PROTEASE
MICROBIANA.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof^o. Dr. Elias Basile Tambourgi

Este trabalho corresponde a versão final Da Defesa de Tese defendida pela aluna Natália Bittencourt Melani e orientada pelo Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi.

CAMPINAS-SP

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

M48c Melani, Natália Bittencourt, 1994-
Comparação de sistemas de duas fases Aquosas para recuperação in situ e ex situ de protease microbiana / Natália Bittencourt Melani. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Imobilização. 2. Fermentação extrativa. 3. Sistema aquoso bifásico. 4. Purificação. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Comparison of aqueous two-phase system for in situ and ex situ recovery of microbial protease

Palavras-chave em inglês:

Immobilization

Extractive fermentation

Aqueous two-phase system

Purification

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Gislaine Cristina Sales Brugnoli da Cunha

Juliana Moura de Luna

Oswaldir Pereira Taranto

Marcelo Alexandre Prado

Data de defesa: 15-09-2023

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2677-789>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8772597771570277>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por NATÁLIA BITTENCOURT MELANI e aprovada em 15 de setembro de 2023 pela Comissão Examinadora da defesa, constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
Presidente e Orientador
FEQ/ UNICAMP

Profa. Dra. Gislaine Cristina Sales Brugnoli da Cunha
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP
Videoconferência

Profa. Dra. Juliana Moura de Luna
Universidade Católica de Pernambuco UNICAP
Videoconferência

Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA/UNICAMP

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.

DEDICATÓRIA

*À Deus, por guiar meus passos até aqui.
Aos meus pais, Cláudio e Andréa, à minha
irmã, Leticia, e ao meu marido, Bruno,
pelo enorme incentivo, apoio e amor
durante essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo milagre da vida, pela saúde e por sempre guiar meus passos nessa jornada da vida.

Aos meus pais, Andréa e Cláudio, e à minha irmã, Letícia, por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu marido, Bruno, pelo companheirismo, amor, apoio e paciência ao longo desta caminhada.

À Universidade Estadual de Campinas, pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado.

À Faculdade de Engenharia Química, incluindo todos os docentes, técnicos, colaboradores e auxiliares administrativos por proporcionarem uma excelente estrutura de ensino e sempre se mostraram solícitos a qualquer ajuda e esclarecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pelos ensinamentos, compreensão e apoio ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Edgar Silveira e ao Dr. Diego Coêlho por todo auxílio prestado no desenvolvimento e execução deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que sempre estiveram presentes a ajudar, apoiar, contribuir e tornar essa caminhada ainda melhor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O mercado de enzimas tem crescido a cada ano, com destaque para proteases (E.C. 3.4.), enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Os microrganismos representam uma fonte de proteases atrativa, onde as cepas microbianas mais importantes usadas na produção de proteases são as espécies do gênero *Bacillus*. Embora exista uma variedade de proteases microbianas disponível, os altos custos de obtenção ainda limitam o uso dessas enzimas em larga escala. Além disso, as principais restrições em estratégias de purificação tradicionais incluem baixos rendimentos e longos períodos. Sendo assim, há uma crescente busca por alternativas que diminuam os custos do processo de obtenção de biomoléculas para comercialização. Nesse contexto, imobilização de células tem sido um método amplamente utilizado para simplificação do processo de separação, além de novas alternativas como integração da fermentação com uma etapa de separação do produto. Portanto, o presente projeto propõe comparar métodos de recuperação de proteases de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 *in situ* por meio de fermentação extrativa e *ex situ* fermentação por imobilização celular seguida de extração em sistema bifásico aquoso. O tempo de fermentação de 60h e a utilização de leite desnatado e extrato de levedura levaram à melhor atividade proteolítica (24,81 U/mL), e a imobilização permitiu a redução do tempo de fermentação de 60h para 48h, além da possibilidade de reutilização das esferas duas vezes em fermentações consecutivas sem que haja perda de atividade enzimática. A extração em SBA levou ao coeficiente de partição enzimática 11,52, apresentando melhor partição da molécula comparado à fermentação extrativa. Contudo, a integração de processos por meio da fermentação extrativa permitiu a separação da massa celular na interface do sistema, sugerindo que futuras otimizações no processo podem levar a resultados comparáveis ao SBA tradicional.

Palavras-chave: Imobilização, Fermentação Extrativa, Sistema Bifásico Aquoso, Purificação.

ABSTRACT

The market for enzymes has been growing, especially proteases (E.C. 3.4.), which are enzymes that break peptide bonds between amino acids in proteins. Microorganisms represent an attractive source of proteases, where the most important microbial strains used in protease production are species of the genus *Bacillus*. Although a variety of microbial proteases are available, the high cost of procurement still limits the large-scale use of these enzymes. In addition, the main constraints in traditional purification strategies include low yields and long processing time. Thus, there is a growing search for alternatives that decrease the costs of the process of obtaining biomolecules for commercialization. In this context, cell immobilization has been a widely used method to simplify the separation process, as well as new alternatives such as integration of fermentation with a product separation step. Therefore, the present research proposed to compare methods to recover proteases from *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 *in situ* by extractive fermentation and *ex situ* by whole-cell immobilization followed by extraction in an aqueous biphasic system. The fermentation time of 60h and the use of skim milk and yeast extract led to the best proteolytic activity (24.81 U/mL), and the immobilization allowed the reduction of the fermentation time from 60h to 48h, besides the possibility of reusing the spheres twice in consecutive fermentations without loss of enzymatic activity. Extraction in aqueous two-phase system led to the enzyme partition coefficient 11.52, presenting better molecule partition compared to extractive fermentation. However, process integration *via* extractive fermentation allowed for separation of the cell mass at the system interface, suggesting that future process optimizations may lead to results comparable to traditional aqueous two-phase system.

Keywords: Immobilization, Extractive Fermentation, Aqueous Two-phase System, Purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação de proteases.....	18
Figura 2. Representação esquemática do diagrama de fases do Sistema Bifásico Aquoso.....	26
Figura 3. Perfil de sinal de CHNS obtido para Bacillus subtilis CBMAI-1302.....	38
Figura 4. Atividade proteolítica de B. subtilis CBMAI-1302 utilizando farinha de soja.....	40
Figura 5. Crescimento celular de B. subtilis CBMAI-1302 utilizando farinha de soja.....	40
Figura 6. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio para produção de proteases em B. subtilis CBMAI-1302.....	42
Figura 7. Avaliação de diferentes fontes de carbono para produção de proteases em B. subtilis CBMAI-1302.....	42
Figura 8. Comparação da atividade proteolítica dos melhores candidatos (leite desnatado e extrato de levedura) na presença (+) e ausência (-) de íons Ca^{2+}	44
Figura 9. Gráfico de probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Plackett-Burman.	46
Figura 10. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Plackett-Burman ...	47
Figura 11. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Composto Central 2^3	50
Figura 12. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do planejamento composto central 2^3	51
Figura 13. Gráfico de superfície de Resposta Planejamento Composto Central 2^3	53
Figura 14. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Composto Central 2^2	55
Figura 15. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Composto Central 2^2	56
Figura 16. Gráfico de superfície de Resposta Planejamento Composto Central 2^2	57
Figura 17. Otimização de Resposta do Planejamento Composto Central 2^2	58
Figura 18. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Bacillus subtilis CBMAI-1302 imobilizados em esfera de alginato a partir das condições ótimas de produção enzimática. ...	60
Figura 19. Atividade Proteolítica obtida à partir da imobilização de células de Bacillus subtilis CBMAI-1302.....	61
Figura 20. Avaliação da atividade proteolítica por ciclo de fermentações realizadas com células imobilizadas.....	62

Figura 21. Bacillus subtilis CBMAI-1302 imobilizados em esferas de alginato de cálcio após 8 ciclos de reutilização em fermentação para produção de proteases.	63
Figura 22. Diagrama de fases e linhas de amarrações geradas pelo pacote LLSR utilizando diferentes sistemas.	64
Figura 23. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Fatorial 3^3	66
Figura 24. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Fatorial 3^3	67
Figura 25. Gráfico de interação das variáveis para a resposta coeficiente de partição enzimática (Ke).....	69
Figura 26. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Fatorial 2^3	72
Figura 27. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Fatorial 2^3	73
Figura 28. Gráfico de Cubo do Planejamento Fatorial 2^3	74
Figura 29. Final do processo de extração in situ de proteases produzidas por Bacillus subtilis CBMAI-1302 após 48h de fermentação.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Plackett-Burman (PB) para imobilização de células em alginato.....	34
Tabela 2. Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Composto Central (CCD) para imobilização de células em alginato.....	34
Tabela 3: Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 3^3 para extração em SBA.	35
Tabela 4: Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 para fermentação extrativa.	36
Tabela 5. Composição CHNS obtida para Bacillus subtilis CBMAI-1302.....	38
Tabela 6. Matriz do Planejamento Plackett Burman.	45
Tabela 7. Tabela de coeficientes codificados para o Planejamento Plackett-Burman.	47
Tabela 8. Sumário do modelo do Planejamento Plackett-Burman.....	48
Tabela 9. Matriz do Planejamento Central Composto.....	48
Tabela 10. Coeficiente Codificados do Planejamento Composto Central 2^3	51
Tabela 11. Sumário do Modelo do Planejamento Composto Central 2^3	52
Tabela 12. Matriz do Planejamento Central Composto 2^2	54
Tabela 13. Análise de Variância do Planejamento Composto Central 2^2	57
Tabela 14. Matriz do Planejamento Fatorial 3^3	65
Tabela 15. Sumário do Modelo do Planejamento Fatorial 3^3	68
Tabela 16. Matriz do Planejamento Fatorial 2^3	71
Tabela 17. Sumário do Modelo do Planejamento Fatorial 2^3	73

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	Proteases	17
2.2.	Proteases oriundas de <i>Bacillus sp.</i>	20
2.3.	Aplicação Industrial	21
2.4.	Imobilização Celular	23
2.5.	Sistema bifásico aquoso (SBA)	24
2.6.	Fermentação Extrativa (FE)	28
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	Objetivo Geral	30
3.2.	Objetivos Específicos	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1.	Microrganismo e Condições de Cultivo	31
4.1.1.	Preparo da Cultura Estoque	31
4.1.2.	Condições de cultivo para o Crescimento Celular	31
4.1.3.	Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre CHNS	31
4.1.4.	Determinação do Tempo de Cultivo para Produção de Proteases	31
4.1.5.	Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Protease por Fermentação Submersa	32
4.2.	Concentração Celular e Fonte de Protease	32
4.2.1.	Concentração celular	32
4.2.2.	Atividade Proteolítica	32
4.3.	Determinação de Proteínas Totais	33
4.4.	Imobilização de Células em Alginato de Cálcio	33
4.4.1.	Planejamento Experimental para Imobilização Celular	33
4.4.2.	Tempo de Reciclo	34
4.4.3.	Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)	35
4.5.	Extração em Sistema Bifásico Aquoso (SBA)	35
4.6.	Fermentação Extrativa	36
4.6.1.	Condições de Cultivo	36
4.7.	Metodologia de Análise dos Resultados	36
4.7.1.	Rendimento da extração em SBA:	37
4.7.2.	Coeficiente de partição	37
4.7.3.	Rendimento de Extração em Fermentação Extrativa	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

5.1.	Microrganismo e Condições de Cultivo	38
5.1.1.	Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre CHNS	38
5.1.2.	Determinação do Tempo de Cultivo para Produção de Proteases.....	39
5.1.3.	Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Protease por Fermentação Submersa.....	41
5.2.	Imobilização de Células em Alginato de Cálcio	44
5.2.1.	Tempo de Reciclo.....	60
5.3.	Extração em Sistema Bifásico Aquoso (SBA)	63
5.4.	Fermentação Extrativa.....	70
6.	CONCLUSÃO	77
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	78
8.	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

A mudança de estilos de vida para hábitos mais saudáveis e alternativas sustentáveis, combinado ao aumento da renda disponível em um amplo segmento da população ocasionou em uma crescente demanda por alimentos e bebidas. Essa crescente necessidade de soluções sustentáveis impulsionou, conseqüentemente, a ascensão de busca por enzimas industriais. Nesse contexto, os microrganismos destacam-se como uma das maiores e úteis fontes de obtenção de enzimas (Adrio; Demain, 2014). Atualmente, estima-se que aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, onde cerca de 200 são produzidas a partir de microrganismos que podem ser comercializadas. Contudo, apenas cerca de 20 enzimas são produzidas em escala verdadeiramente industrial. Além disso, a demanda mundial por enzimas é satisfeita por cerca de 12 grandes produtores e 400 fornecedores menores. Portanto, estas informações apontam que ainda há espaço para um maior desenvolvimento do mercado, à medida que novas enzimas e processos enzimáticos continuam a emergir (Kumar *et al.*, 2014). De acordo com um relatório publicado pela Allied Market Research, o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7082 milhões em 2017, e está projetado para atingir US\$ 10,5 bilhões em 2024. Entre elas, destacam-se as hidrolases, incluindo as proteases e lipases, sendo amplamente empregadas nas indústrias de detergentes, laticínios e químicas (Li *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2011).

Além de se apresentarem como alternativa à produtos químicos, o crescente uso de enzimas justifica-se, especialmente, pela sua capacidade de acelerar as reações, formando complexos de estado de transição com seu substrato, reduzindo, conseqüentemente, a energia de ativação da reação (Rekik *et al.*, 2019). O mercado de enzimas industriais expandiu-se substancialmente durante a década de 1960, quando as proteases alcalinas foram comercializadas pela primeira vez para uso em detergentes (Ward, 2011). Proteases são enzimas que atuam nas ligações peptídicas unindo os resíduos de aminoácidos adjacentes em uma molécula de proteína e as clivam, levando à formação de peptídeos e aminoácidos mais curtos. De acordo com a classificação da Comissão de Enzimas, as proteases são colocadas na classe 3 (hidrolases), subclasse 4, com cada enzima proteolítica recebendo um número único como EC 3.4.x.x. Dependendo do local de ação, amplamente essas enzimas podem ser classificadas em endopeptidase e exopeptidase. Além disso, uma enzima pode ser categorizada com base em diversos parâmetros, como tipo de substrato, o local de ação, mecanismo de ação envolvendo determinado aminoácido presente no sítio ativo (Solanki *et al.*, 2021). Essas biomoléculas

podem ser obtidas de várias fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos (Galbán *et al.*, 2013; Singh;Bajaj, 2015; Van Der Hoorn, 2008).

Microrganismos representam uma fonte de proteases atrativa quando comparados aos organismos previamente citados. Uma importante razão deve-se à capacidade cultivo, por processos fermentativos, em grandes quantidades em um curto período. (Sharma *et al.*, 2017). Todas as proteases microbianas industriais predominantes são enzimas extracelulares secretadas para o meio de cultura (Ward, 2011), onde as cepas mais utilizadas são as espécies de *Bacillus*, devido à sua capacidade excepcional para secretarem grandes quantidades de enzimas altamente ativas.(Rekik *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2018). Sabe-se que organismos desta espécie podem secretar proteases alcalinas e neutras, onde as primeiras são extensivamente empregadas na indústria detergentes e no processamento de alimentos, ao passo que as últimas são utilizadas em cervejarias e aplicações de esmagamento de cereais, bem como no processamento de alimentos, em geral (Li *et al.*, 2013; Pant *et al.*, 2015).

Contudo, embora uma grande variedade de proteases microbianas esteja disponível, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é limitado devido aos elevados custos de obtenção (Novelli *et al.*, 2016). Sendo assim, processos de produção e técnicas de recuperação eficientes visando a separação biológica e obtenção de produtos purificados e livres de contaminações são imprescindíveis na viabilidade econômica dessas biomoléculas para aplicações biotecnológicas. Portanto, o desenvolvimento de metodologias simplificadas e adequadas capazes de preservar a estrutura e a funcionalidade nativas da enzima é um requisito de suma importância para qualquer avanço nesse campo (Sankaran *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

Uma alternativa bem descrita na literatura e amplamente utilizada para simplificação do processo de separação está na imobilização de microrganismos, cujo procedimento envolve a sua retenção, por métodos químicos ou físicos, em um suporte sólido (Liu *et al.*, 2014; Nemati;Webb, 2011; Oliveira *et al.*, 2019). Nesta técnica, as células imobilizadas podem realizar reações mais complexas do que sua forma livre, uma vez que o ambiente criado pelo suporte sólido permite a proteção dos microrganismos contra variações de temperatura, pH e tensão de cisalhamento. Essa importante vantagem possibilita a preservação das atividades catalíticas, gerando um aumento na concentração celular no biorreator e, conseqüentemente, aumentando a secreção de produtos de interesse para o meio (Hori;Unno, 2011; Oliveira *et al.*, 2019).

Recentemente, outro eficiente procedimento de separação de biomoléculas pode ser encontrado na junção de operações unitárias. Entre as diferentes abordagens para integrar as

etapas em um sistema biológico, o processo de fermentação extrativa de duas fases aquosas parece ter o maior potencial. O conceito deste processo de purificação *in situ* envolve a simultânea síntese e remoção o produto. Isto não apenas garante a recuperação primária, mas também aumenta a taxa de formação do produto, superando o relevante problema da inibição pelo produto final durante a fermentação (Malinowski, 2001; Show *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2018). Nesses sistemas, as células microbianas geralmente permanecem em uma fase, enquanto os produtos de baixo peso molecular são distribuídos uniformemente entre as fases. Assim como na extração de enzimas por sistemas bifásicos aquosos, a fermentação extrativa apresenta baixa toxicidade, fácil escalonamento e maior biocompatibilidade, uma vez que reagentes como polietileno glicol (PEG) e dextrana são frequentemente empregados para a formação das duas fases, que contém 85–95% de água (Hori;Unno, 2011).

Embora haja uma pluralidade de estudos focados na obtenção de proteases, a viabilidade econômica destas enzimas ainda é muito restrita. Sabe-se que os altos custos envolvidos em processos aplicados após a fermentação, também conhecidos como *downstream processing*, são o gargalo da indústria de produtos biotecnológicos. Até o presente momento, poucos trabalhos exploraram a técnica de integração de operações unitárias por meio de fermentação extrativa na produção e extração de proteases, cujas vantagens anteriormente citadas justificam seu potencial aplicação dentro da indústria biotecnológica. Portanto, a comparação desta recente abordagem de integração de processos com operações já bem elucidadas na literatura na forma de imobilização de enzimas para produção e extração por sistemas bifásicos aquosos, torna-se um estudo de relevante importância na comunidade acadêmica.

Sendo assim, é de grande interesse que a possibilidade de maximização a produtividade desses biocatalizadores para suprir a crescente demanda do mercado seja propriamente explorada, seja pela otimização do crescimento microbiano, seja pela taxa de produção de enzimas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

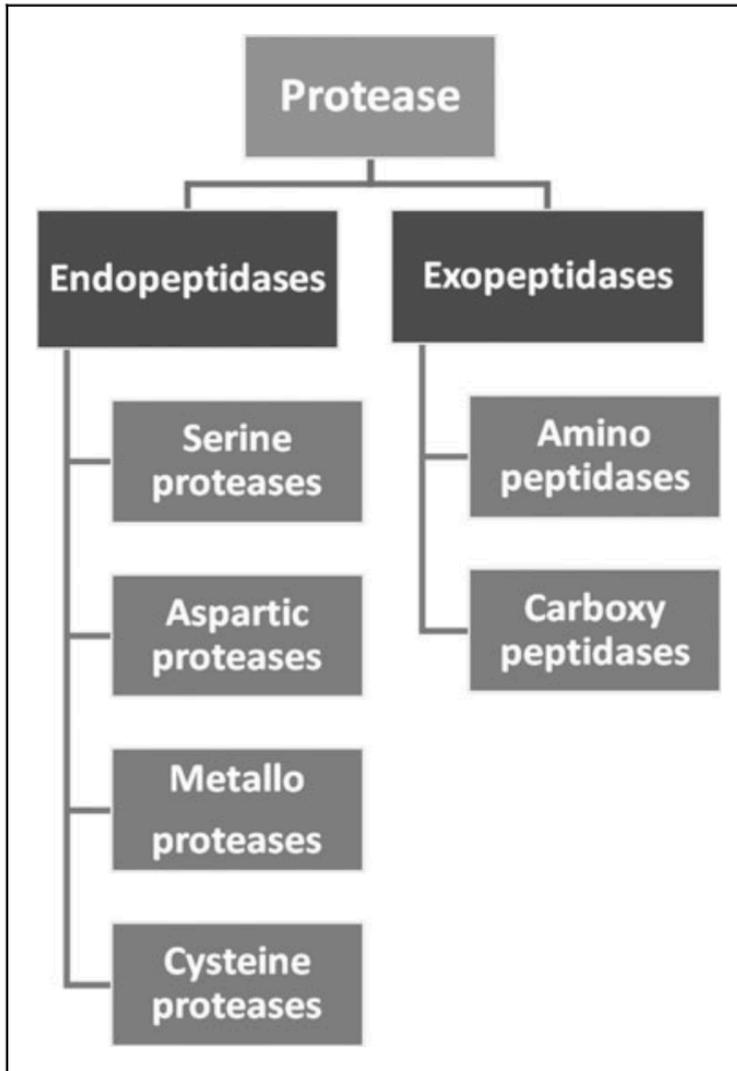
2.1. Proteases

Proteases são uma das maiores e mais diversas famílias de enzimas conhecidas, na quais hidrolisam proteínas em peptídeos curtos ou aminoácidos livres (Contesini, Melo e Sato, 2018). O termo “proteases” não se refere a uma única enzima, mas a uma mistura de enzimas, incluindo proteases e amilases (Guleria *et al.*, 2016). Proteases semelhantes em sequências e estruturas são agrupadas em classes e famílias, que estão disponíveis no banco de dados MEROPS (Razzaq *et al.*, 2019). Em geral, os sítios ativos da protease são cercados em um ou ambos os lados por um ou mais sublocais capazes de acomodar a cadeia lateral de um único resíduo de aminoácido específico do substrato. O grau de especificidade dos aminoácidos pelo sítio ativo e subsítios define as propriedades biocatalíticas gerais e, especialmente, a especificidade da reação proteolítica (Ward, Rao e Kulkarni, 2009). Estas enzimas hidrolíticas são ubíquas na natureza e podem ser encontradas em organismos eucarióticos como plantas, animais, fungos, protistas, bem como em procarióticos, como bactérias e arqueias. Até mesmo alguns vírus também são conhecidos por codificar suas próprias proteases (Rodamilans *et al.*, 2018).

Proteases foram classificadas pelo Comitê da Nomenclatura Enzimática como EC 3.4.-, ou seja, o subgrupo 4 do grupo 3 (hidrolases). Dependendo do seu local de ação, estas enzimas são categorizadas em dois grupos principais, isto é, exoproteases e endoproteases. (Ward, Rao e Kulkarni, 2009). No entanto, as proteases não atendem facilmente ao sistema de nomenclatura enzimática devido à sua enorme diversidade de ação e estrutura, sendo adicionalmente classificadas com base em três critérios principais: (i) tipo de reação catalisada, (ii) natureza química do sítio catalítico e (iii) relação evolutiva com referência à estrutura (Rao *et al.*, 1998). Atualmente, quatro classes são reconhecidas e dentro dessas classes, seis famílias, sendo elas: serino proteases (EC 3.4.21), serino carboxi-proteases (EC 3.4.16), cisteína proteases (EC 3.4.22), proteases aspárticas (EC 3.4.23), metalo proteases I (EC 3.4.24) e metalo carboxi proteases (EC 3.4.17) (Whitaker, 1994).

As exoproteases que atuam apenas perto das extremidades N- ou C-terminais das cadeias polipeptídicas e são classificadas, respectivamente, como amino- e carboxiproteases. Por outro lado, as endoproteases atacam ligações peptídicas em locais mais centrais da cadeia polipeptídica mais distantes das extremidades N- e C-terminais (Contesini, Melo e Sato, 2018). Sendo assim, são divididas em seis subgrupos com base em seu mecanismo catalítico: serina endoproteases, endoproteases aspárticas, cisteína / tiol endoproteases, metaloendoproteases, proteases do ácido glutâmico, treonina endoproteases, de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Classificação de proteases. Fonte: Sharma *et al.* (2019).



Desde a antiguidade, a tecnologia enzimática foi associada em produtos fermentados como parte de alimentos e medicamentos. Ao longo dos últimos séculos, produtos de panificação, álcool e vinagre serviram à humanidade como parte de alimentos e bebidas convencionais em todo o mundo (Srilakshmi e Madhavi, 2014). Na Grécia antiga, por exemplo, enzimas proteolíticas eram utilizadas para produção de queijo, onde o leite em estômagos de bezerros foi encontrava-se coagulado devido à atividade do coalho de bezerro, ou seja, quimosina (Ward, Rao e Kulkarni, 2009). Além disso proteases alcalinas têm sido usadas para remover pelos de couros, e papaína de mamão para amaciamento de carne (Li *et al.*, 2013). Essas enzimas são também amplamente aplicadas na indústria de detergentes uma vez que são

capazes de digerirem alimentos como leite, ovo, carne bovina, peixe, sangue e outras manchas corporais, melhorando a qualidade da lavagem do detergente com menos tempo de imersão e agitação. Portanto, sua utilização como aditivos detergentes podem ser úteis até mesmo em quantidades muito pequenas devido à sua capacidade iônica, em um grande espectro de pH e temperatura e longa vida útil, juntamente com a eficácia do detergente melhorada (Solanki *et al.*, 2021).

Proteases alcalinas são significativamente aplicadas em muitas outras indústrias, incluindo as indústrias têxteis e de gestão de águas residuais, além de seu papel dominante em detergentes e seus usos no processamento de alimentos (Sharma *et al.*, 2019). Tradicionalmente, serino proteases, também pertencente às proteases alcalinas, têm sido utilizadas na preparação de hidrolisado proteico de alto valor nutricional. Estes hidrolisados comerciais são derivados da proteína de soja, caseína e do soro de leite. Os hidrolisados de proteínas desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial e são amplamente utilizados em formulações de alimentos infantis, produtos dietéticos terapêuticos específicos e na fortificação de sucos de frutas e refrigerantes. (Ward, Rao e Kulkarni, 2009)

Normalmente, as proteases alcalinas extracelulares são secretadas para o meio líquido, onde são devidamente purificadas, de acordo com sua aplicação final. Comparando o processo com proteases produzidas por plantas e animais, estas requerem menos trabalho de obtenção (Razzaq *et al.*, 2019). Entre as vantagens da utilização de microrganismos, destaca-se a sua capacidade de ser cultivados em grandes quantidades em um tempo relativamente curto por métodos de fermentação estabelecidos e abundante produção da molécula desejada. Além disso, as proteínas microbianas apresentam maior estabilidade, podendo ser armazenadas em condições não ideais por semanas sem perda significativa de atividade (Sharma *et al.*, 2017).

Ao longo dos séculos, as proteases microbianas também tiveram papéis fundamentais na produção de alimentos fermentados tradicionais, (Ward, Rao e Kulkarni, 2009). Dos três maiores grupos de enzimas industriais, as proteases são um deles, e seu mercado global está em crescimento. Dos 60% de enzimas comercializadas em todo o mundo, as proteases representam cerca de 20% (Razzaq *et al.*, 2019). Grande parte das proteases disponíveis no mercado são de origem microbiana devido a vantagens como atividade catalítica em ampla faixa de temperatura e pH (Srilakshmi e Madhavi, 2014). Atualmente, a indústria de enzimas microbianas fornece proteases para uso terapêutico, no processamento de alimentos, detergentes, e para síntese química orgânica (Ward, Rao e Kulkarni, 2009).

Outro aspecto que impulsiona eficientemente a operação industrial moderna é a reutilização do catalisador para reduzir o custo de produção. Nesse sentido, enzimas surgem

como peça-chave uma vez que podem ser usadas por várias vezes em reação contínua após a imobilização em material apropriado (Srilakshmi e Madhavi, 2014). As proteases microbianas encontram-se em meio às enzimas hidrolíticas extensivamente estudadas para aplicações industriais. Enquanto algumas enzimas fúngicas comerciais ainda são produzidas na Ásia por fermentação semissólida, enzimas microbianas industriais de origem fúngica e bacteriana são predominantemente produzidas por processos de fermentação submersos em larga escala, utilizando espécies bacterianas e fúngicas capazes de gerar alta produção do produto desejado (Ward, Rao e Kulkarni, 2009).

O tipo de fermentação influencia vários aspectos do crescimento do microrganismo, bem como da produção da molécula desejada. A utilização da fermentação submersa é vantajosa devido à facilidade de esterilização e maior facilidade de controle do processo. As proteases são geralmente produzidas usando fermentação submersa devido a benefícios como características consistentes de produção enzimática com condições definidas de cultivo e processos de separação bem estabelecidos (Sharma *et al.*, 2017). Para obter uma produção enzimática comercialmente viável, os meios de fermentação devem ser adequadamente otimizados, onde diferentes fatores como pH, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, íons metálicos, temperatura e inibidores afetam a produção de enzimas e devem ser investigados (Sharma *et al.*, 2019). Em geral, as proteases extracelulares apresentam vantagens sobre as intracelulares em termos de custo e disponibilidade (Banerjee e Ray, 2017).

2.2. Proteases oriundas de *Bacillus sp.*

A maioria das proteases comerciais, principalmente neutras e alcalinas, é produzida por organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dois dos tipos mais importantes de proteases alcalinas são a subtilisina Carlsberg e a subtilisina novo, que são obtidas por este gênero bacteriano (Solanki *et al.*, 2021). As proteases bacterianas neutras são ativas em uma estreita faixa de pH (pH 5 a 8) e têm termo tolerância relativamente baixa (Rao *et al.*, 1998). As enzimas produzidas por este gênero representam cerca de 50% do mercado total de enzimas, sendo as serinas proteases alcalinas de *Bacillus* (subtilisinas) a enzima comercial mais dominante devido à sua aplicação em detergentes domésticos (Ward, Rao e Kulkarni, 2009).

As subtilisinas mais caracterizadas são a subtilisina Carlsberg, que são produzidas por *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*) e a subtilisina BPN, que geralmente são produzidas por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. stearothermophilus*). A Subtilisina Carlsberg, produzidas por espécies neutras de *Bacillus*, representam a primeira geração de proteases

alcalinas comercializadas para uso em detergentes, cujo pH ótimo se encontra na faixa de 9-10. Contudo, uma segunda geração de proteases altamente alcalinas foi descoberta e aplicada industrialmente. Os organismos responsáveis pela produção são *Bacillus* alcalofílicos, como *B. clausii* e *B. halodurans*, onde a enzima resultante apresenta pH ótimo na faixa de 11-12 e maior termoestabilidade (até 60 °C, sem cálcio) (Ward, 2011). É importante ressaltar que várias cepas de *Bacillus*, incluindo *B. subtilis* e *B. licheniformis*, têm status Generally Recognized As Safe (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA). Isso significa que esses organismos e seus produtos são geralmente considerados seguros, inclusive para aplicações na área alimentícia (Ward, Rao e Kulkarni, 2009).

2.3. Aplicação Industrial

O mercado de enzimas industriais expandiu-se consideravelmente durante a década de 1960, quando proteases alcalinas foram comercializadas pela primeira vez para uso em detergentes (Ward, 2011). Atualmente, as demandas de enzimas como biocatalisadores em vários setores estão aumentando rapidamente, devido a várias vantagens, tais como: alta seletividade, eficiência, condições amenas de reação, modificação e alternativa favorável ao meio ambiente (Banerjee e Ray, 2017).

As proteases apresentam um papel significativo em diversas indústrias. O exemplo clássico de aplicação industrial de proteases é para fins de limpeza como aditivo detergente, componente de solução de limpeza de lente de contato etc. (Solanki *et al.*, 2021). Sua aplicação na indústria de couro como potencial substituto de produtos químicos tóxicos usados atualmente é um desenvolvimento relativamente novo e tem conferido uma relevante importância biotecnológica (Rao *et al.*, 1998). Relata-se que, para a despolo da pele e couros de animais, as proteases produzidas por *Bacillus sp.* fornecem as propriedades hidrolíticas, elastolíticas e queratinolíticas desejadas para o produto (Razzaq *et al.*, 2019).

Como previamente mencionado, as proteases têm uma longa história de aplicação nas indústrias de alimentos e detergentes. Por exemplo, proteases alcalinas bacterianas são caracterizadas por sua alta atividade em pH alcalino, e sua ampla especificidade de substrato. Além disso, sua temperatura ideal é em torno de 60°C, o que as tornam adequadas para uso na indústria de detergentes (Rao *et al.*, 1998). As proteases também encontram um papel muito significativo em várias indústrias. Por exemplo, essas enzimas são utilizadas na fase de trituração da fabricação de cerveja e processamento geral de cereais, onde funciona para aumentar o volume de extrato filtrável e aumenta a quantidade de nitrogênio alfa-amino no

mosto. Sua aplicação na fabricação de cerveja também pode ser observada para a remoção de névoa fria, onde a papaína é particularmente eficaz na hidrolisação destes polímeros, removendo assim a névoa (Ward, 2011).

O colágeno, gerado por indústrias de processamento de pescado, indústrias de processamento de frutos do mar e abatedouros é um resíduo preocupante. O seu descarte inadequado representa uma grande ameaça à poluição, além do risco direto à saúde humana e animal, uma vez que a transmissão de microrganismos patogênicos se torna possível. Nesse contexto, as proteases, especialmente as queratinases e collagenases, também estão desempenhando papel fundamental no gerenciamento de resíduos e controle da poluição, removendo esses componentes potencialmente problemáticos (Solanki *et al.*, 2021). A aplicação medicinal da protease para diagnóstico e terapêutica é amplamente aceita e várias enzimas estão em uso há muitos anos. As proteases possuem propriedades terapêuticas distintas que são úteis no desenvolvimento de vários medicamentos como compostos anticarcinogênicos, antimicrobianos, infecções anti-inflamatórias e dissolução de coágulos classe com diversas outras aplicações (Srilakshmi e Madhavi, 2014).

Além destes exemplos, as proteases possuem uma infinidade de aplicações. No caso das indústrias alimentícias, como fabricação de suplementos proteicos, alimentos infantis, hidrolisados proteicos, amaciamento de carnes, produção de vários tipos de alimentos fermentados e bebidas etc. (Banerjee e Raio, 2017). As proteases também são usadas na indústria de panificação, onde a massa pode ser preparada mais rapidamente se o seu glúten for parcialmente hidrolisado (Ward, Rao e Kulkarni, 2009). Vale ressaltar que o uso de produtos químicos na indústria de alimentos está sendo cada vez menor devido ao seu risco à saúde e alternativas naturais estão sendo ocupado um espaço cada vez maior. Sendo assim, a aplicação de proteases microbianas ecologicamente corretas tem mostrado potencial proeminente na substituição de agentes químicos, melhorando as propriedades dos produtos alimentícios (Solanki *et al.*, 2021).

A pureza final da protease depende da sua aplicação pretendida, portanto, o conjunto de processos envolvidos após a fermentação – conhecido como *downstream processing* - varia dependendo do organismo produtor, do meio de cultivo, da pureza necessária, da aplicação pretendida e do custo final esperado da proteína de interesse (Chavan, Avhad e Rathod, 2015a). Por exemplo, as proteases utilizadas nas indústrias de alimentos e detergentes são preparadas em grandes quantidades e usadas como preparações brutas, ao passo que as enzimas que são destinadas a aplicações na indústria farmacêutica são produzidas em pequenas quantidades, mas

requerem purificação extensiva, levando a um alto teor de pureza, antes de poderem ser comercializadas (Rao *et al.*, 1998).

A fermentação submersa é responsável por aproximadamente 90% da produção de todas as enzimas industriais, normalmente utilizando microrganismos selvagens ou geneticamente modificados. Nessa técnica, o crescimento microbiano ocorre em meio líquido com alta disponibilidade de água livre e é mais adequado para bactérias, onde esse processo oferece vantagens como facilidade de controle das variáveis físico-químicas, melhor distribuição dos componentes do meio e recuperação da enzima extracelular. No entanto, as enzimas produzidas são diluídas e menos estáveis (Solanki *et al.*, 2021). A sua comercialização industrial é limitada, principalmente, devido aos custos envolvidos para sua obtenção. O crescente interesse em usar proteases para a produção de vários bens ecológicos no mercado é de imensa importância e, para tornar os produtos econômicos, há uma constante busca de substratos que diminuam os gastos envolvidos, tornando a produção dessas enzimas economicamente viáveis. Tanto a fermentação em estado sólido quanto a fermentação submersa são explorados para a produção econômica de proteases microbianas (Razzaq *et al.*, 2019).

2.4. Imobilização Celular

A técnica de imobilização envolve a retenção química ou física de agentes biológicos em um suporte sólido, como uma matriz de alginato (Oliveira, Bastos e la Torre, de, 2019). Em um sentido mais amplo, a imobilização pode ser definida como o confinamento físico dos microrganismos que permite seu reaproveitamento econômico. As células imobilizadas podem incluir células mortas que contêm uma enzima ativa na qual é usada para uma única reação, bem como células viáveis ou em crescimento que são utilizadas para conversões bioquímicas. (Radovich, 1985). O uso de células imobilizada no processo de fermentação apresenta diversas vantagens em relação aos tipos de células livres, tais como a facilitação da separação do produto, a reutilização dos biocatalisadores em processos repetidos de fermentação em batelada, a redução do risco de contaminação, a estabilidade operacional e a melhoria da produtividade (Mashhadi-Karim, Azin e Gargari, 2011).

Devido à instabilidade térmica e ao alto custo de recuperação de enzimas, as proteases têm sido restritas para uso na indústria, apesar de suas vantagens (Razzaq *et al.*, 2019). Uma maneira de otimizar esse processo é imobilizando microrganismos. No geral, os métodos de imobilização podem ser classificados em: imobilização sem suportes, que inclui a formação de agregados por floculação natural ou catiônica induzida por polieletrólitos; acoplamento

covalente, incluindo ligações cruzadas a um suporte ativado; adsorção em suporte inerte e sólido; aprisionamento em materiais semipermeáveis inertes, como hidrogéis, fibras ou membranas (Radovich, 1985).

A encapsulação, ou aprisionamento, é um dos métodos de imobilização de células microbianas mais utilizados. Geralmente, o encapsulamento tem sido realizado através de um ou uma combinação dos seguintes processos: interações hidrofóbicas, ligação covalente, ligação de hidrogênio ou interações eletrostáticas e revestimento físico (Basak, Kumar e Jeon, 2023). O aprisionamento dentro de uma matriz porosa pode ser realizado por duas abordagens. Na primeira, as células são introduzidas em um material poroso e, após o crescimento, sua mobilidade é restringida pela presença de outras células e pela matriz, enquanto a segunda abordagem consiste em uma matriz sólida que é sintetizada *in situ* ao redor das células. Os polímeros utilizados podem ser sintéticos, como a poliacrilamida, ou podem ser feitos a partir de proteínas, como gelatina e colágeno, ou até mesmo utilizando polissacarídeos, como, por exemplo, celulose, alginato, ágar e carragenina (Genisheva, Teixeira e Oliveira, 2014).

O processo de imobilização é amplamente utilizado para proteção de células microbianas contra as condições adversas dos meios de reação, como variação de pH, temperatura e tensão de cisalhamento. A preservação das atividades catalíticas celulares aumenta a concentração celular no biorreator e, conseqüentemente, a produtividade dos metabólitos de interesse (Oliveira, Bastos e la Torre, de, 2019). Além disso, um importante benefício do encapsulamento de células microbianas é a possibilidade de estender a meia-vida de suas enzimas em ambientes agressivos, aumentar a sua concentração em regiões desejadas ou facilitar a reciclagem de células para um novo processo (Benitez-Mateos et al., 2018).

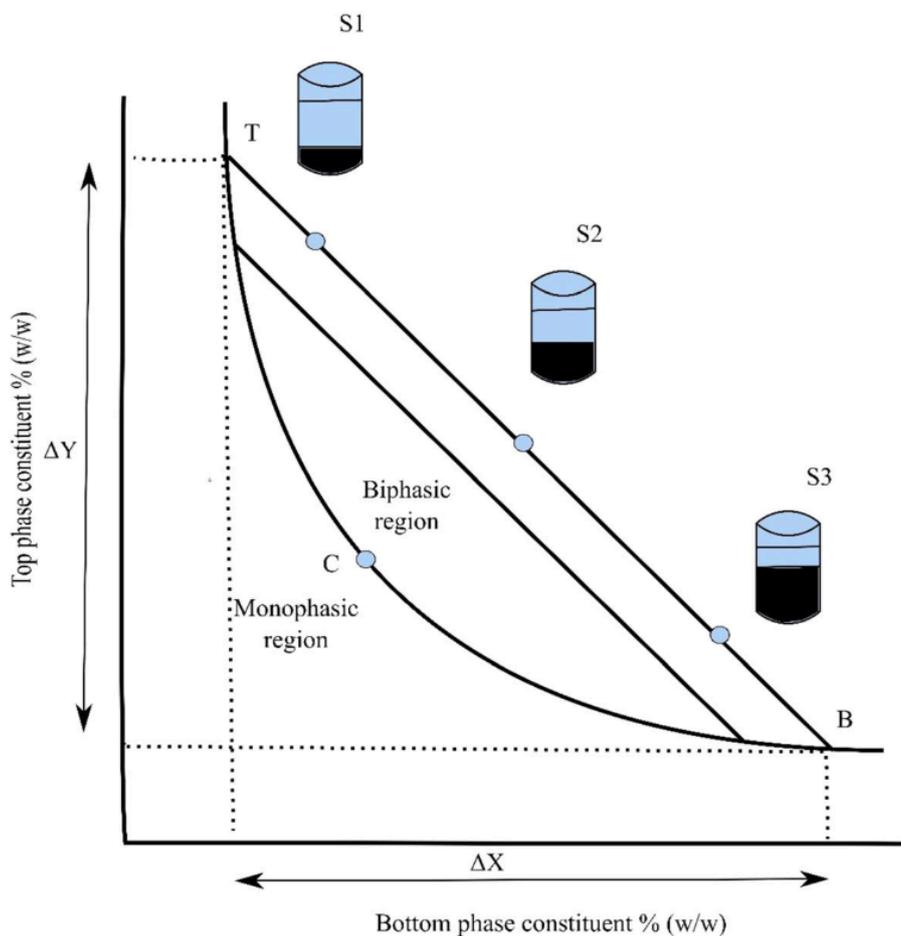
2.5. Sistema bifásico aquoso (SBA)

Em 1896, Martinus Willem Beijerinck descobriu, acidentalmente, o sistema bifásico aquoso (SBA) enquanto misturava uma solução aquosa de amido e gelatina. No entanto, sua aplicação real foi descoberta por Per-Åke Albertsson, em 1986 (Iqbal *et al.*, 2016). Desde então, esta técnica de extração líquido-líquido tornou-se uma poderosa ferramenta de bioseparação e tem sido extensivamente explorada para processar uma gama de materiais biotecnológicos, tais como proteínas, enzimas, fitoquímicos, ácidos nucleicos e pigmentos (Maneiras et al., 2018). Os sistemas bifásicos mais comuns são formados pela mistura de um polímero e soluções salinas ou aquosas de dois polímeros incompatíveis acima de uma determinada concentração crítica (Sánchez-Trasviña *et al.*, 2019). Outros tipos incluem, líquidos iônicos e álcoois de

cadeia curta. Além disso, surfactantes iônicos e/ou não iônicos são usados para a formação de SBAs micelares e micelas reversas (Iqbal *et al.*, 2016).

O diagrama de fases do Sistema Bifásico Aquoso (SBA) é representado uma curva binodal, na qual divide a região das concentrações dos componentes. As concentrações acima da curva, o sistema forma duas fases aquosas imiscíveis, enquanto a composição abaixo da curva binodal forma apenas uma fase. A linha no diagrama na Figura 2 é uma linha de amarração. Essa linha conecta dois nós, que se encontram na curva binodal, e todos os potenciais sistemas, representados por S1, S2 e S3 apresentam a mesma composição de equilíbrio de fase superior e fase inferior uma vez que se encontram na mesma linha de amarração (Iqbal *et al.*, 2016). Comumente, no diagrama bifásico, o eixo da ordenada é usado para o constituinte rico em fase superior, enquanto o eixo da abscissa é usado para constituinte rico em fase inferior (Benavides e Rito-Palomares, 2011). Quando uma amostra biológica é inserida no SBA, sua partição para a fase inferior ou superior é conduzida por diferentes interações entre os componentes formadores de fase química e a amostra biológica, tais como: eletrostática, Van der Waals e hidrofóbica, até que o equilíbrio termodinâmico seja alcançado (Sánchez-Trasviña *et al.*, 2019).

Figura 2. Representação esquemática do diagrama de fases do Sistema Bifásico Aquoso. Fonte: IQBAL *et al.*, (2016).



As interações químicas específicas envolvidas na formação de fases do SBA são altamente dependentes da sua composição. Embora os dois principais constituintes sejam primordialmente hidrofílicos, a entalpia de hidratação entre tais componentes é diferente. Como resultado, dois cenários termodinâmicos são possíveis: se a quantidade de energia no sistema for alta o suficiente para superar a diferença líquida entre entropia e entalpia de hidratação, os dois principais constituintes químicos podem coexistir em uma fase homogênea. Caso contrário, a separação dos dois constituintes é favorecida energeticamente, promovendo a formação de duas fases (Benavides e Rito-Palomares, 2011).

Os princípios que regem o comportamento de partição no Sistema Bifásico Aquoso podem ser categorizados em quatro grupos principais, sendo eles: hidrofobicidade, forças eletroquímicas envolvidas, tamanho dependente do polímero e da molécula alvo, e bioafinidade

específica (Benavides e Rito-Palomares, 2011). Embora, o mecanismo através do qual o sal influencia o SBA é pouco compreendido, geralmente, três forças (gravitacional, flotação e friccional) atuam em uma gota durante a separação de fases e o equilíbrio entre essas forças determinam seu movimento. A força gravitacional é dependente da densidade das gotas, ao passo que as forças de flutuação e atrito dependem das propriedades de fluxo das fases (Iqbal *et al.*, 2016).

O sucesso com sistemas bifásicos aquosos baseia-se na habilidade de manipular a composição de fases de modo a obter coeficientes de partição (K) e seletividade adequados para o material de interesse. Essa manipulação pode ocorrer, principalmente, devido a três fatores: escolha, concentração e peso molecular do polímero; escolha e concentração do sal ou sais utilizados; e, por fim, de modificações químicas de um dos polímeros através da fixação de um ligante para o qual existem receptores no material de interesse (particionamento de afinidade) (Moeda *et al.*, 2003). Vale ressaltar que o comportamento de partição pouco compreendido acaba se tornando uma grande barreira na ampla adaptação do SBA em níveis comerciais para a purificação de biomoléculas (Iqbal *et al.*, 2016).

A recuperação de biomoléculas na fermentação em larga escala é desafiadora e, geralmente, requer muitas etapas que resultam no potencial de desnaturação das enzimas. Além disso, a utilização de processos cromatográficos convencionais envolve métodos caros de várias etapas, com dificuldades de expansão, além do extenso tempo requerido para a obtenção do produto final. Portanto, há uma grande demanda por métodos de extração eficientes e de baixo custo para a produção. Nesse contexto, o SBA é uma alternativa que deve ser considerada (Sánchez-Trasviña *et al.*, 2019). Por exemplo, esse processo não só é capaz de extrair o composto de interesse por meio do seu particionamento em uma das fases, como também é capaz de concentrá-lo ao particioná-lo no menor volume da fase de extração (Quarto *et al.*, 2018).

Os sistemas de sal de polietilenoglicol (sal de PEG) são os SBA mais utilizados para separação de biomoléculas, uma vez que o PEG é um polímero recomendado para recuperação de produtos biológicos devido aos seus grupos hidroxila (Blatkiewicz *et al.*, 2018). Em comparação com o método convencional, o uso do Sistema Bifásico Aquoso para bioseparação oferece muitas vantagens, tais como: simplicidade de operação do processo, alta seletividade, rápida separação, baixo consumo de energia e facilidade de escalonamento (Iqbal *et al.*, 2016). Além disso, a tensão interfacial extremamente baixa desse sistema (entre 0,0001 e 0,1 dinam/cm) cria alta área de contato interfacial das fases dispersas, o que, por sua vez, aumenta a eficiência da transferência de massa (Maneiras *et al.*, 2018).

A água, como principal componente de ambas as fases do SBA, forma um ambiente ameno para que as biomoléculas se separem e os polímeros estabilizem sua estrutura e atividades biológicas, ao passo que a utilização de outros métodos de extração líquido-líquido pode danificar os produtos biológicos devido às condições do processo e aos solventes orgânicos (Iqbal *et al.*, 2016). Contudo, o custo envolvido na obtenção e tratamento de componentes químicos é considerado um dos principais pontos de limitação para o processo de bioseparação em larga escala. Sendo assim, uso de componentes de fase economicamente viáveis no SBA colaboraria com o aumento da relação custo-benefício dos SBA para aplicações industriais. Além disso, o problema da poluição causada por esses reagentes pode ser evitado através da reciclagem dos componentes de fases (Quarto *et al.*, 2018).

Diversos exemplos na literatura relatam a utilização de SBA para extração de proteases de *Bacillus*. Um sistema aquoso bifásico (SBA) composto por polietilenoglicol (PEG) 4000 e fosfato de potássio foi explorado para a separação da protease produzida a partir de *Bacillus licheniformis* NCIM 2042, onde os resultados experimentais de condições otimizadas mostraram coeficiente de partição de 11,95 com fator de purificação de 2,2 e rendimento percentual de 89,75 de protease (Chavan, Avhad e Rathod, 2015a). Outro estudo investigou o SBA composto por polietilenoglicol 1000 (PEG1000) / fosfato de potássio para extração de protease alcalina de *Bacillus subtilis* NS99 (Nuntiya Wongmongkol e Seeroong Prichanont, 2006). Samad *et al.* (2017) avaliaram dois SBAs para purificação de proteases produzidas por *B. amiloliquefaciens* B7 (PEG/fosfato de potássio e PEG/citrato de sódio) e as condições ótimas para purificação foram observadas em pH 7 e 35°C com atividade enzimática de $0,20 \pm 0,01$ U/ml.

2.6. Fermentação Extrativa (FE)

Através da integração de processos, operações unitárias que fazem parte do *downstream processing*, como separação, concentração e extração, podem ser integrados em uma única etapa, o que poderia reduzir o desperdício e o tempo de processamento, diminuir o consumo de energia e, conseqüentemente, reduzir o custo geral de produção. Nesse contexto, o Sistema Bifásico Aquoso pode ser combinado com outros métodos ou processos de separação para superar problemas comumente observados em processos biotecnológicos, como baixa produtividade, operação cara e longo tempo de processamento (Maneiras *et al.*, 2018). A retenção e reutilização da massa celular em uma fase específica do SBA facilita a recuperação contínua do produto. A Fermentação Extrativa utilizando SBA é um processo de integração

eficiente de síntese enzimática que potencialmente melhora o rendimento e a produtividade do processo enzimático (De et al., 2013).

A tendência futura na elaboração de bioprocessos que sejam economicamente viáveis pode ser dar, principalmente, através da integração de várias operações unitárias em uma única etapa. Para diminuir ou integrar um número de operações unitárias envolvidas, é necessário projetar um estágio de processamento distinto que cumpra os objetivos das operações unitárias que estão sendo substituídas (Badhwar, Kumar e Dubey, 2019). O uso da fermentação extrativa contribui para a redução das dificuldades com a baixa produtividade volumétrica característica dos processos biotecnológicos, garantindo não só a recuperação primária, mas também aumentando a taxa de formação do produto (Alves *et al.*, 2022a).

A fermentação extrativa ou remoção de produto *in situ*, é um novo processo derivado do SBA onde as células microbianas crescem em uma fase enquanto o produto extracelular de interesse, é excretado e particionado para a outra fase. Conseqüentemente, a biomolécula alvo é extraída sem perturbação da biomassa (Badhwar, Kumar e Dubey, 2019). O objetivo é evitar a inibição do produto ou obter de biomolécula com alta atividade específica, preferencialmente em um fluxo livre de células. Em um sistema bifásico aquoso, o produto particiona em outra fase para o local de produção assim que é formado, reduzindo assim o efeito inibitório do produto sobre a fermentação (Sinha, Dey e Panda, 2000). A separação do produto em um processo de fermentação extrativa pode ser realizada dentro do biorreator ou circulando o extrato da fermentação através da separação externa (Yang *et al.*, 2007). A biomassa celular pode ser retida para a produção contínua da proteína desejada, enquanto a fase contendo o produto é extraída e reabastecida (Silva, Alves e Porto, 2018).

Portanto, a abordagem integrada realiza a captura direta do produto de interesse, separando-o dos componentes restantes do meio em que se foi produzido. Essa separação simultânea ocorre na tentativa de atender a objetivos específicos que não são alcançados de forma eficiente por operações unitárias distintas, como, por exemplo, promover baixa degradação do produto, redução no tempo de processamento e custo de recuperação do produto (Ooi *et al.*, 2011). Isso não é apenas para garantir a recuperação primária, como também para contribuir no aumento da taxa de formação do produto, minimizando a inibição pelo produto final durante a fermentação, o que facilita a recuperação instantânea do produto de interesse à medida que este é formado (Silva, Alves e Porto, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar métodos de recuperação de proteases de *Bacillus subtilis in situ* por meio de fermentação extrativa e *ex situ* fermentação por imobilização celular seguida de extração em sistema bifásico aquoso visando a redução de processos e aumento do produto obtido como um potencial estratégia para aplicação industrial.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar e comparar ensaios de obtenção de protease de *Bacillus subtilis* utilizando células livres, imobilizadas e condicionadas em fermentação extrativa;
- Otimizar o meio de cultivo de *Bacillus sp.* para produção de proteases em fermentação submersa com células livres;
- Determinar, por planejamento experimental, a influência dos parâmetros de concentração de alginato de sódio, cloreto de cálcio e tempo de cura na imobilização de células de *Bacillus sp.*;
- Avaliar a estabilidade do suporte de imobilização celular em alginato de sódio através do reciclo de esferas em fermentação pelo sistema batelada
- Realizar a caracterização morfológica das esferas de alginato por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Comparar métodos de extração de protease de *Bacillus sp.* por sistema de duas fases aquosas a partir de fermentação por células imobilizadas e fermentação extrativa;
- Determinar, por planejamento experimental, a influência dos parâmetros na extração de protease de *Bacillus sp.* por sistema bifásico aquoso do tipo PEG/ sal,
- Avaliar os parâmetros de produção e extração de proteases em fermentação extrativa pelo sistema de batelada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e Condições de Cultivo

4.1.1. Preparo da Cultura Estoque

Para o meio de cultura estoque, uma solução de ágar nutriente em concentração 20 g /L foi preparada e autoclavada a 121°C por 15 minutos. Em seguida, o meio foi despejado em tubos de ensaio previamente esterilizados e posicionados de modo a formar uma superfície sólida inclinada. Para a conservação e manutenção das cepas de *Bacillus subtilis* foi realizado repique mensal por estria sinuosa.

4.1.2. Condições de cultivo para o Crescimento Celular

A cultura de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 foi preparada para a fermentação submersa. Para este processo, 15 mL de um meio de cultura contendo glicose (4%) e peptona (1%) foram agitados a 250 rpm em um frasco de Erlenmeyer de 125 mL durante 6 horas, onde posteriormente 10 mL dessa cultura foram transferidas para um novo frasco de 250 mL contendo 100 mL do meio previamente mencionado. A fermentação ocorreu sob as mesmas condições anteriormente mencionadas, com duração de 12 horas.

4.1.3. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre CHNS

A proporção de fonte de carbono e nitrogênio para posterior otimização do meio de cultivo para a produção de proteases em *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 foi determinado através da análise de composição elementar CHNS realizado pelo Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) situado na Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP. O microrganismo cultivado de acordo com o item 4.1.2 foi centrifugado e o pellet resultante foi resuspendido em água destilada e centrifugado novamente. O pellet final foi liofilizado por 24 horas e armazenado em local de baixa umidade. A amostra contendo baixo teor de umidade foi submetida à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro (99,999%) e os gases resultantes dessa combustão foram quantificados em um detector de condutividade térmica.

4.1.4. Determinação do Tempo de Cultivo para Produção de Proteases

A investigação do tempo de cultivo para produção de proteases foi realizada por meio da adição de farinha de soja (5%) ao meio às condições de cultivo de acordo com o item 4.1.2. Uma alíquota foi retirada a cada 12 horas para monitoramento do crescimento celular (OD 600 nm) e produção enzimática.

4.1.5. Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Protease por Fermentação Submersa

A fermentação submersa foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL em meio de cultura previamente esterilizado. Objetivando a produção máxima de proteases, diferentes fontes de carbono, nitrogênio, foram testados no meio de cultivo de acordo com a proporção C/N encontrada descrita pelo item 4.1.3. Para avaliação da fonte de nitrogênio, utilizou-se a glicose como fonte de carbono fixa, e as fontes de nitrogênio foram: nitrato de amônio, extrato de levedura, leite desnatado, sulfato de amônio, citrato de amônio, farinha de soja e peptona. Igualmente, o nitrato de amônio foi selecionado como fonte de nitrogênio fixa, variando-se a fonte de carbono. Os elementos selecionados para avaliação da fonte de carbono foram: extrato de levedura, peptona, citrato de sódio e leite desnatado. O processo ocorreu sob as mesmas condições descritas no item 4.1.2, exceto pelo tempo de fermentação, no qual utilizado o melhor intervalo determinado segundo o item 4.1.4.

4.2. Concentração Celular e Fonte de Protease

4.2.1. Concentração celular

Os substratos fermentados foram centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos. O pellet celular formado foi ressuspenso em água destilada e utilizado para determinar a concentração celular de *Bacillus sp.* por espectrofotometria (abs 620nm) enquanto a fase sobrenadante foi dada como extrato enzimático (fonte de protease).

4.2.2. Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada segundo a metodologia descrita por Charney ;Tomarelli (1947), utilizando-se azocaseína como substrato. Para esta metodologia, 125 µL de extrato enzimático foi incubado com 125 µL de uma solução previamente preparada contendo azocaseína a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0, durante 15 min a 37°C. Em seguida, a reação foi cessada com a adição de 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e, subsequentemente, centrifugada a 6.000 g por 5 min a 25°C. Por fim, 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M, foi adicionado ao sobrenadante. As leituras foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro à 440 nm de absorvância, no qual o branco será dado pela substituição do extrato enzimático por água destilada. A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade enzimática (U), no qual uma unidade equivale a uma certa quantidade de enzimas capazes de aumentar em 1 a absorvância por hora, nestas condições.

4.3. Determinação de Proteínas Totais

As proteínas totais do meio foram quantificadas de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976). Foram incubados 20 μL de amostra e 1000 μL do reagente de Bradford pelo período de 5-60 min à temperatura ambiente. A leitura foi executada em espectrofotômetro com absorvância a 595 nm, e o branco das análises foi dado pela substituição da amostra por água destilada. A curva de calibração foi determinada utilizando-se albumina de soro bovino (BSA).

4.4. Imobilização de Células em Alginato de Cálcio

Devido à alta biocompatibilidade a facilidade de geleificação que apresenta, o alginato é o biomaterial mais aplicado para a imobilização de celular (Hernández *et al.*, 2010) e sua geleificação ocorre na presença de cátions bivalentes, como cálcio. Sendo assim, as células de *Bacillus sp.* foram imobilizadas pelo método de aprisionamento utilizando gel de alginato sódio.

Para esta metodologia, a uma quantidade de células suspensas em água deionizada, foi adicionado uma solução alginato de sódio. Em seguida, realizou-se gotejamento desta mistura, a partir de uma seringa com uma vazão constante, em uma solução previamente preparada de cloreto de cálcio, visando a obtenção de esferas na qual estarão encapsuladas as células de *Bacillus sp.* em alginato. Após o gotejamento de toda a mistura contendo alginato de sódio, as esferas formadas foram curadas na própria solução de cloreto de cálcio (Campos, 2010; Duarte, 2011). Por fim, estas foram retiradas da solução de cloreto de cálcio com auxílio de uma peneira e lavadas em água destilada autoclavada para aplicação no meio de cultura.

4.4.1. Planejamento Experimental para Imobilização Celular

O encapsulamento de células em suportes poliméricos apresenta circunstâncias específicas para cada tipo de célula microbiana. Portanto, para determinação das melhores condições de imobilização de *Bacillus sp.*, foi realizado um Planejamento fracionário do tipo Plackett-Burman com diferentes níveis de concentrações de alginato de sódio, cloreto de cálcio, tempo de cura, agitação das esferas em solução de CaCl_2 e altura da seringa, de acordo com a Tabela 1. Os mesmos foram avaliados quanto à produção de proteases no extrato a partir do processo de fermentação com condições de cultivo descrita no item 4.1.2. Após a triagem das variáveis, a produção foi analisada através da metodologia de superfície de resposta, onde um planejamento central composto (CCD) ²³ foi realizado de acordo com a Tabela 2. Os resultados gerados foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* Minitab.

Tabela 1: Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Plackett-Burman (PB) para imobilização de células em alginato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de Alginato (%)	2	3	4
Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	0,1	0,2	0,3
Volume de inóculo (% v/v)	10	15	20
Agitação (rpm)	100	150	200
Altura da seringa (cm)	10	20	30
Tempo de Cura (h)	12	24	36

Tabela 2. Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Composto Central (CCD) para imobilização de células em alginato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de Alginato (%)	4	5	6
Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	0,3	0,4	0,5
Tempo de Cura (h)	36	48	60

4.4.2. Tempo de Reciclo

A reutilização das células para novos ciclos de fermentações é uma das principais vantagens do processo de imobilização. Portanto, fermentações inoculadas com células imobilizadas com condições de cultivos descritas no item 4.4.1 foram realizadas e, ao fim de cada processo, as esferas foram resgatadas. As mesmas foram gentilmente lavadas com água destilada e transferidas, em ambiente estéril, para um novo frasco com a mesma composição para ser iniciado um novo ciclo de fermentação. Ensaio de atividade enzimática foram realizados ao fim de cada ciclo para avaliação quanto à capacidade de produção de protease de *Bacillus sp.* imobilizada durante o processo fermentativo.

4.4.3. Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

As amostras foram preparadas e fotografadas de acordo com o protocolo para preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando camada de Au estimada em 200 Å para metalização da placa. As análises dos grânulos de alginato de sódio com *Bacillus sp.* imobilizadas para caracterização morfológica da esfera foram executadas pelo Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) situado na Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP.

4.5. Extração em Sistema Bifásico Aquoso (SBA)

A fim de se comparar e determinar as melhores condições de extração de proteases de *Bacillus sp.*, os extratos enzimáticos obtidos pelas fermentações em células imobilizadas descritos no item 4.4.1 foram submetidos ao processo de purificação enzimática utilizando SBA utilizando o sistema PEG/sulfato de amônio. Para determinação das condições ótimas de extração, primeiramente foram estimadas curvas binodais com os sistemas PEG 2000, PEG 4000 e PEG 6000 com sulfato de amônio. A partir dos dados obtidos, foi utilizado o pacote LLSR (Coelho et al., 2019) para determinação das linhas de amarração comuns às 3 curvas e suas respectivas composições globais com diferentes razões de volumes de fases (V_r).

Assim, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 3^3 com sistemas de massa total de 5g, sendo 1g de sobrenadante adicionado (Tabela 3). Os ensaios foram submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos para homogeneização do sistema, e posteriormente centrifugados à 2000 G à 4°C durante 2 min para separação de fases. Os volumes de cada fase foram anotados e alíquotas de ambas as fases foram retiradas para realização de análises de atividade proteolítica e proteínas totais.

Tabela 3: Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 3^3 para extração em SBA.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Comprimento da Linha de Amarração (TLL)	9,42	24,73	40,04
Razão de Volume entre as fases (V_r)	0,75	0,5	0,25
Massa Molecular de PEG (MMPEG)	2000	4000	6000

4.6. Fermentação Extrativa

4.6.1. Condições de Cultivo

As fermentações extrativas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Ooi *et al.* (2011) utilizando sistemas de duas fases aquosas compostos por Polietileno Glicol (PEG) e sulfato de amônio. Os sistemas foram preparados a partir de soluções estoques (50 % p/p) de PEG e soluções estoques de sulfato de amônio (40% p/p). Para determinação das condições ótimas de cultivo, foi realizado um planejamento fatorial completo com adição de quatro pontos centrais de acordo com a Tabela 4. Os resultados foram analisados por meio do *software* Minitab.

Foram preparados frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 g de meio de cultivo contendo o sistema bifásico aquoso ou controle (meio sem reagentes formadores de fase). Após a autoclavagem e resfriamento dos meios, 10g de inóculo foi adicionado e os frascos foram mantidos sob agitação a 250 rpm e temperatura ambiente. Ao fim de 48 horas, o extrato foi deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente para a separação de fases. Aliquotas foram retiradas de cada fase para realização de análises de atividade proteolítica (item 4.2.2) e proteínas totais (item 4.3). Os mesmos ensaios analíticos foram realizados para os meios de fermentação controle.

Tabela 4: Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 para fermentação extrativa.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Massa Molecular de PEG	2000	4000	6000
Concentração de PEG	10	15	20
Concentração de Sulfato de Amônio	15	17,5	20

4.7. Metodologia de Análise dos Resultados

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata, onde foi calculado o desvio padrão para cada amostra em particular.

Os resultados obtidos, bem como os ajustes de curvas e outros dados encontrados serão plotados utilizando o *software* Excel. Os resultados dos planejamentos experimentais serão analisados com o auxílio do programa Minitab.

Para analisar os estudos de produção, extração e purificação, serão levados em conta parâmetros tais como:

4.7.1. Rendimento da extração em SBA:

O rendimento da extração em SBA da protease (η %) será calculado de acordo com a Equação 1:

$$\eta^x(\%) = \frac{100}{\left(\frac{V_x \times C_x}{V_t \times C_t}\right)} \quad (1)$$

Onde que V_x é o volume da fase em que a protease é extraída; C_x é a concentração de protease na fase de extração; V_t é o volume total do sistema; e C_t é a concentração total de protease no sistema.

4.7.2. Coeficiente de partição

O coeficiente de partição de proteínas (K_p) será obtido pela razão entre a concentração de proteínas totais (mg/ml) na fase superior (fs) e a fase inferior (fi), segundo a Equação 2. O coeficiente de partição da protease (K_e) será determinado pela razão entre a atividade enzimática (U/ml) na fase superior (fs) e a fase inferior (fi), de acordo com a Equação 3.

$$K_p = \frac{[proteína]_{fs}}{[proteína]_{fi}} \quad (2)$$

$$K_e = \frac{atividade_{fs}}{atividade_{fi}} \quad (3)$$

4.7.3. Rendimento de Extração em Fermentação Extrativa

O rendimento da extração da protease (Y) será calculado de acordo com a seguinte equação, onde V_R é dado pela razão entre os volumes das fases superior e inferior (Ooi *et al.*, 2011).

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + \left[\frac{1}{V_R \times K_e} \right]} \quad (4)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microrganismo e Condições de Cultivo

5.1.1. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre CHNS

A análise elementar CHNS é de fundamental importância para determinação precisa de absorção de fontes de carbono e nitrogênio para o organismo que está sendo estudado. Nesse caso, o perfil CHNS mostrou para *B. subtilis* CBMAI 1302 46% de carbono e 8% de nitrogênio, de acordo com a Figura 3 e Tabela 5. Essa porcentagem pode ser definida também como proporção $C_1N_{0.17}$ ou 5,75 C/N para carbono e nitrogênio, respectivamente. Sendo assim, essa proporção foi definida para os estudos posteriores de otimização de fonte de carbono e nitrogênio para produção de proteases.

Figura 3. Perfil de sinal de CHNS obtido para *Bacillus subtilis* CBMAI-1302

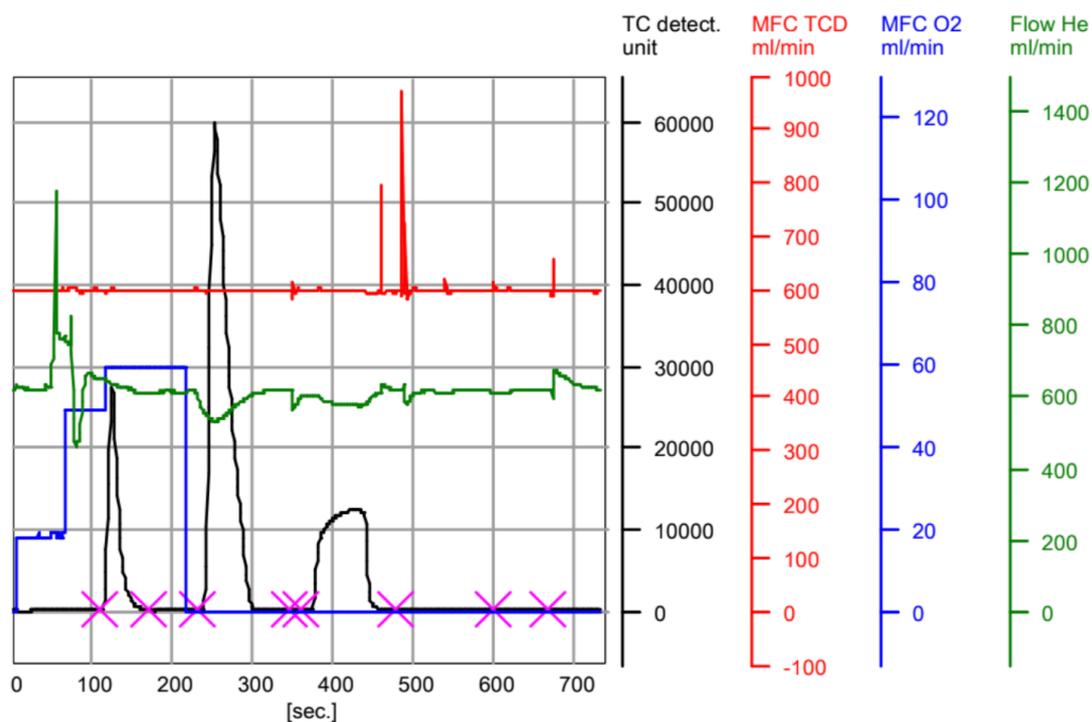


Tabela 5. Composição CHNS obtida para *Bacillus subtilis* CBMAI-1302

Nome	Peso (mg)	Método	Umidade (%)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
------	--------------	--------	-------------	-------	-------	-------	-------

<i>Bacillus subtilis</i> CBMAI-1302	47,9640	plant	0	8,11	46,06	7,023	0,334
----------------------------------------	---------	-------	---	------	-------	-------	-------

Tanto o carbono quanto o nitrogênio são vitais para o crescimento e funcionamento das células microbianas. O carbono atua como unidade estrutural, bem como fonte de energia para os microrganismos, ao passo que o nitrogênio presente na matéria-prima facilita a síntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (Khanal, Nindhia e Nitayavardhana, 2019). De acordo com DAUNER; STORNI; SAUER, (2001) comparadas às culturas com limitação de carbono (C), as culturas de excesso de carbono exibem geralmente altas taxas de consumo de substrato e baixos rendimentos de biomassa e, portanto, têm uma baixa eficiência de crescimento energético.

5.1.2. Determinação do Tempo de Cultivo para Produção de Proteases

A partir das análises das alíquotas retiradas durante as fermentações, o perfil de crescimento celular de *B. subtilis* CBMAI-1302, bem como sua produção enzimática foram avaliados. A produção de proteases aumentou gradualmente, onde o maior valor de atividade proteolítica foi observado em 60h de fermentação, atingindo 5,8 U/mL (Figura 4). Em termos de crescimento microbiano, nota-se que o fim da fase exponencial foi atingido em 24h, permanecendo em fase estacionária até 72h (Figura 5). Geralmente, o tempo necessário para a produção ótima de protease por bactérias ou fungos pode levar de 48 h a 9 dias de fermentação (Sharma *et al.*, 2017).

Figura 4. Atividade proteolítica de *B. subtilis* CBMAI-1302 utilizando farinha de soja

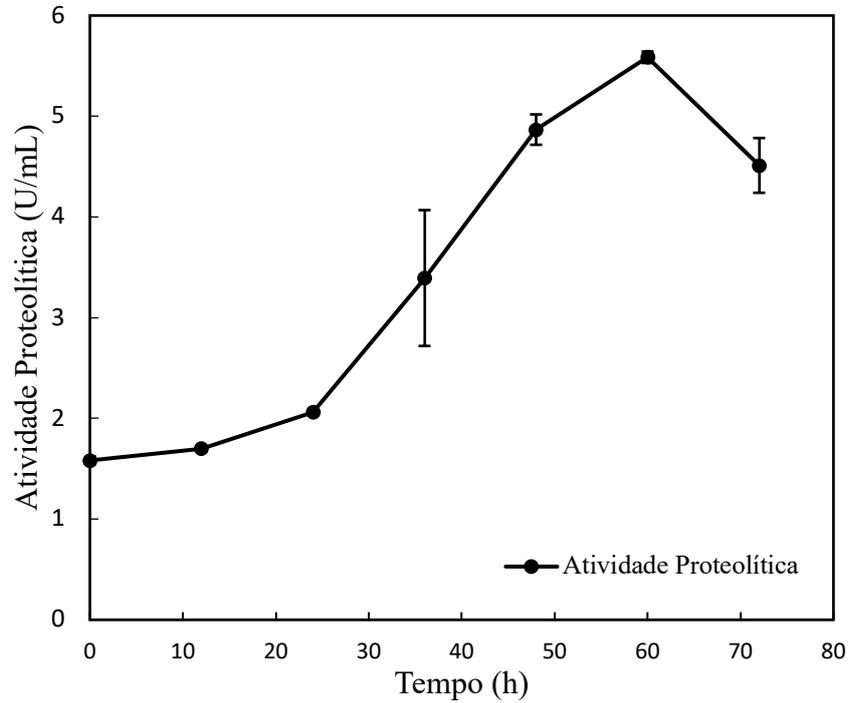
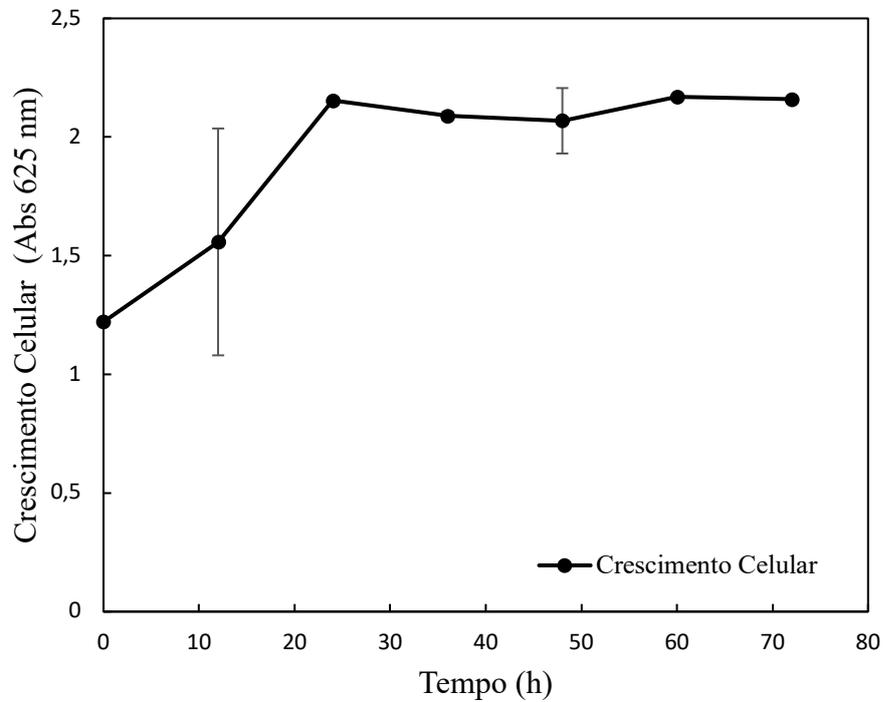


Figura 5. Crescimento celular de *B. subtilis* CBMAI-1302 utilizando farinha de soja



SHAIKH et al. (2023) avaliaram a produção de protease alcalina a partir de *Bacillus nakamurai* PL4, bem como sua homologia com outras linhagens através de análises filogenéticas, onde os estudos apontaram que a produção de protease atingiu seu máximo valor

em 72 horas de incubação, em pH 8. Por outro lado, OLAJUYIGBE; AJELE, (2005) investigaram a atividade proteolítica de diferentes espécies de bactérias do gênero *Bacillus* isoladas do solo, e notaram que, para três espécies, o crescimento e a produção máxima da enzima foram observados para as em 48 h quando cultivados em frascos de 50 ml (pH 8,0) a 60°C.

Portanto, com base nos resultados indicados, o tempo de 60h foi escolhido como a duração da fermentação submersa para produção de proteases por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302.

5.1.3. Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Protease por Fermentação Submersa

Estabelecido a proporção de carbono e nitrogênio (item 5.1.1), iniciou-se a otimização de condições de cultivo de *B. subtilis* CBMAI 1302 para produção de proteases. Para seleção das melhores fontes de carbono e nitrogênio, a proporção C:N utilizada foi 5,75 de carbono para 1 de nitrogênio. Sendo assim, a glicose foi escolhida como fonte de carbono fixa (10 g/L), onde as fontes diferentes fontes de nitrogênio (1,74 g/L) foram avaliadas, sendo elas: Nitrato de amônio, extrato de levedura, leite desnatado, sulfato de amônio, citrato de amônio, farinha de soja e peptona. Da mesma forma, o nitrato de amônio foi selecionado como fonte de nitrogênio fixa, variando-se a fonte de carbono com os seguintes elementos: extrato de levedura, peptona, citrato de sódio e leite desnatado.

Os resultados indicados pela Figura 6 mostram uma alta produção de protease quando o leite desnatado foi utilizado como fonte de nitrogênio, atingindo 24,81 U/mL, ao passo que o menor valor foi registrado ao empregar citrato de amônio (0,36 U/mL). Similarmente, resultados abaixo inferiores a 1 U/mL também foram observados para nitrato de amônio, sulfato de amônio e peptona. No que diz respeito à seleção de fonte de carbono, a Figura 7 aponta que o extrato de levedura apresentou o melhor desempenho entre as fontes selecionadas, com atividade 5,37 U/mL, e a menor atividade foi observada com a utilização de citrato de sódio.

Figura 6. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio para produção de proteases em *B. subtilis* CBMAI-1302.

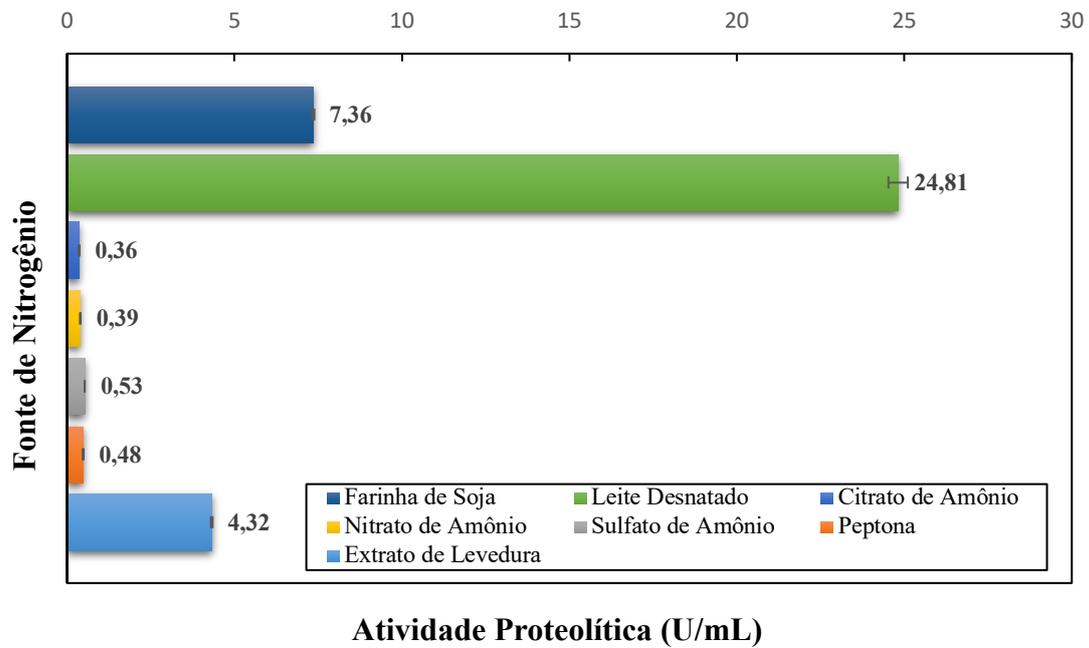
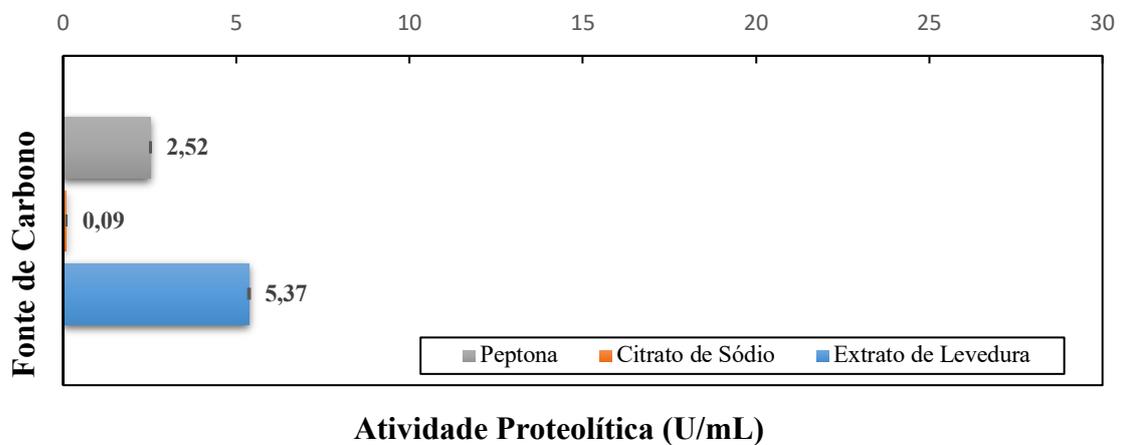


Figura 7. Avaliação de diferentes fontes de carbono para produção de proteases em *B. subtilis* CBMAI-1302.

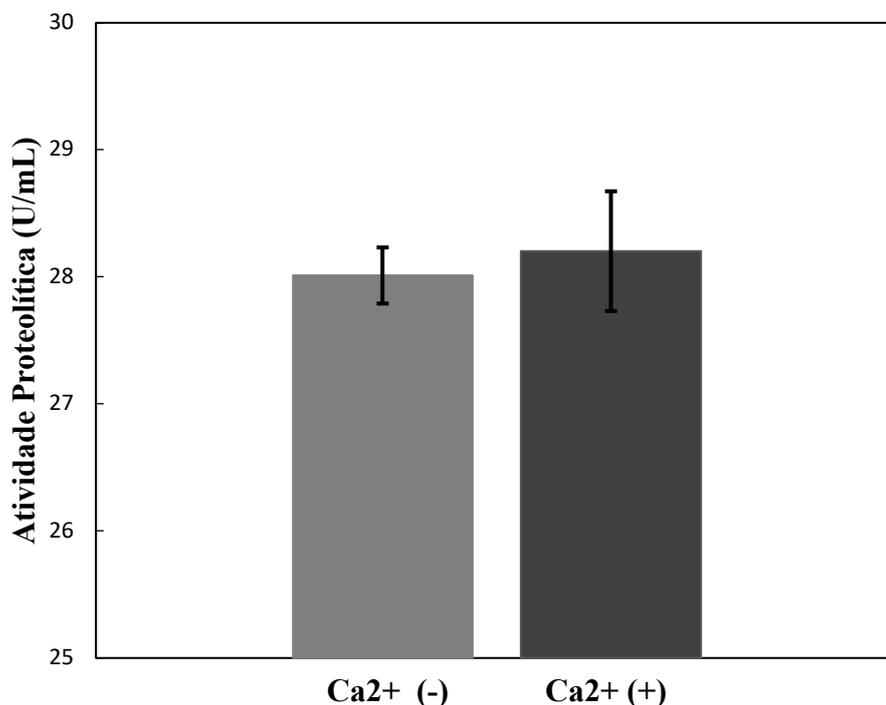


O nitrato de amônio foi fixado como fonte de nitrogênio para avaliação de fontes de carbono pelo fato de o amônio ser, geralmente, a fonte de nitrogênio preferida para *Bacillus*, onde quase todos os compostos orgânicos de nitrogênio podem ser derivados do amônio, e a maioria das fontes de nitrogênio precisa ser convertida primeiramente em amônio antes de ser utilizada em vias de biossíntese (He *et al.*, 2022). DO NASCIMENTO; MARTINS, (2004) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio para produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2, onde dentre as diversas fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, a utilização de nitrato de amônio obteve o melhor resultado. Por outro lado, RAHMAN; BASRI; SALLEH, (2002) estudaram a produção de protease extracelular termoestável por *Bacillus stearothermophilus* F1, onde observaram que produção e o crescimento foram muito baixos quando a bactéria foi cultivada na presença de fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato de amônio).

A utilização de glicose como fonte de carbono foi definida a partir de dados da literatura. Por exemplo, GUL *et al.*, (2015) investigaram diferentes fontes de carbono, onde resultados apontaram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para a produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus subtilis* IC-5. Contudo, um estudo elaborado por SEN; DASU VEERANKI; MANDAL, (2009) reportou um aumento geral de 6,2 vezes na atividade específica de proteases alcalinas produzidas por *B. pseudofirmus* SVB1 utilizando a caseína como única fonte de carbono e nitrogênio no meio. Além disso, DURGA DEVI; GEETHA; KALAICHELVAN, (2018) identificaram que uma protease produzida em *Bacillus sp.* DK1 também apresentou atividade relativa máxima sobre o substrato caseína, na qual foi fortemente aumentada na presença de íons metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Sendo assim, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, testou-se a utilização dos candidatos que obtiveram os melhores resultados (leite desnatado e extrato de levedura), para comparação da produção de proteases. Adicionalmente, o íon Ca^{2+} foi adicionado na tentativa de identificar se sua presença levaria a um aumento da atividade proteolítica, uma vez que íons metálicos podem proteger a enzima contra desnaturação devido à temperatura, além de manter sua conformação na forma ativa (Durga Devi, Geetha e Kalaichelvan, 2018). Portanto, para os experimentos, testou-se os seguintes componentes em suas respectivas concentrações: leite desnatado (10 g/L), extrato de levedura (1,74 g/mL) e cloreto de cálcio (1g/L) para fermentações com presença de íons Ca^{2+} .

Figura 8. Comparação da atividade proteolítica dos melhores candidatos (leite desnatado e extrato de levedura) na presença (+) e ausência (-) de íons Ca^{2+} .



Os resultados indicados pela *Figura 8* mostram que a combinação dos dois melhores candidatos elevou a atividade proteolítica de 28,01 U/mL e 28,2 U/mL para presença e ausência de íons Ca^{2+} na fermentação, respectivamente. Isso corresponde a um aumento de aproximadamente 13% da atividade enzimática. De acordo com PRAKASH et al., (2011), o leite é um composto ideal para o crescimento de microrganismos devido aos seus constituintes nutricionais, que contêm proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. Contudo, a presença de CaCl_2 na cultura não provocou um aumento significativo na produção de proteases. Portanto, sua adição não foi considerada para a sequência de experimentos deste trabalho.

5.2. Imobilização de Células em Alginato de Cálcio

Para investigação da imobilização de células de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 em esferas de alginato de cálcio com o objetivo de promover a produção de proteases extracelulares, foi realizado, inicialmente, um planejamento do tipo Plakett-Burman (PB). Este tipo de design tem como finalidade a investigação inicial dos efeitos principais de cada variável estudada. Esta abordagem é comumente empregada como o primeiro passo, uma vez que apresenta um número menor de experimentos quando comparado ao planejamento fatorial completo. Dessa forma, é

possível abranger uma maior quantidade de variáveis a serem estudadas. No planejamento, 6 fatores foram inicialmente avaliados: concentração de alginato de sódio (%), concentração de cloreto de cálcio (M), volume de inóculo (% v/v), agitação das esferas na solução de CaCl₂ (rpm), altura da seringa (cm) e tempo de cura das esferas em solução de alginato de cálcio (h). Além disso, 3 pontos centrais foram adicionados ao planejamento, totalizando 15 experimentos. A Tabela 6 indica os níveis superiores e inferiores não codificados de cada variável, bem como a resposta encontrada para cada condição.

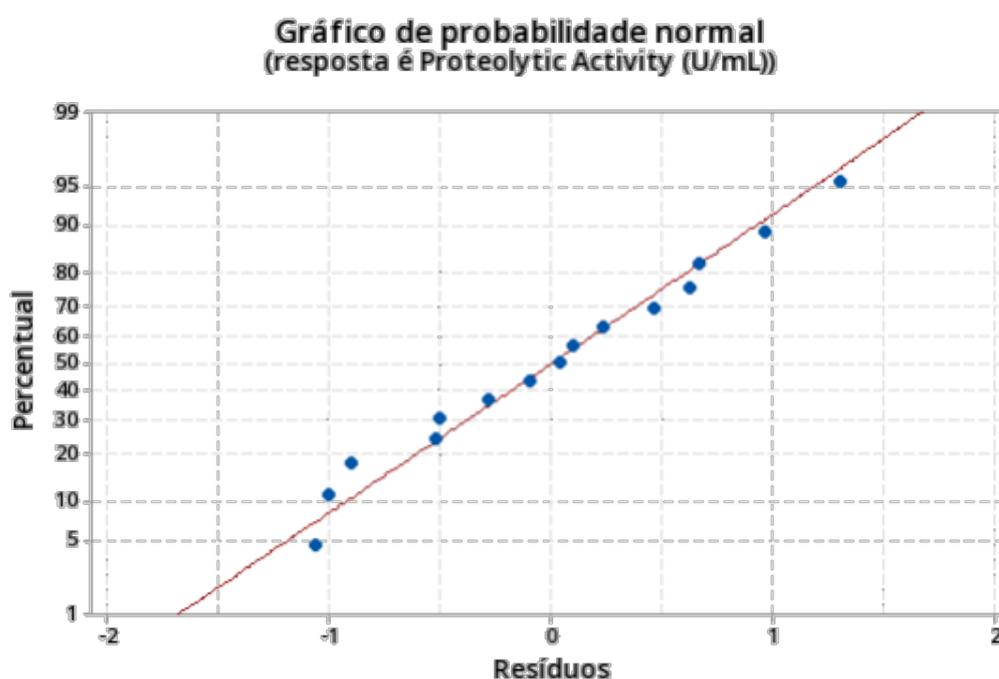
Tabela 6. Matriz do Planejamento Plackett Burman. A - Concentração de Alginato de Sódio (%); B - Concentração de Cloreto de Cálcio (M); C - Volume de inóculo (% v/v); D - agitação das esferas na solução de CaCl₂ (rpm); E - altura da seringa (cm); F- tempo de cura das esferas em solução de cloreto de cálcio (h). Resposta: Atividade Proteolítica (U/mL)

Ordem	A	B	C	D	E	F	Atividade Prot. (U/mL)
1	4	0,1	20	100	10	12	14,86
2	4	0,3	10	200	10	12	18,05
3	2	0,3	20	100	30	12	17,62
4	4	0,1	20	200	10	36	19,61
5	4	0,3	10	200	30	12	18,20
6	4	0,3	20	100	30	36	21,51
7	2	0,3	20	200	10	36	19,05
8	2	0,1	20	200	30	12	14,15
9	2	0,1	10	200	30	36	17,67
10	4	0,1	10	100	30	36	18,13
11	2	0,3	10	100	10	36	17,99
12	2	0,1	10	100	10	12	15,69
13	3	0,2	15	150	20	24	20,46
14	3	0,2	15	150	20	24	21,01
15	3	0,2	15	150	20	24	21,44

Para avaliar o planejamento, as esferas produzidas sob cada condição de imobilização estabelecida pelo design foram submetidas à fermentação submersa sob as mesmas circunstâncias anteriormente estabelecidas com a produção enzimática de células livres (10 g/L de leite desnatado, 1,74 g de extrato de levedura, 60 h). Ao fim de cada fermentação, a atividade proteolítica foi mensurada. A maior atividade proteolítica foi 21,51, sendo obtida quando as esferas foram produzidas com 4% de alginato de sódio, 0,3% de cloreto de cálcio, 20% de volume de inóculo de esferas na fermentação, com agitação de formação de esferas à 100 rpm e tempo de cura das esferas em solução de cloreto de cálcio de 36 h.

Antes da análise do planejamento experimental, é importante analisar seus resíduos a fim de identificar possíveis outliers e comportamentos que possam afetar a qualidade e interpretação dos resultados. Sendo assim, o gráfico de probabilidade Normal dos resíduos foi analisado (Figura 9), onde pode ser observado que os resíduos se encontram distribuídos próximos à reta Normal e, portanto, seguem uma distribuição normal.

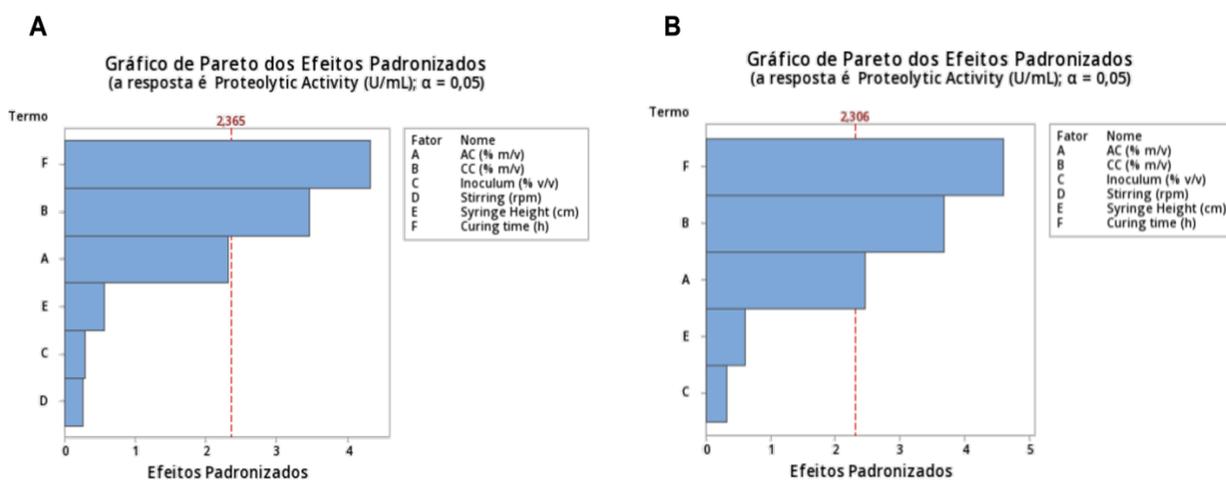
Figura 9. Gráfico de probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Plackett-Burman.



O gráfico de Pareto é um recurso visual que facilita a interpretação estatísticas dos efeitos. Os efeitos são categorizados de forma hierárquica de acordo com sua influência na resposta. A linha vermelha indica o p-valor com 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Dessa forma, é possível identificar quais termos são significativos para o modelo gerado, e quais variáveis podem ser removidas, se necessário, a fim de ajustar de se ajustar a equação para melhor predição da resposta. De acordo com a Figura 10 (A), o tempo de cura e a concentração de cloreto de cálcio foram significativos considerando um intervalo de confiança de 95%. Contudo, é possível notar que a concentração de alginato de cálcio se aproxima do limite do p-valor. Sendo assim, o termo que apresentou menor contribuição para o modelo à 5% de confiança (agitação), foi retirado do modelo e uma nova análise foi gerada. A Figura 10 (B) ilustra o gráfico de Pareto gerado para a nova análise, onde então é possível notar que a

concentração de alginato de sódio foi incluída como um efeito significativo a um intervalo de 95% de confiança no modelo gerado.

Figura 10. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Plackett-Burman. A - Considerando todos os termos no modelo. B - Após a remoção do termo agitação do modelo



A tabela de coeficientes Planejamento Plackett-Burman (Tabela 7) confirma o p-valor a 95% de confiança para os termos anteriormente discutidos como significativos ($p < 0,05$) para o modelo, além disso, os fatores de inflação de variância (VIF) apresentam baixos valores (< 5), indicando que os termos do presente modelo não estão correlacionados. Além disso, o valor de R^2 para indica que o modelo explica 89,61% da variação da atividade proteolítica. Portanto, o Planejamento de Plackett-Burman permitiu identificar que, entre 6 variáveis analisadas, a concentração de alginato de sódio, a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de cura das esferas em solução de cloreto de cálcio contribuem significativamente ($\alpha = 0,05$) para a produção de proteases por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 imobilizados em esferas.

Tabela 7. Tabela de coeficientes codificados para o Planejamento Plackett-Burman.

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante		17,716	0,278	63,79	0,000	
AC (% m/v)	1,369	0,684	0,278	2,46	0,039	1,00
CC (% m/v)	2,052	1,026	0,278	3,69	0,006	1,00
Inoculum (% v/v)	0,178	0,089	0,278	0,32	0,757	1,00

Syringe Height (cm)	0,338	0,169	0,278	0,61	0,560	1,00
Curing time (h)	2,564	1,282	0,278	4,62	0,002	1,00
Pt Ct		3,259	0,621	5,25	0,001	1,00

Tabela 8. Sumário do modelo do Planejamento Plackett-Burman.

S	R2	R2(aj)
0,962055	89,61%	81,82%

A partir dos resultados encontrados no *screening* de variáveis obtidos por meio do planejamento de Plackett-Burman, a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi analisada através do Planejamento Central Composto (CCD) de dois níveis. Este tipo de planejamento tem como objetivo a compreensão, através de análises estatísticas, da influência dos efeitos principais e secundários sobre a resposta desejada, através da geração de um modelo polinomial de segunda ordem. O CCD é comumente empregado para otimização da resposta, uma vez que apresenta curvatura em seu modelo, permitindo o ajuste de dados e visualização gráfica por meio de gráficos de superfície de resposta. Sendo assim, as variáveis avaliadas neste planejamento foram: concentração de alginato de sódio (%), concentração de cloreto de cálcio (M) e tempo de cura (h). As células foram imobilizadas fixando a agitação à 100 rpm e inoculando 10% (v/v) de esferas para cada fermentação. A Tabela 9 indica os valores dos níveis não codificados estabelecidos para cada variável, bem como a resposta obtida em cada experimento realizado.

Tabela 9. Matriz do Planejamento Central Composto. A - Concentração de Alginato de Sódio (%); B - Concentração de Cloreto de Cálcio (M); C - Tempo de Cura das esferas em solução de cloreto de cálcio (h). Resposta - Atividade Proteolítica (U/mL).

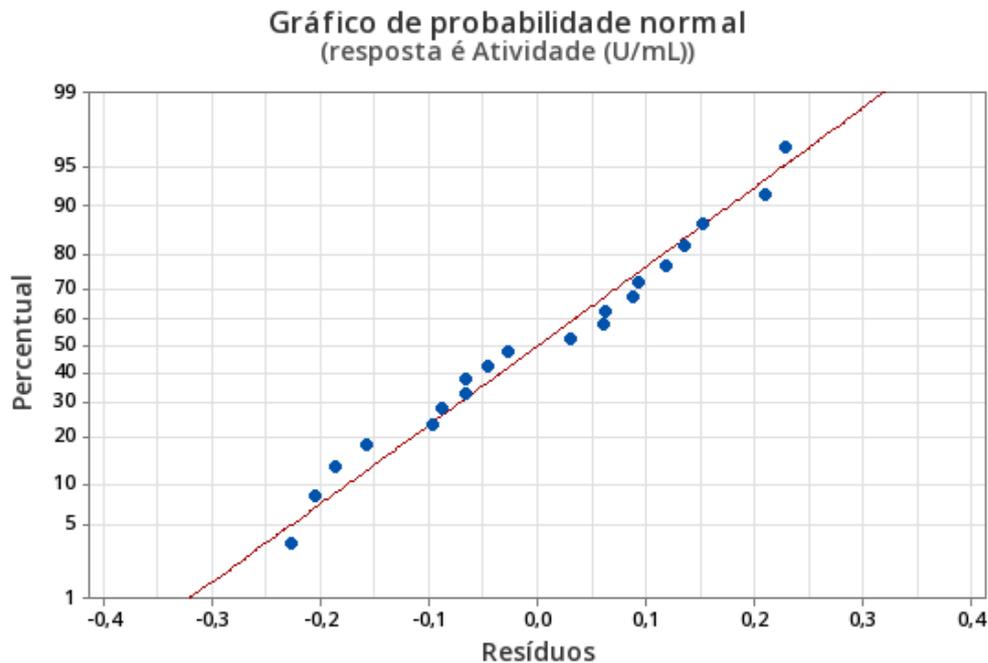
Ordem	A	B	C	Atividade Prot. (U/mL)
1	4	0,3	36	17,14
2	6	0,3	36	16,75
3	4	0,5	36	18,10
4	6	0,5	36	18,14
5	4	0,3	60	15,63
6	6	0,3	60	16,01
7	4	0,5	60	16,61
8	6	0,5	60	17,87
9	3,32	0,4	48	16,07

10	6,68	0,4	48	16,27
11	5	0,23	48	15,90
12	5	0,57	48	18,29
13	5	0,4	27,82	17,88
14	5	0,4	68,18	16,30
15	5	0,4	48	16,40
16	5	0,4	48	16,60
17	5	0,4	48	16,53
18	5	0,4	48	16,26
19	5	0,4	48	16,68
20	5	0,4	48	16,38

Comparado ao planejamento anterior, os valores encontrados para atividade enzimática após a fermentação realizada pelas esferas imobilizadas em cada condição estabelecida apresentaram menor diferença. De acordo com o planejamento, a maior produção de proteases, com atividade de 18,29 U/mL foi atingida utilizando 5% de alginato de sódio, 0,57 M de cloreto de cálcio e 48h de cura das esferas. O menor valor de atividade enzimática (15,63 U/mL) foi observado quando as esferas foram produzidas utilizando 4% de alginato de sódio, 0,3M de cloreto de cálcio e 60 h de cura das esferas em solução de CaCl₂.

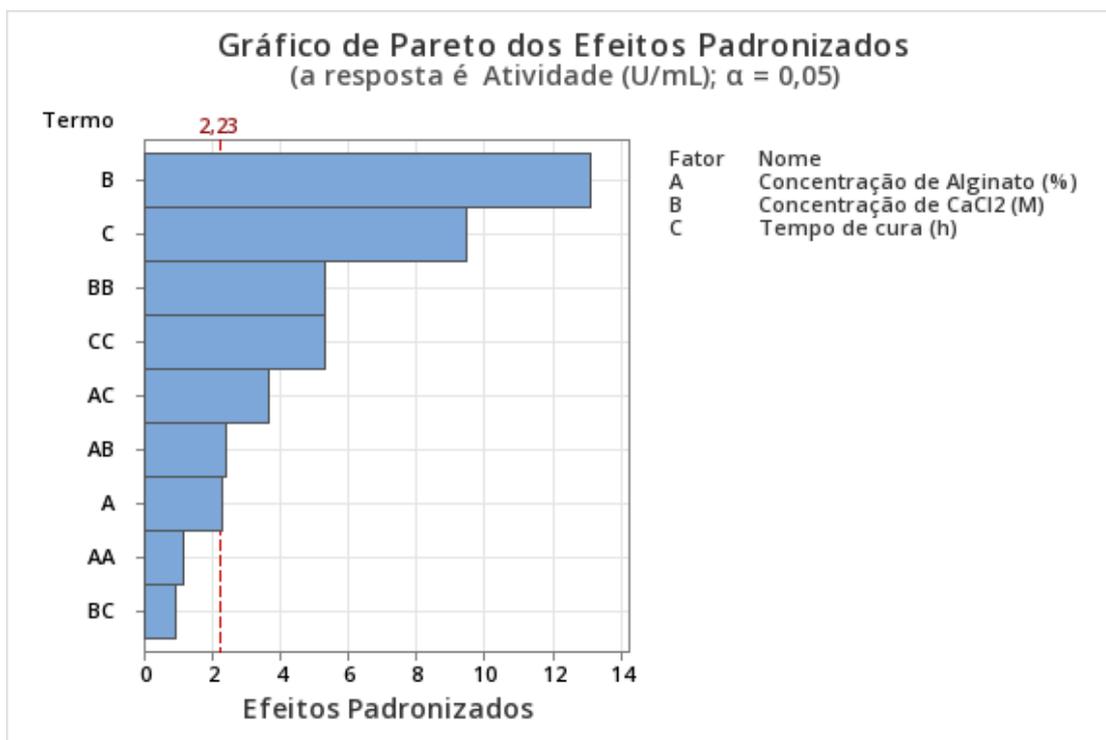
Novamente, a distribuição de resíduos foi avaliada antes de iniciar a avaliação do presente planejamento. De acordo com a Figura 11, os resíduos estão distribuídos próximos à reta Normal, indicando que não há anomalias como a presença de outliers nos resultados. Em sequência, os resultados foram estatisticamente analisados considerando um intervalo de confiança de 95%.

Figura 11. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Composto Central 2^3 .



Segundo indicado pelo gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 12), os efeitos lineares da concentração de alginato, concentração de CaCl_2 e o tempo de cura, bem como os efeitos quadráticos da concentração de CaCl_2 e o tempo de cura foram considerados contribuem significativamente para resposta no modelo gerado. Além disso, as interações da concentração de alginato com o tempo de cura, e da concentração de alginato com a concentração de cloreto de cálcio também foram significativas à 95% de confiança. O efeito quadrático da concentração de alginato de sódio e interação entre a concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura não contribuíram significativamente ($\alpha = 0,05$) para o modelo.

A tabela de coeficientes codificados do Planejamento Composto Central 2^3 (Tabela 10) confirma o p-valor dos parâmetros anteriormente discutidos. Adicionalmente, o VIF encontrado para cada termo apresenta um baixo valor (< 5), indicando que os termos do presente modelo não estão correlacionados. O valor de R^2 de 97,19% encontrado pela análise de regressão (Tabela 11) indica mais de 97% da variação da atividade proteolítica pode ser explicada pela equação gerada, indicando que o presente modelo é preditivo para a resposta analisada.

Figura 12. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do planejamento composto central 2³.Tabela 10. Coeficiente Codificados do Planejamento Composto Central 2³.

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	16,4727	0,0773	213,06	0,000	
Concentração de Alginato (%)	0,1195	0,0513	2,33	0,042	1,00
Concentração de CaCl ₂ (M)	0,6746	0,0513	13,15	0,000	1,00
Tempo de cura (h)	-0,4873	0,0513	-9,50	0,000	1,00
Concentração de Alginato (%) * Concentração de Alginato (%)	-0,0598	0,0499	-1,20	0,259	1,02
Concentração de Alginato (%) * Concentração de CaCl ₂ (M)	0,2664	0,0499	5,34	0,000	1,02
Concentração de CaCl ₂ (M) * Concentração de CaCl ₂ (M)	0,2664	0,0499	5,34	0,000	1,02
Tempo de cura (h) * Tempo de cura (h)	0,2664	0,0499	5,34	0,000	1,02
Concentração de Alginato (%) * Concentração de CaCl ₂ (M)	0,1640	0,0670	2,45	0,034	1,00
Concentração de Alginato (%) * Tempo de cura (h)	0,2467	0,0670	3,68	0,004	1,00
Concentração de CaCl ₂ (M) * Tempo de cura (h)	0,0627	0,0670	0,94	0,372	1,00

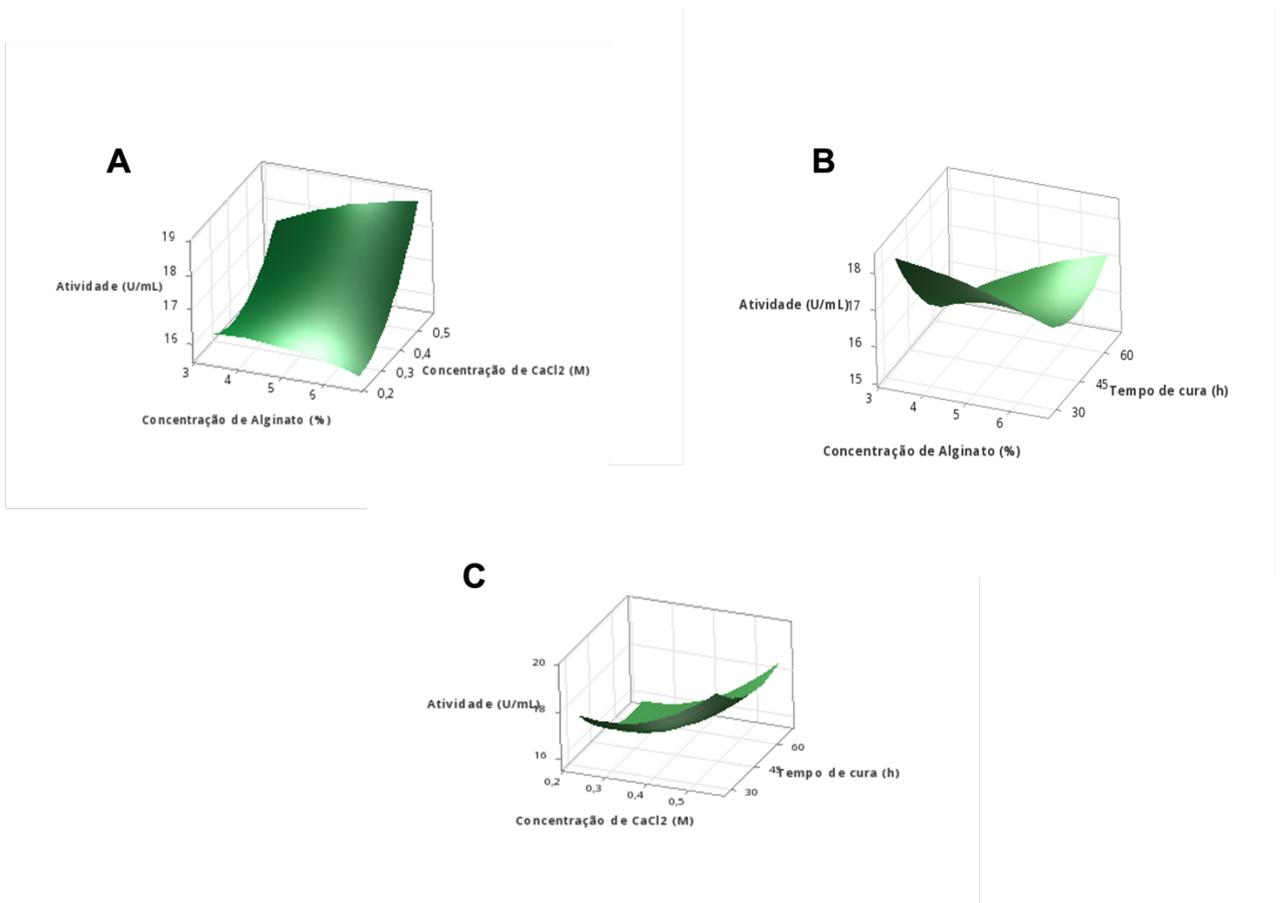
Tabela 11. Sumário do Modelo do Planejamento Composto Central 2³.

S	R2	R2(aj)
0,189568	97,19%	94,66%

Os gráficos de superfície de resposta combinando os diferentes parâmetros do presente Planejamento Composto Central foram gerados e analisados visualmente. De acordo com a Figura 13 A, a atividade enzimática é maior quando nos maiores níveis de concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio. Segundo a Figura 13 B, a atividade proteolítica é maior o no nível inferior do tempo de cura e superior na concentração de alginato. Similarmente, o mesmo comportamento para o tempo de cura pode ser observado na Figura 13 C, onde a maior produção de proteases foi encontrada no nível inferior do tempo de cura e nas maiores concentrações de cloreto de cálcio.

É possível observar o comportamento, para os três gráficos, de que as melhores condições foram encontradas em suas inclinações mais íngremes para os parâmetros alginato de sódio e cloreto de cálcio, fortemente sugerindo que a otimização destas variáveis ainda não estava completa. Quanto ao tempo de cura, as maiores atividades foram registradas no nível inferior, correspondendo a 36h. É importante analisar, neste ponto, que o planejamento anterior (PB), investigou o tempo de cura de 12h a 36h como nível inferior e superior do planejamento, respectivamente, e a atividade obteve os melhores resultados quando as esferas eram produzidas à 36h em solução de alginato de cálcio. Sendo assim, esta análise permite concluir que o tempo de 36h pode ser estabelecido como o valor ótimo para a cura das esferas, não sendo necessário incluir esta variável em um novo planejamento.

Figura 13. Gráfico de superfície de Resposta Planejamento Composto Central 2³. A - Eixo X: Concentração de Alginato; Eixo Y: Concentração de CaCl₂ (M); Valor fixo de tempo de cura em 48h. B - Eixo X: Concentração de Alginato (%); Eixo Y: Tempo de Cura (h); Valor fixo de Concentração de CaCl₂ em 0,4 M. C – Eixo X: Concentração de CaCl₂ (M); Eixo Y: Tempo de Cura (h); Valor fixo de Concentração de Alginato em 5%.



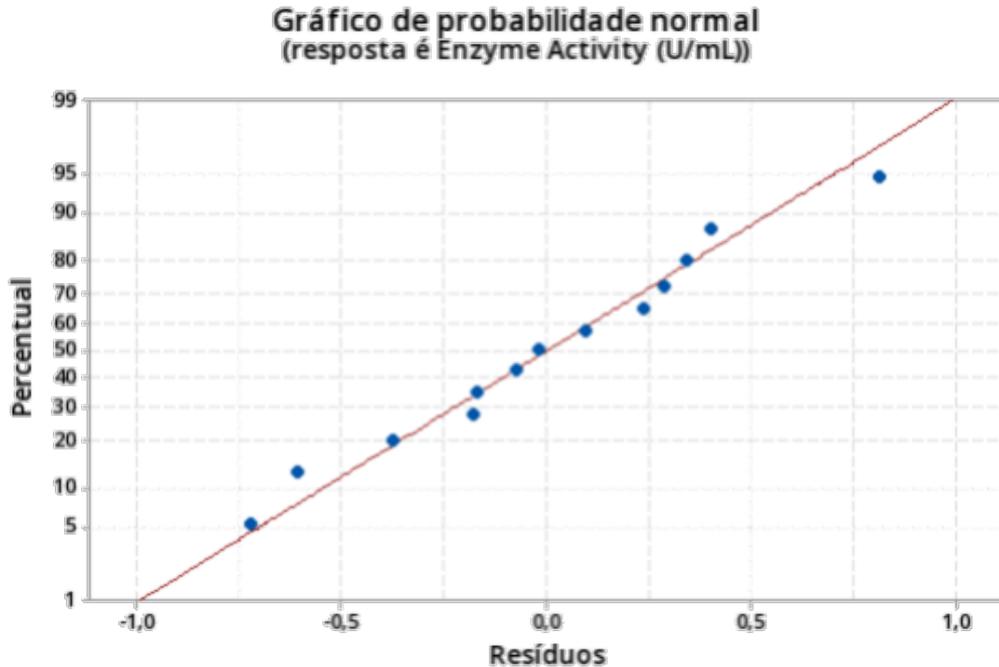
Portanto, um novo Planejamento Composto Central de duas variáveis foi desenhado. Para este design, a concentração de alginato foi de 6% e 7% nos níveis inferior e superior, respectivamente, e a concentração de cloreto de cálcio foi avaliada entre 0,5 M e 0,7 M para o nível inferior e superior. A Tabela 12 indica as condições estabelecidas para cada experimento, bem como a resposta, atividade proteolítica (U/mL), encontrada para cada experimento de imobilização de células de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302. A maior atividade enzimática foi registrada quando as esferas foram produzidas com 6% de alginato de sódio e 0,7M de cloreto de cálcio, atingindo 24,11 U/mL. Por outro lado, a menor atividade foi observada quando ambas os parâmetros estudados se encontravam no nível superior (7% de alginato de sódio e 0,7 M de CaCl₂), como o valor de 16,71 U/mL para atividade proteolítica.

Tabela 12. Matriz do Planejamento Central Composto 2^2 . A - Concentração de Alginato de Sódio (%); B - Concentração de Cloreto de Cálcio (M). Resposta - Atividade Proteolítica (U/mL).

Ordem	A	B	Atividade Prot. (U/mL)
1	6	0,5	20,80
2	7	0,5	23,03
3	6	0,7	24,11
4	7	0,7	16,71
5	5,79	0,6	19,92
6	7,21	0,6	17,44
7	6,5	0,46	22,62
8	6,5	0,74	22,14
9	6,5	0,6	22,30
10	6,5	0,6	22,10
11	6,5	0,6	22,81
12	6,5	0,6	22,76
13	6,5	0,6	22,40

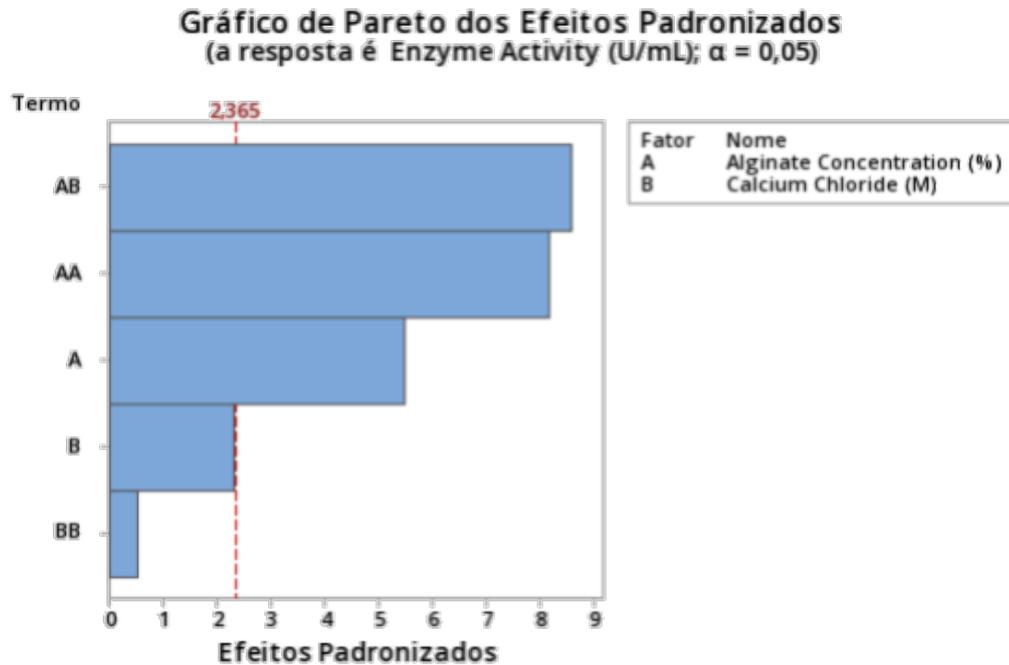
Novamente, o gráfico da distribuição de resíduos foi avaliado antes de iniciar o estudo dos resultados estatísticos gerados pelo CCD. A Figura 14 apresenta o gráfico de distribuição normal de resíduos para atividade enzimática. Pode ser observado que os resíduos se encontram distribuídos próximos à reta Normal, indicando que não há nenhum comportamento diferente, como a presença de outliers, por exemplo. Sendo assim, os resultados do planejamento foram analisados estatisticamente, considerando um intervalo de 95% de confiança.

Figura 14. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Composto Central 2².



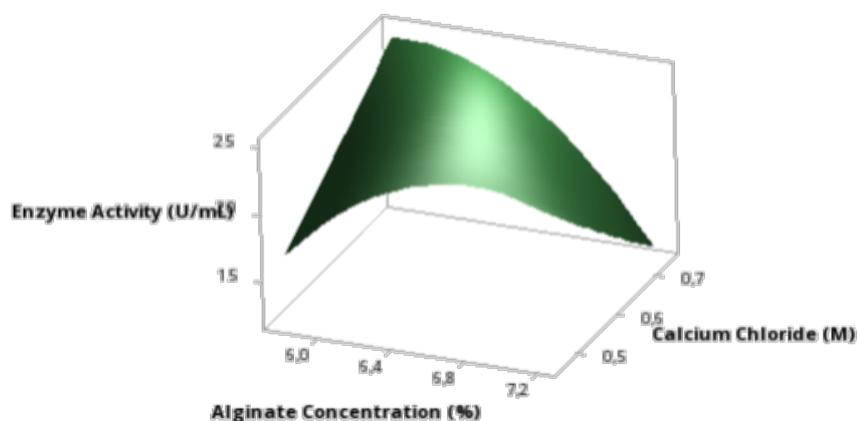
O gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do planejamento composto central, representado na Figura 15, indica que a o efeito linear e quadrático da concentração de alginato de sódio, bem como a interação da concentração de alginato e de cloreto de cálcio foram estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$) para equação do modelo gerado no presente planejamento. Além disso, é possível observar que o efeito linear da concentração de cloreto de cálcio se encontra muito próximo à linha de referência para significância estatística quando $\alpha = 0,05$. Se um intervalo de confiança menor fosse considerado, ou o termo quadrático da concentração de cloreto de cálcio fosse removido do modelo, há uma probabilidade de que este termo fosse considerado também estatisticamente significativo para o modelo gerado.

Figura 15. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Composto Central 2².



Após a análise do gráfico de Pareto dos efeitos, o gráfico de superfície de resposta do planejamento composto central foi gerado (Figura 16). No eixo X, encontra-se a concentração de alginato de sódio, e no eixo Y, a concentração de CaCl_2 , onde a resposta avaliada foi a atividade enzimática. Pelo gráfico, é possível observar que os melhores valores para produção de proteases são obtidos para maiores concentração de cloreto de cálcio e menores concentrações de alginato de sódio. Essas observações são condizentes com os resultados encontrados anteriormente na Tabela 12, indicando que o gráfico de superfície de resposta é um recurso útil no auxílio da visualização e interpretação de resultados obtidos pelo planejamento. Sendo assim, comparado os resultados com o planejamento composto central composto, pode-se dizer que a região ótima de alginato de sódio foi encontrada, uma vez que o design anterior avaliou a região entre 5 e 6%, e o presente design iniciou sua avaliação entre a região 6 e 7%, onde os melhores valores de atividade, para ambos, foi encontrada quando os valores se aproximaram de 6%.

Figura 16. Gráfico de superfície de Resposta Planejamento Composto Central 2². Eixo X: Concentração de Alginato; Eixo Y: Concentração de CaCl₂ (M)



Um importante parte do planejamento de experimentos é a análise de variância (ANOVA). Esta análise emprega um único teste estatístico para comparar simultaneamente todos os pares possíveis de médias para verificar se há diferenças entre eles, através da utilização do teste F para duas variâncias para testar diferenças entre três ou mais meios de tratamento de forma inteligente e segura (Mathews, 2022). O teste F representa a variação entre médias da amostra, dividido pela variação dentro das amostras. De acordo com a Tabela 13, o valor de F calculado (F_{calc}) para o modelo é de 35,94, ao passo que o F tabelado (F_{tab}) (5, 7) é igual à 3,97. Portanto, quando o valor de $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ a hipótese nula (H_0) é rejeitada, assumindo, portanto, que o modelo contribui ao nível de significância ($\alpha = 0,05$) para a resposta gerada.

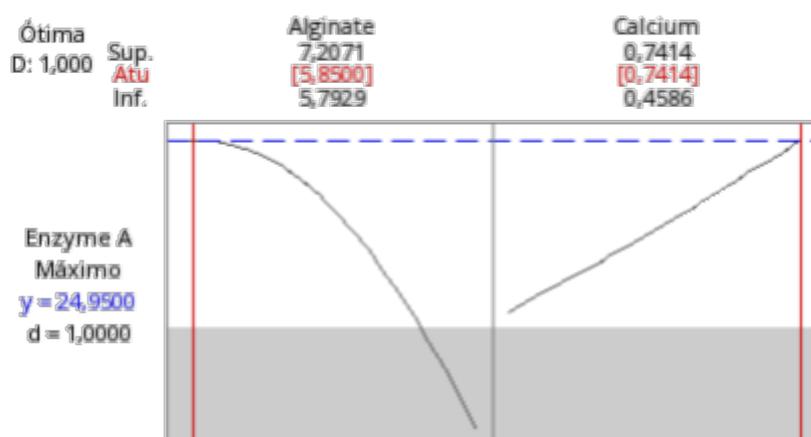
Tabela 13. Análise de Variância do Planejamento Composto Central 2².

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor- P
Modelo	5	56,16	11,23	35,94	0,000
Linear	2	11,12	5,56	17,79	0,002
Alginate Concentration (%)	1	9,43	9,43	30,18	0,001
Calcium Chloride (M)	1	1,68	1,68	5,40	0,053
Quadrado	2	21,84	10,92	34,95	0,000
Alginate Concentration (%)	1	21,03	21,04	67,31	0,000
*Alginate Concentration (%)					

Calcium Chloride (M)*Calcium Chloride (M)	1	0,08	0,08	0,28	0,615
Interação com 2 Fatores	1	23,19	23,19	74,20	0,000
Alginate Concentration (%)	1	23,19	23,19	74,20	0,000
*Calcium Chloride (M)					
Erro	7	2,18	0,31		
Falta de ajuste	3	1,81	0,60	6,48	0,051
Erro puro	4	0,37	0,09	*	*
Total	12	58,35			

A partir dos resultados encontrados, o recurso de otimização de resposta do planejamento foi utilizado com a finalidade de encontrar, com maior precisão, as respectivas concentrações das variáveis analisadas que levariam a atividade proteolítica máxima. Se acordo com a Figura 17 apresenta o resultado gerado, visando à máxima produção enzimática dentro dos limites estabelecidos pelo planejamento. Sendo assim, o gráfico aponta o valor de 5,85% (em um intervalo entre 5,79% e 1,20%) de alginato de sódio e 0,74M de cloreto de cálcio (dentro do intervalo de 0,46 M e 0,74M) geraria uma resposta correspondente a 24,9 U/mL. Este valor, em teoria, é ainda maior que a máxima atividade registrada pelo presente CCD, correspondente a 24,1 U/mL, como previamente discutido. Para a validação, realizou-se um novo experimento com as condições estabelecidas na otimização, e a atividade proteolítica registrada foi 24,7 U/mL, semelhante ao resultado indicado pelo software. Sendo assim, definiu-se como condições ótimas de produção 5,58% de alginato de sódio e 0,74 M CaCl₂.

Figura 17. Otimização de Resposta do Planejamento Composto Central 2².



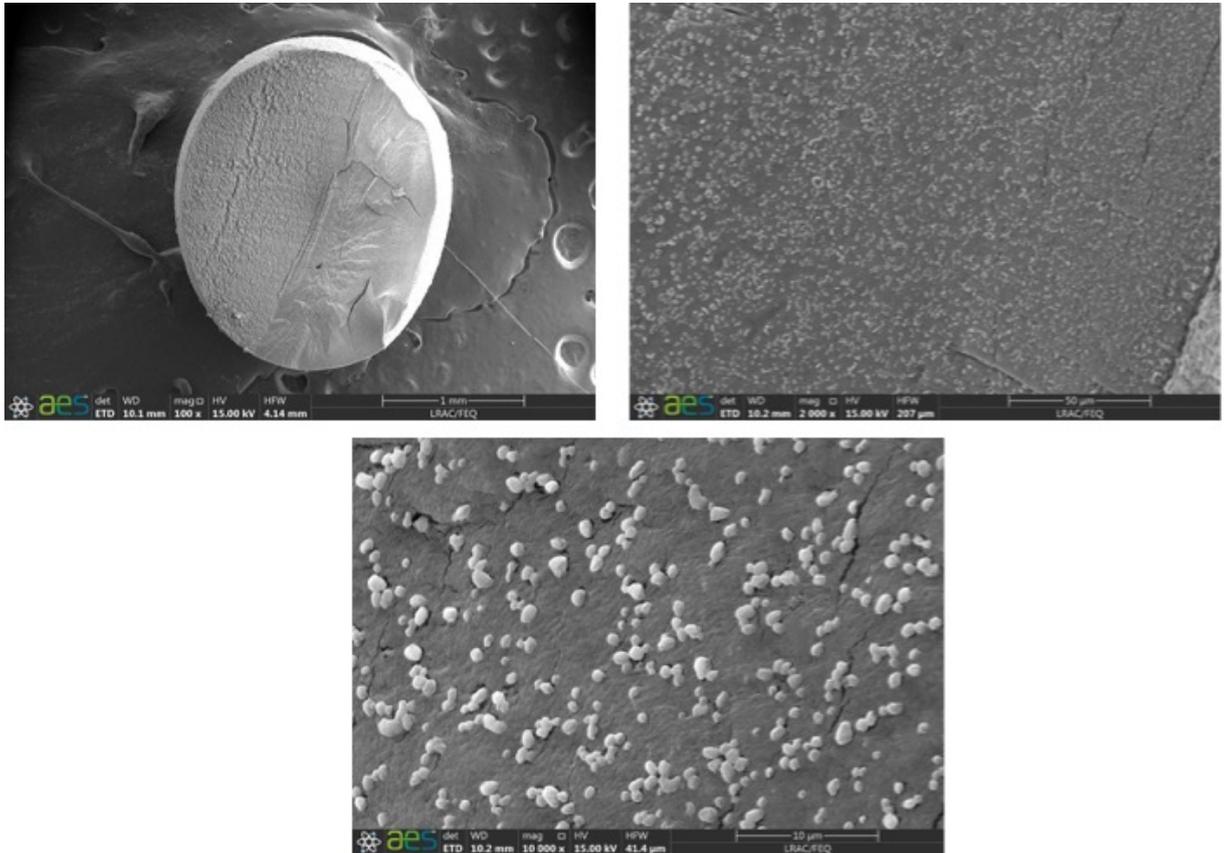
A imobilização celular também apresenta diversas vantagens nas fermentações microbianas devido à sua alta eficiência e baixo custo de produção. Essas células são mais estáveis, ativas e reutilizáveis; e pode eliminar a maioria das restrições enfrentadas pelas células livres (Mrudula e Shyam, 2012). O alginato é o material mais frequentemente empregado para aprisionar as células procarióticas e eucarióticas, especialmente devido às suas propriedades como capacidade de geleificação, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Heidari *et al.*, 2016). KUMARI *et al.*, (2009) estudaram o efeito da imobilização de células de *Bacillus pumilis* MTCC 2296 diversas matrizes; como alginato de cálcio, poliacrilamida e ágar-ágar, para a produção de protease alcalina, e concluíram que o alginato de cálcio se mostrou uma matriz eficaz e adequada para maior produtividade de proteases alcalinas em comparação com as outras matrizes avaliadas. Em um outro estudo, HEIDARI *et al.*, (2016) investigaram a bioencapsulação de *Bacillus subtilis* produtor de biosurfactante em esferas de alginato, onde relataram que as esferas apresentaram estabilidade em concentrações de alginato 3% ou superior, ao passo que concentrações de 1% ou menos de alginato não apresentaram estabilidade adequada das esferas. No entanto, embora altas concentrações de alginato possa resultar em esferas mais estáveis, o rendimento da enzima pode ser menor provavelmente devido à resistência difusional oferecida pelas esferas (Adinarayana e Ellaiah, 2003).

MRUDULA; SHYAM, (2012) avaliaram a otimização das condições de cultivo e dos parâmetros de imobilização para a produção de protease alcalina a partir de células imobilizadas de *Bacillus megaterium* MTCC2444 utilizando planejamento de experimentos. O alginato de cálcio foi utilizado como matriz de imobilização e os efeitos da concentração de alginato, tamanho das esferas, idade das células imobilizadas, período de solidificação e concentração inicial de biomassa sobre a produção de protease foram investigados. Os resultados indicaram que a imobilização foi mais efetiva com concentração de gel a 4 %, tamanho do grânulo de 3 mm, células imobilizadas envelhecidas em 24 h por um período de solidificação de 12 h a 1,5 % de concentração inicial de biomassa. Apesar do valor da concentração de alginato ser próxima ao presente trabalho, o tempo de cura encontrado pelos autores foi menor. Isso pode estar relacionado ao tamanho das esferas formadas, levando a tempos de solidificação distintos dependendo da sua área.

A partir das melhores condições estabelecidas, as esferas produzidas foram visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Figura 18 apresenta imagens de uma mesma esfera avaliada em diferentes aumentos de lente para captação da imagem. É possível que o método de imobilização obteve sucesso em seu objetivo de aprisionamento do

microrganismo. Pelas imagens, nota-se que as bactérias estão uniformemente distribuídas pelo interior da esfera, indicando que o método funcionou de forma correta.

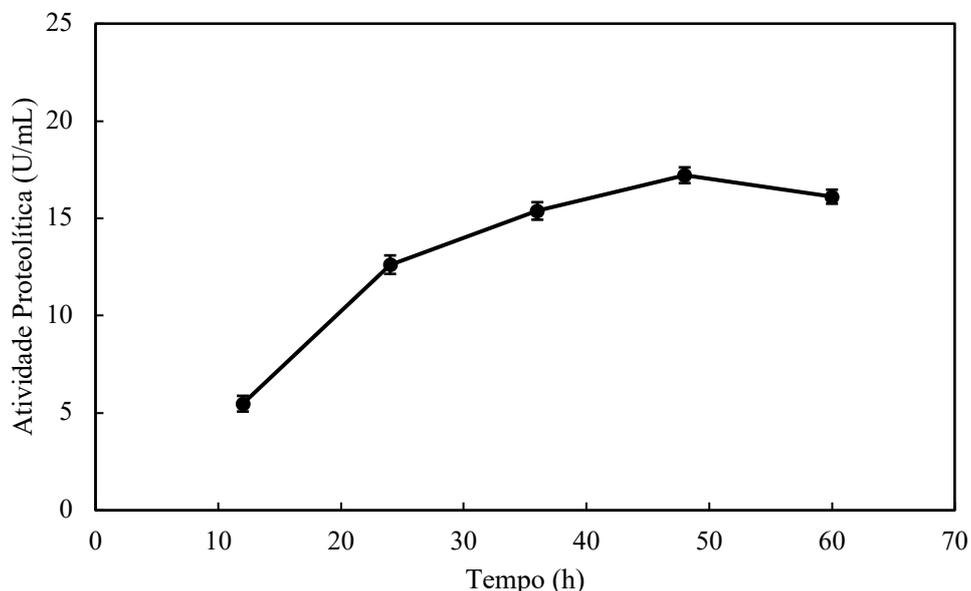
Figura 18. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 imobilizados em esfera de alginato a partir das condições ótimas de produção enzimática.



5.2.1. Tempo de Reciclo

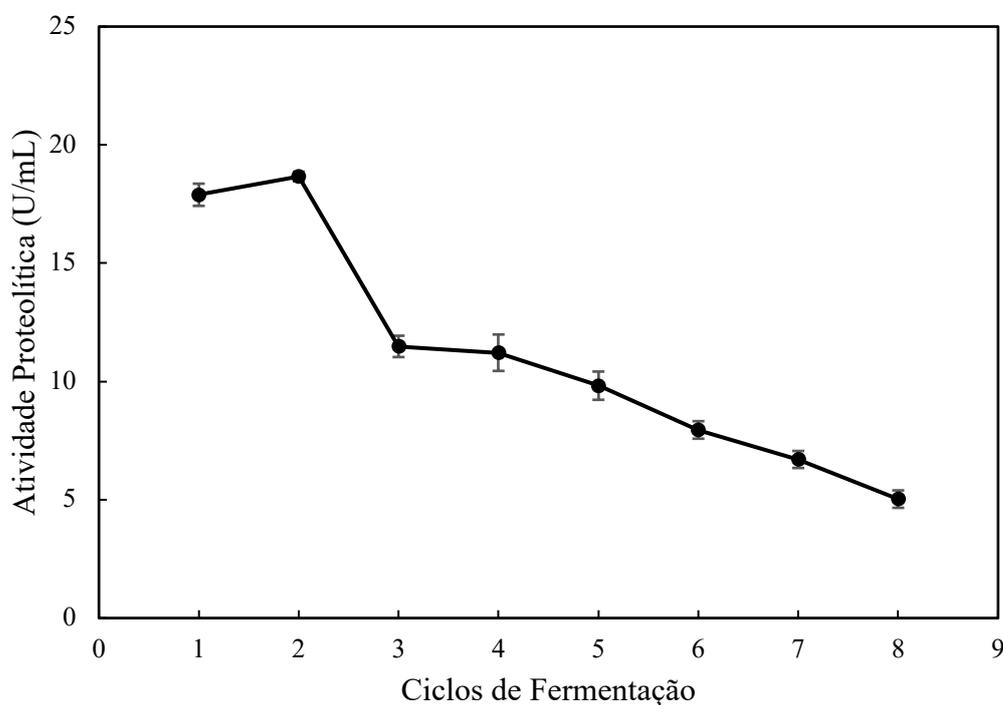
Após as melhores condições de imobilização celular para produção enzimática serem estudadas, as esferas foram avaliadas quanto à sua reutilização em novas bateladas de fermentação. Sendo assim, as esferas foram produzidas com 5,58% de alginato de sódio, 0,74 M CaCl_2 , com agitação de 100 rpm, 36 h de cura em solução de cloreto de cálcio, inoculando 10% (v/v) de esferas no meio de cultura para a fermentação. O tempo produção foi avaliado com o objetivo de encontrar o tempo ótimo de produção enzimática a partir de células imobilizadas, uma vez que este pode se diferir do tempo necessário para produção ótima de enzimas com a partir de células livres. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos, onde a maior produção foi obtida em 48h de fermentação, representando um ganho de 12h comparado ao tempo ótimo de atividade proteolítica previamente registrado com células livres.

Figura 19. Atividade Proteolítica obtida a partir da imobilização de células de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302. Eixo X - Tempo de fermentação (h); Eixo Y - Atividade Proteolítica (U/mL)



A partir dos resultados encontrados para o tempo ótimo de fermentação, as esferas foram investigadas quanto ao ciclo de fermentações que poderiam ser reutilizadas. Ao todo, 8 ciclos de reutilização foram avaliados, onde as esferas foram brevemente lavadas com água deionizada e inseridas no próximo meio de cultura para um novo ciclo de fermentação. De acordo com a Figura 20, é possível observar um pequeno aumento na atividade proteolítica durante o segundo ciclo, atingindo 18,66 U/mL e, logo após, um declínio acentuado da atividade foi observado no terceiro ciclo, onde os ciclos subsequentes foram marcados por um declínio gradual de produção de proteases, com o menor valor de atividade registrado de 5,03 U/mL. Uma possível explicação para este evento pode ser dada pelo rompimento parcial ou total das esferas, na qual promoveu o vazamento de células para o meio de cultivo, aumentando a atividade no segundo ciclo e, devido à falta de células e o ambiente comprometido das esferas, gerou uma queda acentuada na produção de proteases. Esse fato pode ser corroborado com inspeção visual das esferas após os 8 ciclos de fermentação, indicado pela Figura 21.

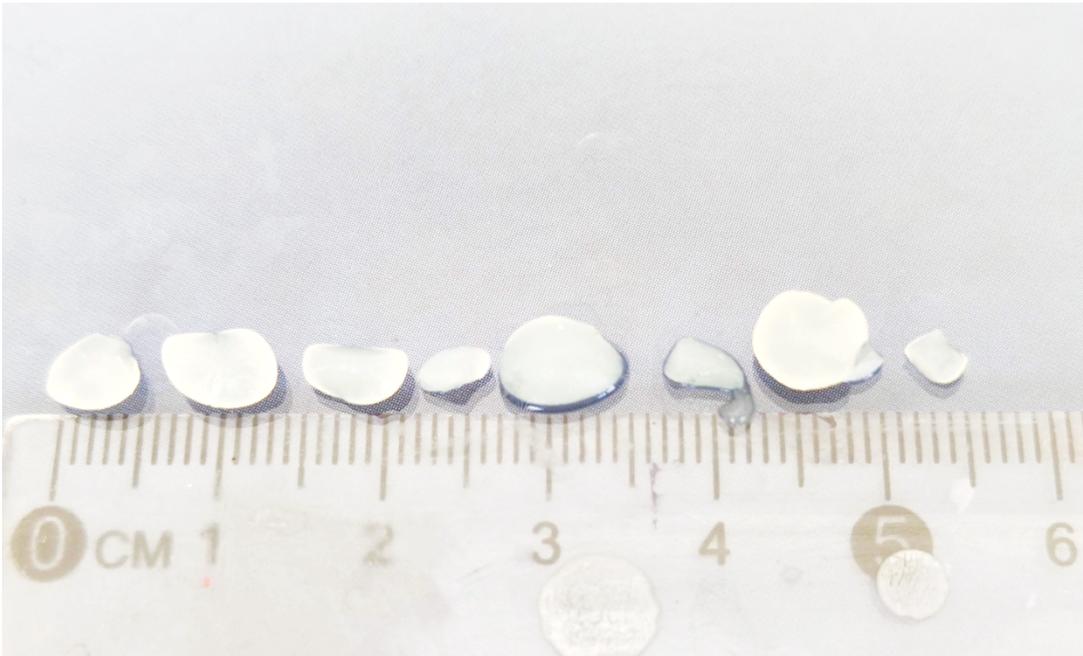
Figura 20. Avaliação da atividade proteolítica por ciclo de fermentações realizadas com células imobilizadas. Eixo X - Ciclo de fermentações; Eixo Y - Atividade Proteolítica (U/mL).



MASHHADI-KARIM; AZIN; GARGARI, (2011) estudaram o comportamento de células de *Bacillus licheniformis* imobilizadas por aprisionamento em esferas de alginato de cálcio e utilizadas para produção de protease alcalina por processo repetido em batelada. O modo de operação em batelada repetida, usando condições otimizadas, resultou na produção contínua da protease alcalina por 13 lotes em 19 dias. SHRINIVAS; KUMAR; NAIK, (2012) avaliaram a produção de proteases por células imobilizadas de *Bacillus halodurans* JB 99 e apontaram que, após sete ciclos, a diminuição da produção foi associada ao aumento do extravasamento celular das esferas. Em um outro trabalho, POTUMARTHI et al., (2008) avaliaram diferentes parâmetros do método de imobilização de cálcio-alginato para aumento da produção de protease alcalina por *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, onde, empregando as condições imobilizadas otimizadas, o modo de operação em batelada alimentado resultou em operação contínua por 12 ciclos sem desintegração de esferas. O resultado encontrado no presente trabalho difere da literatura apresentada, onde mais ciclo de fermentação foram reportados sem a perda de atividade enzimática. Uma possibilidade para futuras investigações poderia ser a agitação dos fracos durante a fermentação, na qual pode levar ao constante atrito

entre as esferas no meio, gerando seu rompimento prematuro e afetando a performance do método.

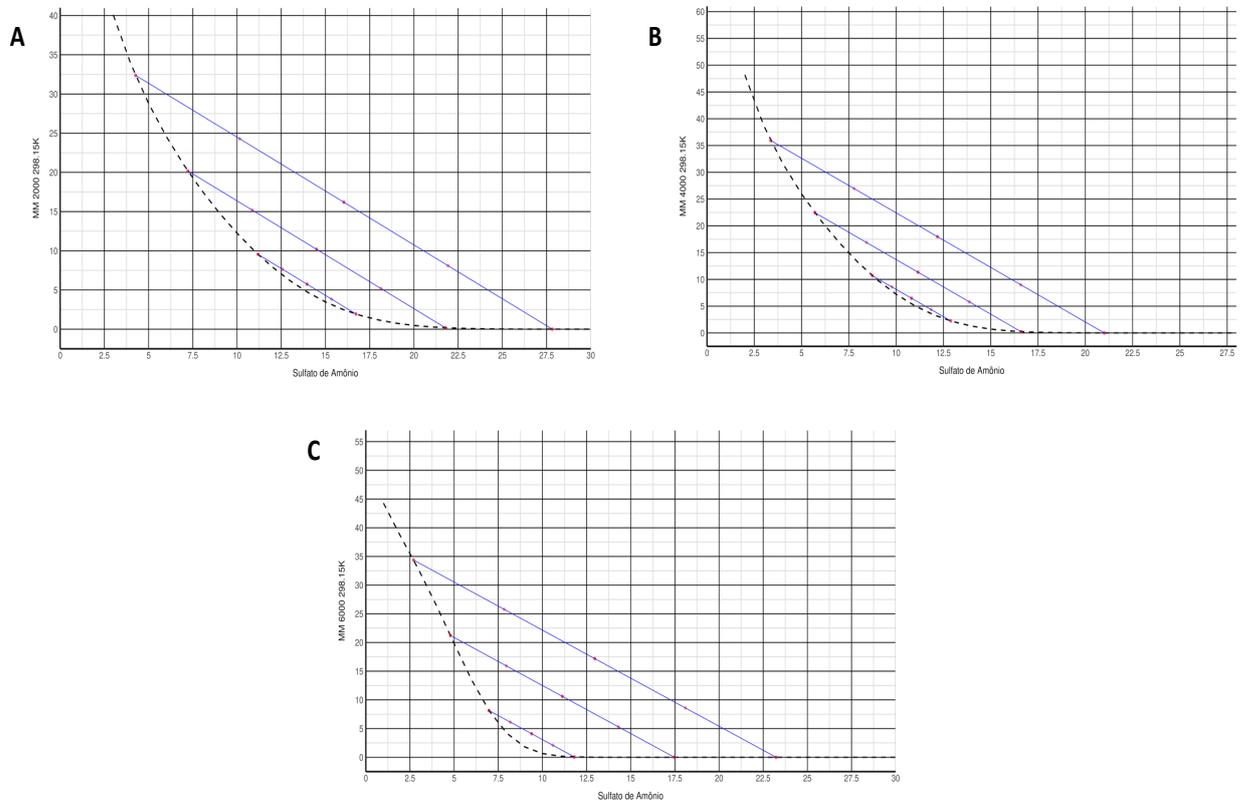
Figura 21. *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 imobilizados em esferas de alginato de cálcio após 8 ciclos de reutilização em fermentação para produção de proteases.



5.3. Extração em Sistema Bifásico Aquoso (SBA)

A utilização do pacote LLSR permitiu o cálculo das linhas de amarrações para cada uma das curvas binodais do sistema PEG 2000, 4000 e 6000 utilizando sulfato de amônio para os três sistemas à temperatura ambiente (298 K), ilustrados pela Figura 22. A partir dos resultados, o pacote calculou três linhas de amarrações (TLL) em regiões comuns acima da curva binodal com o intuito de encontrar linhas que formem duas fases para os sistemas estudados. Para cada uma das 3 linhas calculadas comuns aos 3 sistemas, 3 pontos de razão de volume entre as fases superior e inferior (V_r) foi considerado para o cálculo da composição global: 1, 0,75 e 0,5. Portanto, a composição global para cada um dos pontos foi gerada e essas informações foram utilizadas para o Planejamento Fatorial 3^k .

Figura 22. Diagrama de fases e linhas de amarrações geradas pelo pacote LLSR utilizando diferentes sistemas. A - Sistema PEG2000/sulfato de amônio; B - Sistema PEG 4000/sulfato de amônio; C - Sistema PEG 6000/sulfato de amônio.



Diferentemente dos planejamentos anteriores, o planejamento de três níveis para esse caso foi necessário na tentativa de se estudar o comportamento dos sistemas em diferentes linhas de amarrações, de forma que sua resposta seja correspondente às curvas binodais para cada um dos sistemas estudados. Portanto, as variáveis comprimento da linha de amarração (TLL), razão de volume entre as fases (V_r) e a massa molecular de PEG foram selecionadas para composição da matriz do planejamento fatorial 3^3 (Tabela 14), onde os níveis investigados para cada variável estão contidos na tabela. Ao todo, 27 experimentos foram gerados, e o coeficiente de partição enzimática (K_e) foi definido como variável independente (resposta). Para interpretação dos resultados, $K_e > 1$ indica que as proteases tendem a ser retidas na fase superior, composta principalmente por polímero, ao passo que $K_e < 1$ aponta que as enzimas foram particionadas, preferencialmente, na fase inferior, cuja composição principal é o sal. O valor de $K_e = 1$ informa que a biomolécula de interesse foi igualmente particionada entre as fases. As melhores condições de partição enzimática foram encontradas no comprimento de linha 9,42 e utilizando PEG 4000, onde a razão de volume 0,25 levou ao maior resultado de partição na fase superior (11,52) e V_r 0,5 resultou no segundo melhor valor observado (10,80).

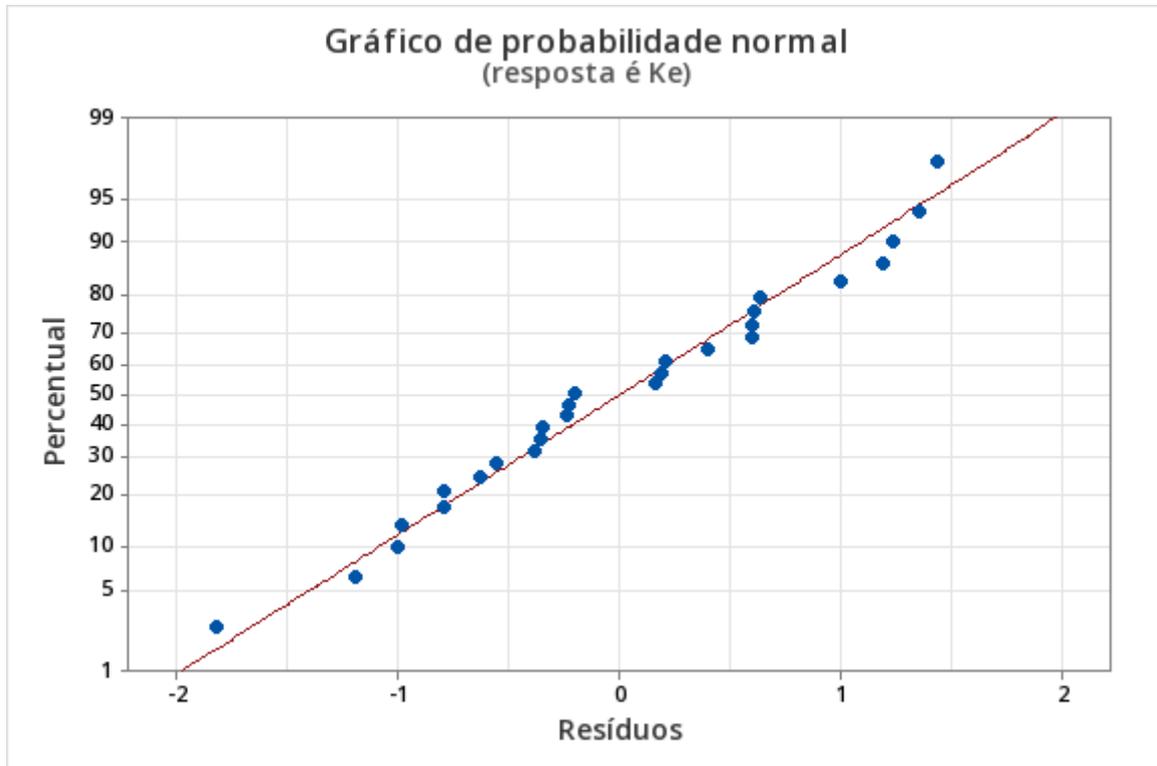
Tabela 14. Matriz do Planejamento Fatorial 3^3 . A - Comprimento da Linha de Amarração (TLL); B – Razão de volume entre as fases (Vr); C – Massa Molecular de PEG. Resposta Coeficiente de Partição enzimática (Ke)

Ordem	A	B	C	Ke
1	40,04	0,5	4000	2,73
2	24,73	0,75	4000	0,46
3	9,42	0,75	2000	1,00
4	40,04	0,25	2000	1,00
5	9,42	0,25	2000	3,57
6	40,04	0,25	6000	1,93
7	24,73	0,25	2000	4,18
8	24,73	0,75	2000	0,48
9	40,04	0,75	4000	0,21
10	40,04	0,75	2000	1,63
11	9,42	0,5	4000	10,80
12	9,42	0,25	4000	11,52
13	24,73	0,5	6000	0,21
14	9,42	0,75	4000	3,99
15	40,04	0,5	6000	0,45
16	40,04	0,75	6000	0,20
17	40,04	0,5	2000	2,39
18	40,04	0,25	4000	1,23
19	9,42	0,5	2000	2,84
20	9,42	0,25	6000	0,12
21	24,73	0,5	4000	0,31
22	9,42	0,5	6000	0,12
23	24,73	0,25	4000	1,13
24	24,73	0,5	2000	2,38
25	24,73	0,25	6000	0,48
26	24,73	0,75	6000	0,47
27	9,42	0,75	6000	0,36

Antes de considerar dos resultados estatísticos gerados pelo presente Planejamento de Experimentos, é importante a avaliação dos resíduos gerados. A Figura 23 apresenta o gráfico de probabilidade Normal dos resíduos do planejamento fatorial, onde é possível observar que estes se encontram distribuídos próximos à reta Normal. Sendo assim, não há indicações de anomalias como a presença de outliers, por exemplo, que poderiam interferir na interpretação das análises subsequentes produzidas pelo *software*. Sendo assim, os resultados do

planejamento foram analisados estatisticamente, considerando um intervalo de 95% de confiança.

Figura 23. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Fatorial 3^3 .

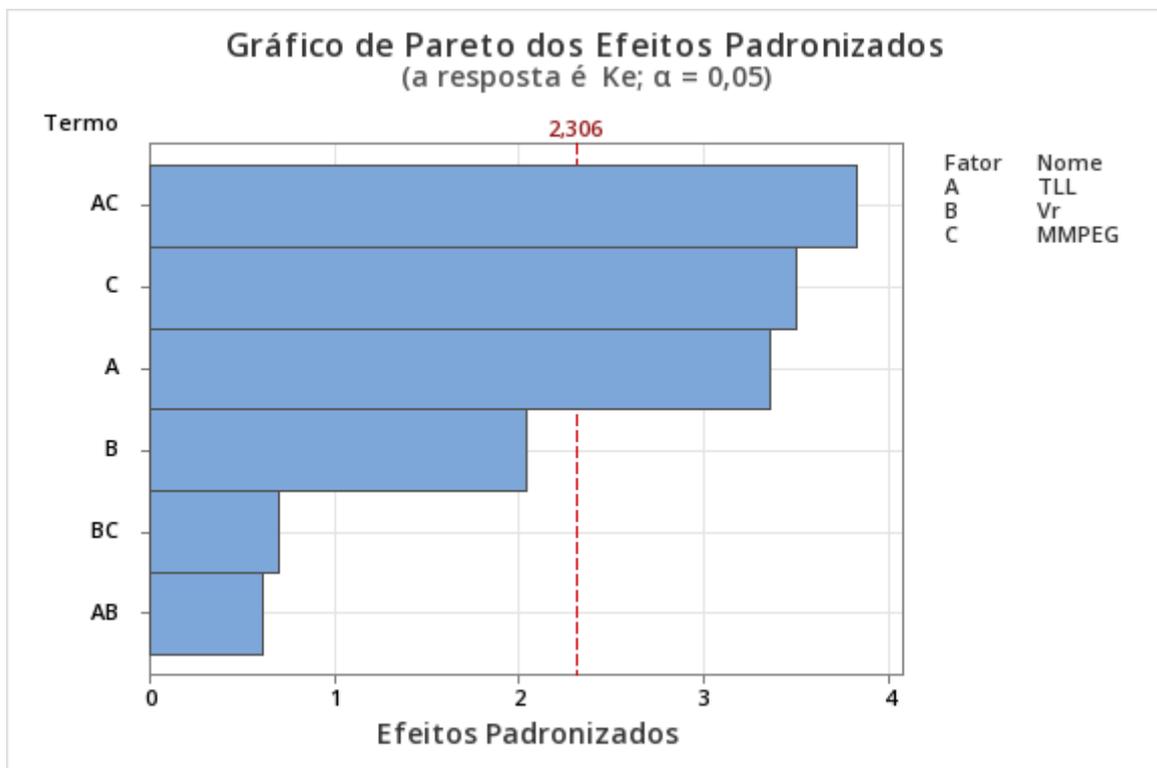


O gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do planejamento 3^3 indicado pela Figura 24 foi gerado após a remoção de termos estatisticamente não significativos ($\alpha = 0,05$) para o modelo, na tentativa de aumentar o valor de R^2 da regressão do modelo mostrado pela Tabela 15. Os efeitos da interação da linha de amarração com a massa molecular de PEG, a massa molecular do PEG, e o tamanho da linha de amarração ultrapassam a linha de referência para significância estatística quando $\alpha = 0,05$, indicando que estes efeitos contribuíram significativamente para o modelo dentro do intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, a razão entre o volume de fases, bem como o efeito da sua interação com as demais variáveis não interferem significativamente no coeficiente de partição enzimática.

É possível observar pelos resultados analisados que, os melhores valores obtidos pelo planejamento ($Ke = 11,52$ e $Ke = 10,80$) foram obtidos com a mesma massa molecular de PEG (4000) e mesmo tamanho de linha de amarração (9,42), variando apenas o valor de V_r . Entretanto, o coeficiente de partição enzimática foi consideravelmente menor (3,99) quando o

a razão do volume de fases foi 0,75, embora as demais variáveis estivessem no mesmo nível dos melhores resultados. Essa diferença de valores pode ser devido a um potencial outlier dentro dos valores obtidos, como também pode ser atribuído à predição do modelo, na qual pode não explicar toda a variação da partição enzimática pela equação gerada. Além disso, é possível observar pelo gráfico de Pareto que o efeito do volume de fases, embora não seja estatisticamente significativo em um intervalo de confiança de 95%, apresenta sua barra próxima ao limite da linha de referência, sugerindo que para intervalos de confiança menores (IC = 90%), por exemplo, há fortes chances que esse termo contribua significativamente para o modelo e, portanto, deve ser considerado nas análises.

Figura 24. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Fatorial 3^3 .



A eliminação de termos que não contribuem significativamente dentro do intervalo de confiança estabelecido (IC = 95%), também conhecido pelo termo *backward elimination*, auxilia no aprimoramento da equação do modelo gerado para melhor predição da variável independente (resposta). Sendo assim, o melhor valor para R^2 após a eliminação da interação dos três fatores foi 91,41%, indicando que mais de 91% da variação do coeficiente de partição enzimática pode ser explicada pela equação gerada, sugerindo um modelo preditivo para a

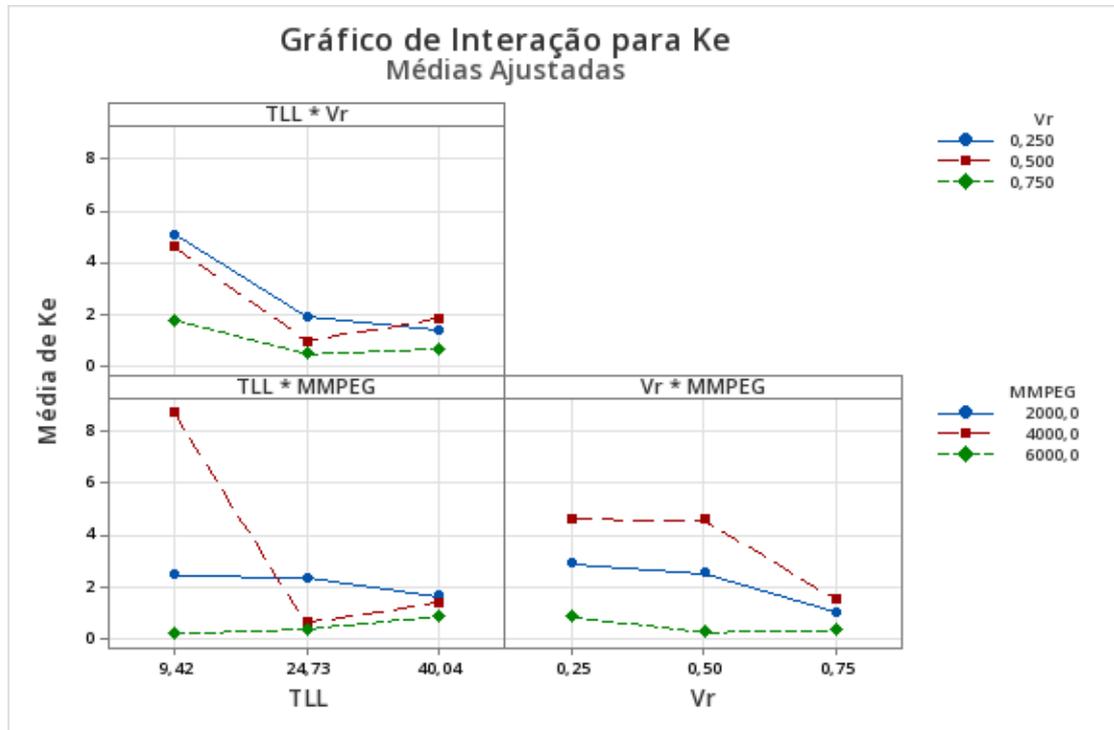
resposta dentro dos níveis estabelecidos em cada uma das variáveis analisadas pelo planejamento.

Tabela 15. Sumário do Modelo do Planejamento Fatorial 3³.

S	R2	R2(aj)
1,52975	91,41%	72,09%

Como a interação entre a massa molecular de PEG (MMPEG) e tamanho da linha de amarração (TLL) foram estatisticamente significativas para a resposta (K_e) considerando o intervalo de confiança de 95%, o gráfico de interação das variáveis foi gerado e é ilustrado pela Figura 25. A partir das interações, é possível observar que o comprimento de linha de amarração 9,42 levou aos maiores coeficientes de partição enzimática. A massa molecular de PEG em 4000 também provocou as maiores respostas, seguido pelo PEG 2000 e, por último, PEG 6000. A interação entre TLL e MMPEG aponta um alto valor de K_e para a linha de amarração 9,42 e PEG 4000, e valores semelhantes para a mesma massa molecular de PEG em combinação com as demais TTLS. O valor de PEG 6000 levou aos menores valores de K_e para as três linhas de amarrações estudadas no presente DOE. Quanto à interação entre a razão do volume de fases e a massa molecular de PEG, nota-se valores semelhantes de K_e para os valores de V_r iguais a 0,25 e 0,5, ao passo que quando V_r é igual à 0,75, os valores de K_e são menores para as três massas moleculares de PEG avaliadas.

Figura 25. Gráfico de interação das variáveis para a resposta coeficiente de partição enzimática (K_e). MMPEG – Massa molecular de PEG; V_r – razão de volume entre as fases; TLL – tamanho da linha de amarração.



Os melhores valores de K_e foram observados quando a razão do volume de fases foi 0,25 e menores quando $V_r = 0,75$. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que quanto menor V_r , menor será o volume da fase superior e, conseqüentemente, as biomoléculas que tendem a particionar nessa fase estarão mais concentradas, levando a uma melhor separação. Esse caso pode ser bastante útil na extração em larga escala de proteases de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302, por exemplo, uma vez que o volume de água a ser processada nas próximas etapas do processo será menor, tornando o processo potencialmente mais rentável. CHOUYYOK et al., (2005) Investigou a extração de protease alcalina de caldo de fermentação livre celular de *Bacillus subtilis* TISTR25 usando sistemas bifásicos aquosos de polietilenoglicol 1000 (PEG1000) /fosfato de potássio para determinar condições adequadas de extração, onde também foi observado que o sistema com baixa razão de volume de fases (0,04) proporcionou alto coeficiente de partição de protease alcalina.

A utilização do sistema bifásico aquoso do tipo polímero/sal é comumente empregada para separação de biomoléculas do sobrenadante. Devido à eficácia em promover a separação de fases, ânions multicarregados como SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , sulfato $((NH_4)_2 SO_4$, $Na_2 SO_4$, $MgSO_4$) e fosfato ($K_2 HPO_4$, $NaH_2 PO_4$) são amplamente utilizados em sistema bifásicos aquosos, onde sais de sulfato, especialmente o sulfato de amônio, têm a capacidade de promover

interações hidrofóbicas entre as proteínas alvo e contaminantes (Ketnawa, Rungraeng e Rawdkuen, 2017). Além disso, o aumento do peso molecular do PEG pode induzir uma diminuição na extensão da ligação de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, levando a um ambiente hidrofóbico mais forte (Huang *et al.*, 2020). Como as proteínas são polieletrólitos, sua separação de fases com PEG também depende da sua composição iônica (Albertsson, 1970). Além disso, em sistemas polímero-sal, a hidrofobicidade de fase pode ser manipulada variando comprimento da linha de amarração. Quanto maior a linha, maior é a redução do teor de água no sistema e, portanto, maior a hidrofobicidade do sistema (Asenjo e Andrews, 2011).

Portanto, a composição global do sistema precisa ser avaliada na tentativa de que as forças intermoleculares que regem o comportamento do sistema bifásico aquoso possam agir de maneira favorável à partição da proteína de interesse em uma fase específica. CHAVAN; AVHAD; RATHOD, (2015) avaliaram por metodologia de superfície de resposta sistemas bifásicos aquosos composto de polietilenoglicol (PEG) 4000 e fosfato de potássio foi explorado para a separação da protease produzida a partir de *Bacillus licheniformis* NCIM 2042. Similarmente aos resultados do presente trabalho, após a otimização, os autores encontraram resultados experimentais de condições otimizadas mostraram coeficiente de partição de 11,95 utilizando PEG 4000 como o polímero do sistema.

Fermentação Extrativa

5.4. Fermentação Extrativa

Os resultados de partição enzimática encontrados após 60 horas de fermentação para cada condição descrita no planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com 4 pontos centrais, de acordo com a Tabela 16. Diferentemente da análise do sistema bifásico aquoso, as linhas de amarração, bem como a utilização do pacote LLSR não foram utilizadas para este tipo de experimento uma vez que a presença do *Bacillus subtilis* dentro do sistema pode levar ao consumo de substrato e produção de metabólitos que alterem o comportamento físico-químico apresentado pelo sistema bifásico aquoso no momento da construção das curvas binodais, ou seja, sem a presença do microrganismo. Sendo assim, distribuição dos componentes formadores de fase pode mudar durante o curso de uma fermentação extrativa (Sinha, Dey e Panda, 2000). Por exemplo, SALES *et al.*, (2013) também utilizaram design de experimentos do tipo 2^k para otimização da atividade fibrinolítica de proteases produzidas por *Bacillus sp.* Sendo assim, o estudo das condições ótimas de produção de proteases foi realizado utilizando o planejamento fatorial do tipo 2^k .

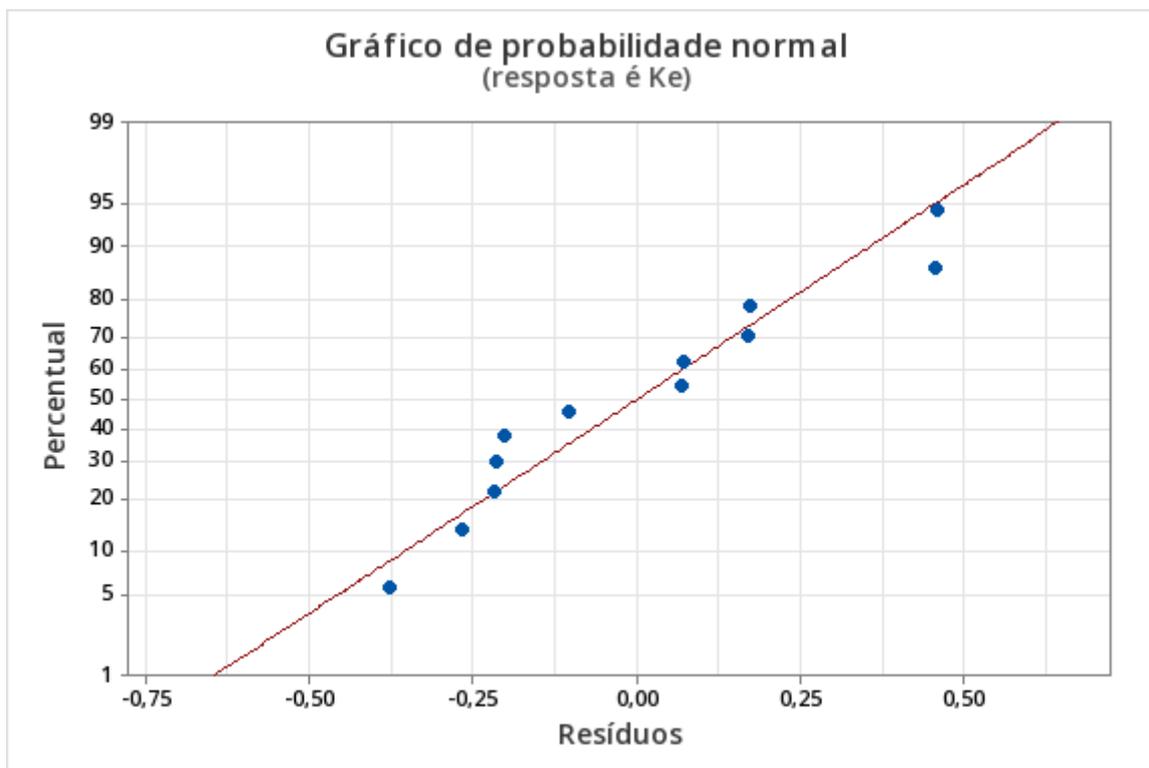
Tabela 16. Matriz do Planejamento Fatorial 2³. A – Massa Molecular de PEG (MMPEG); B – Concentração de ([PEG] %); C – Concentração de Sulfato de Amônio ([AS] %). Resposta Coeficiente de Partição enzimática (Ke).

Ordem	A	B	C	Ke
1	2000	10	15	0,55
2	6000	10	15	0,90
3	2000	20	15	1,93
4	6000	20	15	2,09
5	2000	10	20	1,09
6	6000	10	20	1,28
7	2000	20	20	1,7
8	6000	20	20	3,23
9	4000	15	17,5	1,10
10	4000	15	17,5	1,27
11	4000	15	17,5	1,37
12	4000	15	17,5	1,21

A partir dos resultados encontrados para a fermentação extrativa de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 em diferentes condições de extração (Tabela 16), é possível observar que a partição enzimática ocorre, preferencialmente, na fase superior do sistema formado, ou seja, na fase rica em PEG. Dentre os valores encontrados para a resposta analisada, PEG 6000 na concentração do nível superior (20%) levou aos melhores resultados de partição enzimática: 3,23 no nível superior de sulfato de amônio e 2,09 no nível inferior da concentração do sal utilizado no sistema. Por outro lado, quando as três variáveis estudadas encontravam-se em seus respectivos níveis inferiores, a biomolécula tendeu a particionar-se na fase inferior, ou seja, rica em sal, com o valor de 0,55.

Previamente à análise estatística do presente planejamento de experimentos, os resíduos gerados foram avaliados para verificação de anormalidades que possam inferir em interpretações estatísticas não acuradas sobre o modelo gerado pelo *software*. A Figura 26 representa o gráfico de probabilidade Normal dos resíduos do presente planejamento, no qual os pontos, que representam cada um dos resíduos das observações da resposta, encontram-se, no geral, próximo à reta Normal. Entretanto, é possível observar que dois, dos doze resíduos, localizam-se moderadamente distante à reta Normal, sendo um indicativo de possível *outliers*. Sendo assim, é preciso analisar os resultados e interpretações com cautela, uma vez que a presença destas anomalias pode gerar interpretações estatísticas menos precisas.

Figura 26. Gráfico de Probabilidade Normal dos Resíduos do Planejamento Fatorial 2³.



O gráfico de Pareto dos efeitos padronizados com intervalo de confiança de 95% do presente Planejamento Fatorial, representado pela Figura 27 foi gerado após a remoção de termos que não contribuíram significativamente ($\alpha = 0,05$) para o modelo gerado. Sendo assim, as interações da massa molecular de PEG com a concentração de sulfato de amônio, bem como a interação da concentração de PEG e sal não foram inseridas no presente modelo. Essa retirada de termos estatisticamente não significativos foi realizada até o momento em que o valor de R^2 , indicado pela Tabela 17, atingiu seu nível máximo, levando a um modelo cuja resposta analisada apresenta o melhor ajuste à equação gerada. Portanto, é possível afirmar que 84,19% da variação do coeficiente enzimático pode ser explicada pela equação resultante deste modelo. O valor acima de 80% ainda apresenta um modelo preditivo para a resposta gerada, contudo, é importante lembrar do potencial presença dos outliers dentro dos resíduos previamente analisados, o que pode interferir na resposta do modelo.

Dentre os fatores analisados, a concentração de PEG no sistema foi estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$), e o efeito da massa molecular de PEG apresenta seu valor muito próximo à linha limite para o p-valor gerado nesse modelo. Portanto, se um intervalo de confiança menor fosse considerado, por exemplo, há uma chance potencial de que a massa molecular também fosse considerada significativa. Essa análise é importante porque é preciso

levar em conta que alguns modelos, especialmente quando há microrganismos envolvidos, geram variações maiores que outros modelos sem o seu envolvimento, sendo papel do pesquisador avaliar criticamente quando a inclusão de variáveis que não são consideradas significativas quando $\alpha = 0,05$, por exemplo, ainda possam ser levadas em consideração para novos experimentos de otimização.

Figura 27. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados do Planejamento Fatorial 2^3 .

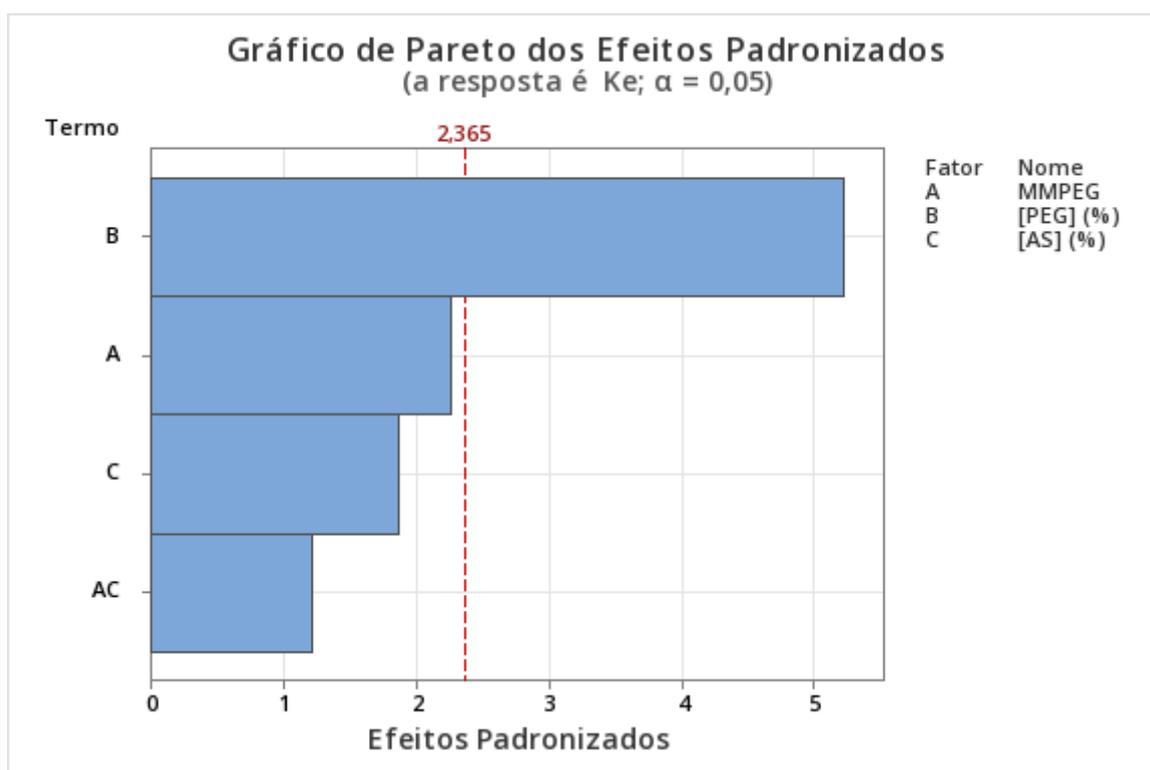


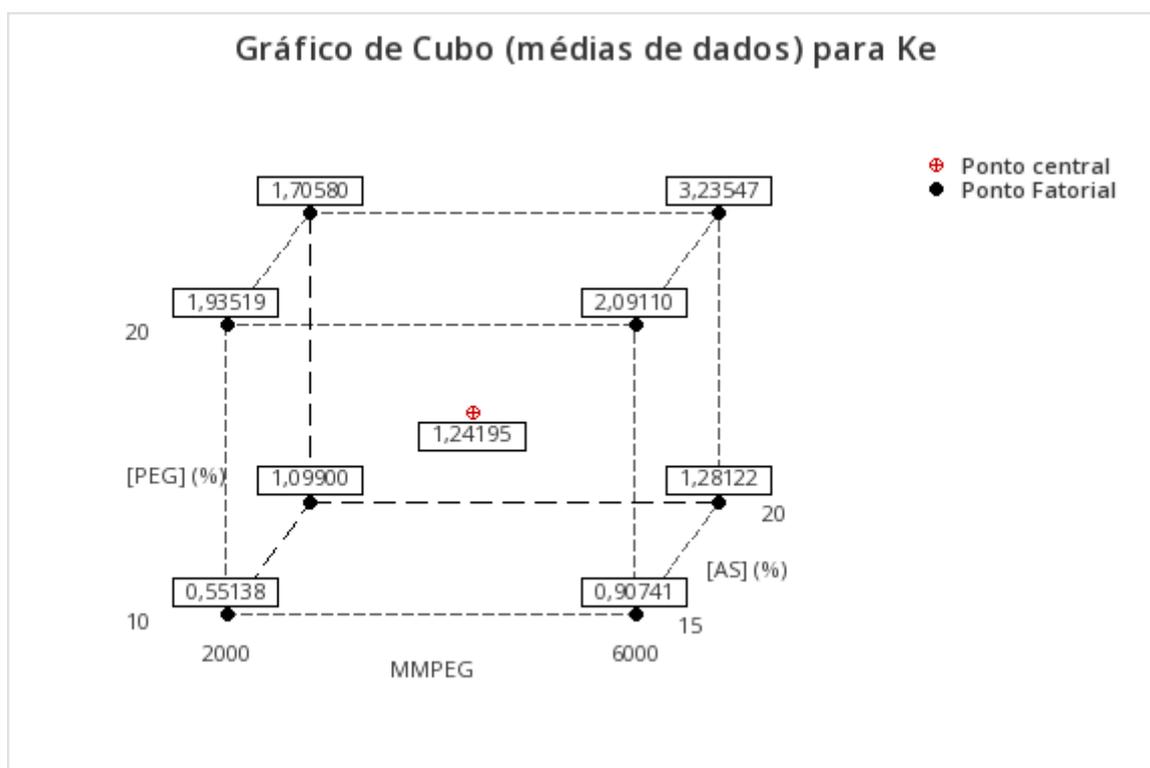
Tabela 17. Sumário do Modelo do Planejamento Fatorial 2^3 .

S	R2	R2(aj)
0,347699	84,19%	75,16%

O gráfico de cubos é um recurso visual que auxilia na interpretação de como as combinações dos fatores analisados no planejamento fatorial se relacionam entre si para geração da resposta avaliada. A Figura 28 apresenta o gráfico de cubo do presente planejamento fatorial, no qual o eixo X é representado pela massa molecular de PEG (MMPEG), o eixo Y é retratado pela concentração de PEG no sistema ([PEG] %) e o eixo Z é indicado pela concentração de sulfato de amônio do sistema bifásico aquoso utilizado para o processo de fermentação extrativa ([AS]%). Pelo gráfico, é possível observar que as proteases produzidas por *Bacillus subtilis*

CBMAI-1302 apresentam K_e mais elevados quando as três variáveis analisadas estão no nível superior, condizente com o resultado anteriormente discutido na Tabela 16. Por outro lado, se a partição na fase inferior seja de maior interesse, o gráfico aponta que os melhores resultados são encontrados quando todas as variáveis são preparadas nos seus respectivos níveis inferiores.

Figura 28. Gráfico de Cubo do Planejamento Fatorial 2³. Eixo X – Massa Molecular de PEG (MMPEG); Eixo Y – Concentração de PEG ([PEG] %); Eixo Z – Concentração de Sulfato de Amônio ([AS] %); Resposta analisada: Coeficiente de Partição enzimática (K_e).



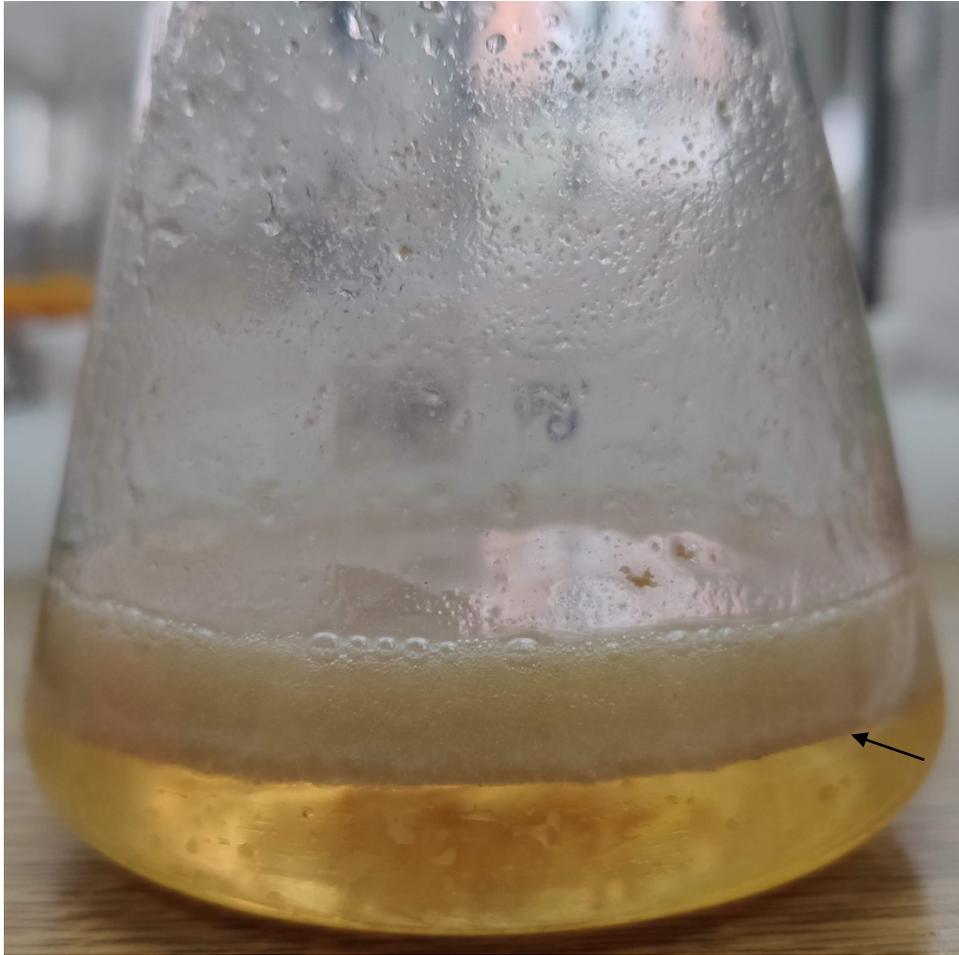
As observações e os dados estatísticos gerados pelo presente planejamento de experimentos para a avaliação do coeficiente de partição enzimática de proteases produzidas por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 por fermentação extrativa indicaram que a proteína, em geral, tende a particionar na fase superior. Contudo, o maior valor obtido (3,23) se mostrou inferior ao valor observado quando o sobrenadante resultante da fermentação submersa utilizando *Bacillus subtilis* immobilizados em esferas de alginato de cálcio foi submetido ao processo de extração enzimática por sistema bifásico aquoso convencional (11,52). CRUZ FILHO et al., (2021) avaliaram a extração de enzimas fibrinolíticas por *Bacillus stearothermophilus* DPUA 1729 empregando sistemas aquosos bifásicos convencionais (ATPS) e fermentação extrativa com SBA e concluíram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos utilizando ATPS convencional e fermentação extrativa. Contudo, é

importante ressaltar que uma das grandes vantagens da utilização da fermentação extrativa é a possibilidade da integração dos processos unitários de separação do meio sólido e extração simultânea do produto de interesse de outros contaminantes.

Embora a diferença de partição das biomoléculas tenha sido elevada, um importante ponto a ser observado no processo de fermentação extrativa é possibilidade da separação da biomolécula de interesse da cultura microbiana. A Figura 29 apresenta o sistema bifásico formado ao final da fermentação. Após o descanso do frasco para a correta separação de fases, é possível notar a fase inferior do sistema não apresenta turbidez, e a interface das fases apresenta uma cor mais escura, indicando que os microrganismos particionaram para esta área, ao passo que as biomoléculas particionaram para a fase superior. Partículas celulares têm uma forte tendência a se acumular na interface entre as duas fases líquidas, na qual sua adsorção pode ser explicada considerando-se as energias livres de superfície no sistema (Albertsson, 1970). Portanto, a integração de sistema por meio da extração *in situ* se faz vantajosa, especialmente, na separação do produto do microrganismo produtor.

O coeficiente de partição é o fator chave na determinação da eficiência de um processo de fermentação extrativa. Idealmente, a biomolécula alvo deve particionar-se a favor de uma fase, enquanto as células e outras macromoléculas particionam-se a na outra fase (Sinha, Dey e Panda, 2000). ALVES et al., (2022) avaliaram a integração de processos por meio da fermentação extrativa do tipo polímero-sal para produção de proteases pelo fungo *Aspergillus tamarii* e observaram que a enzima particionou preferencialmente para a fase superior, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. Por outro lado, SALES et al., (2013) obtiveram melhores resultados de partição enzimática para proteases produzidas por *Bacillus subtilis* por fermentação extrativa na fase rica em sal ($K_e < 1$), empregando PEG e citrato de sódio como reagentes formadores de fase do sistema. Portanto, os resultados previamente citados e o presente trabalho mostram como a composição do sistema apresenta uma forte influência na partição de uma mesma enzima, onde é necessário avaliar, em cada caso, onde a recuperação da biomolécula se torna mais vantajosa com base em sua aplicação final.

Figura 29. Final do processo de extração *in situ* de proteases produzidas por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 após 48h de fermentação.



6. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu a comparação de extração *ex situ* e *in situ* de proteases de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 por meio de sistema bifásico aquoso convencional e através da integração de processos pela aplicação de fermentação extrativa, respectivamente. Além disso, foi possível avaliar as condições ótimas para imobilização bacteriana utilizando esferas de alginato de cálcio, bem como o estudo do reciclo de esferas para redução do tempo total de fermentação.

Quanto à otimização do meio de cultivo, o tempo de fermentação de 60h e a utilização de leite desnatado e extrato de levedura levaram à maior produção enzimática, atingindo 24,81 U/mL. Utilizando *B. subtilis* imobilizados em esferas de alginato, foi possível reduzir o tempo de fermentação de 60h para 48h, onde essas esferas podem ser utilizadas até duas vezes em fermentações consecutivas sem que haja perda de atividade enzimática. Além disso, esse processo pode permitir que o sobrenadante possa ser utilizado diretamente em processos subsequentes de extração e purificação da biomolécula de interesse sem a necessidade de remoção dos sólidos desde que as esferas não apresentem rompimento ou vazamento celular para o meio.

A utilização do sobrenadante resultante da fermentação por células imobilizadas para o sistema bifásico aquoso (SBA) atingiu o valor de K_e de aproximadamente 11,52 em suas melhores condições de acordo com o planejamento fatorial analisado. As análises estatísticas também mostraram que a linha de amarração foi estatisticamente significativa (IC = 95%), demonstrando a importância da utilização de pacotes de linguagem aberta, como o LLSR, no estudo sistemático de extração de biomoléculas utilizando sistema bifásico aquoso.

A extração *in situ* de proteases de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 por integração de processo através da fermentação extrativa apresentou coeficiente de partição enzimática 3,23 nas condições estabelecidas pelo planejamento fatorial. Comparado à extração *ex situ* por SBA, o valor encontrado foi menor. Contudo, foi possível observar a separação das células microbianas na interface do sistema, levando à potencial integração de dois processos – separação do meio líquido do conteúdo sólido e extração primária da biomolécula de interesse – em um único processo. Mais investigações do comportamento de cada componente do sistema, bem como a exploração de novos reagentes, como diferentes sais e massas moleculares de PEG diferentes, podem levar a resultados de partição enzimática que sejam comparativos ao SBA convencional.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de resíduos industriais na fermentação submersa para obtenção de atividade proteolítica para o aumento do custo-benefício da produção enzimática e potencial uso comercial.
- Acréscimo de variáveis como agitação e pH na avaliação da produção de proteases por células imobilizadas, visando à ciclos de fermentações superiores.
- Análise do sistema bifásico aquoso e da fermentação extrativa por otimização de superfície de resposta, a fim de investigar se as condições ótimas de coeficiente de partição enzimáticos pode ser melhorada.
- Estudos de outros componentes formadores de fases, como citrato e solventes eutéticos naturais profundos para o sistema bifásico aquoso e fermentação extrativa visando a aplicação final direta da protease obtida por esse tipo de extração.
- Estudo de potenciais aplicações comerciais da protease obtida por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302.

8. REFERÊNCIAS

- Adinarayana, K.; Ellaiah, P. **Production of Alkaline Protease by Immobilized Cells of Alkalophilic Bacillus sp.** 2003.
- Adrio, J.; Demain, A. **Microbial enzymes: tools for biotechnological processes.** *Biomolecules* **4**: 117–139 2014.
- Albertsson, P.-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems. *In*: ANFINSEN, C. B.; EDSALL, J. T.; RICHARDS, F. M. (orgs.). **Advances in Protein Chemistry.** [S. l.]: Academic Press, 1970. vol. 24, p. 309–341.
- Alotaibi, M.; Manayil, J. C.; Greenway, G. M.; Haswell, S. J.; Kelly, S. M.; Lee, A. F.; Wilson, K.; Kyriakou, G. Lipase immobilised on silica monoliths as continuous-flow microreactors for triglyceride transesterification. *Reaction Chemistry & Engineering*, v. 3, n. 1, p. 68-74, 2018.
- Alves, R. O.; De Oliveira, R. L.; Da Silva, O. S.; Porto, A. L. F.; Porto, C. S.; Porto, T. S. Extractive fermentation for process integration of protease production by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 and purification by PEG-Citrate Aqueous Two-Phase System. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 52, nº 1, p. 30–37, 2022a.
- Badhwar, P.; Kumar, P.; Dubey, K. K. Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. *Scientific Reports*, vol. 9, nº 1, p. 32, 2019.
- Banerjee, G.; Ray, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 33, nº 2, p. 119–143, 3 jul. 2017.
- Basak, B.; Kumar, R.; Jeon, B.-H. Immobilization of microbes and enzymes for textile wastewater treatment. *Current Developments in Bioengineering and Biotechnology.* [S. l.]: Elsevier, 2023. p. 627–648.
- Benavides, J.; Rito-Palomares, M. **2.49 Aqueous Two-Phase Systems.** 2011.
- Benítez-Mateos, A. I.; Llarena, I.; Sánchez-Iglesias, A.; López-Gallego, F. Expanding One-Pot Cell-Free Protein Synthesis and Immobilization for On-Demand Manufacturing of Biomaterials. *ACS Synthetic Biology*, vol. 7, nº 3, p. 875–884, 16 mar. 2018.
- Blatkiewicz, M.; Anteck, A.; Boruta, T.; Górak, A.; Ledakowicz, S. Partitioning of laccases derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in polyethylene glycol – phosphate aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, vol. 67, p. 165–174, 1 abr. 2018.
- 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, p. 248-254, 1976.

Campos, E. S. **Seleção e avaliação de Pseudomonas para a descoloração de corantes têxteis por cultivo submenrso**. 2010. (Doutorado). UNICAMP

Charney, J.; Tomarelli, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

Chavan, R. S.; Avhad, D. N.; Rathod, V. K. Optimization of Aqueous Two-Phase Extraction of Protease Produced from Bacillus licheniformis NCIM 2042 Using Response Surface Methodology. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, vol. 50, n° 1, p. 45–55, 2 jan. 2015a.

Chavan, R. S.; Avhad, D. N.; Rathod, V. K. Optimization of Aqueous Two-Phase Extraction of Protease Produced from Bacillus licheniformis NCIM 2042 Using Response Surface Methodology. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, vol. 50, n° 1, p. 45–55, 2 jan. 2015b.

Chouyyok, W.; Wongmongkol, N.; Siwarungson, N.; Prichanont, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free Bacillus subtilis TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, vol. 40, n° 11, p. 3514–3518, nov. 2005.

Coêlho, D. F.; Huddleston, J. G.; Tundisi, L. L.; Menezes, P. V. O.; Porto, C. C. S.; Mazzola, P. G.; Souza, R. R.; Tambourgi, E. B. LLSR—An R Package for Data Analysis of Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, vol. 64, n° 11, p. 4815–4826, 14 nov. 2019.

Contesini, F. J.; Melo, R. R. De; Sato, H. H. An overview of Bacillus proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 38, n° 3, p. 321–334, 2018.

Cruz Filho, R. F. Da; Dos Santos, J. G.; Palheta, R. A.; Santos-Ebinuma, V. C.; Viana Marques, D. De A.; Teixeira, M. F. S. Comparison of conventional and extractive fermentation using aqueous two-phase system to extract fibrinolytic proteases produced by Bacillus stearothermophilus DPUA 1729. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, vol. 51, n° 2, p. 191–200, 1 fev. 2021.

Dauner, M.; Storni, T.; Sauer, U. Bacillus subtilis metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. 183., 2001. **Journal of Bacteriology** [...]. [*S. l.: s. n.*], 2001. vol. 183, p. 7308–7317.

Do Nascimento, W. C. A.; Martins, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic Bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL**, vol. 35, 1 jun. 2004.

Duarte, J. C. **Estudo da imobilização de células de Saccharomyces cerevisiae em suportes no processo de fermentação alcoólica**. 2011. (Mestrado). UNICAMP

Durga Devi, M.; Geetha, V.; Kalaichelvan, P. T. Effect of Different Carbon and Nitrogen Sources on Protease Production and Partial Characterization from Bacillus sp. DK1. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)**, vol. 7, n° 6, 2018.

Galbán, S.; Jeon, Y. H.; Bowman, B. M.; Stevenson, J.; Sebolt, K. A.; Sharkey, L. M.; Lafferty, M.; Hoff, B. A.; Butler, B. L.; Wigdal, S. S.; Binkowski, B. F.; Otto, P.; Zimmerman, K.; Vidugiris, G.; Encell, L. P.; Fan, F.; Wood, K. V.; Galbán, C. J.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A. Imaging Proteolytic Activity in Live Cells and Animal Models. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66248, 2013.

Genisheva, Z.; Teixeira, J. A.; Oliveira, J. M. Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 40, n° 1, p. 33–47, 1 nov. 2014.

Gul, S.; Rahman, M.; Ajmal, M.; Kabir, A.; Achakzai, A.; Iqbal, A. Effects of carbon and nitrogen sources on production of proteases by *Bacillus subtilis* IC-5. **Bangladesh Journal of Botany**, vol. 44, p. 285–292, 1 jun. 2015.

Guleria, S.; Walia, A.; Chauhan, A.; Shirkot, C. K. Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 and its alkaline protease in various matrices for effective hydrolysis of casein. **3 Biotech**, vol. 6, n° 2, 1 dez. 2016.

He, H.; Li, Y.; Zhang, L.; Ding, Z.; Shi, G. Understanding and application of *Bacillus* nitrogen regulation: A synthetic biology perspective: Understanding and application of *Bacillus* nitrogen regulation. **Journal of Advanced Research**, 2022.

Heidari, B. A.; Badinloo, S.; Ohadi, M.; Noudeh, G. D. Bioencapsulation of biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* (PTCC 1023) in alginate beads. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, vol. 11, n° 4, 2016.

Hernández, R. M.; Orive, G.; Murua, A.; Pedraz, J. L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7, p. 711-730, 2010.

Hori, K.; Unno, H. Integrated Production and Separation. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2nd. Burlington: Academic Press, 2011. p.579-590.

HUANG, Y.; CHEN, D.; KONG, L.; SU, M.; CHEN, Y. Aqueous two-phase systems (polyethylene glycol + ammonia sulfate) for thallium extraction: Optimization of extraction efficiency, structural characterization, and mechanism exploration. **Separation and Purification Technology**, vol. 235, 18 mar. 2020.

Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M. A. B.; Hussain, H. I.; Ahmed, S.; Yuan, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, vol. 18, n° 1, p. 18, 2016.

Ketnawa, S.; Rungraeng, N.; Rawdkuen, S. **Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications**. [S. l.: s. n.], 2017.

Khanal, S. K.; Nindhia, T. G. T.; Nitayavardhana, S. Biogas from wastes: Processes and applications. **Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 165–174.

Kumar, V.; Singh, D.; Sangwan, P.; Gill, P. Global market scenario of industrial enzymes. **Industrial enzymes: Trends, scope and relevance**. Nova Science Publishers, New York, p. 173-196, 2014.

Kumari, D.; Sharma, N.; Pandove, G.; Achal, V. **Alkaline protease production by immobilized cells of Bacillus pumilis MTCC 2296 in various matrices**. [S. l.: s. n.], 2009.

Li, Q.; Yi, L.; Marek, P.; Iverson, B. L. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

Liu, Y.; Zhang, R.; Lian, Z.; Wang, S.; Wright, A. T. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 106, p. 17-25, 2014.

Malinowski, J. J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 7, p. 525-538, 2001.

Mashhadi-Karim, M.; Azin, M.; Gargari, S. L. M. Production of alkaline protease by entrapped *Bacillus licheniformis* cells in repeated batch process. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 21, n° 12, p. 1250–1256, 6 set. 2011.

Mathews, P. G. **Design of Experiments with MINITAB**. [S. l.: s. n.], 2022.

meller, k.; szumski, m.; buszewski, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 84-106, 2017.

Mrudula, S.; Shyam, N. Immobilization of *Bacillus megaterium* MTCC 2444 by Ca-alginate Entrapment Method for Enhanced Alkaline Protease Production. **Brazilian Archives of Biology and Technnology**, vol. 55, n° 1, p. 135–144, 2012.

Nemati, M.; Webb, C. 2.24 - Immobilized Cell Bioreactors A2 - Moo-Young, Murray. In: (Ed.). **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p.331-346.

Ng, H. S.; Ooi, C. W.; Mokhtar, M. N.; Show, P. L.; Ariff, A.; Tan, J. S.; Ng, E.-P.; Ling, T. C. Extractive bioconversion of cyclodextrins by *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase in aqueous two-phase system. **Bioresource Technology**, vol. 142, p. 723–726, 2013.

Novelli, P. K.; Barros, M. M.; Fleuri, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.

Nuntiya Wongmongkol; Seeroong Prichanont. Partition of alkaline protease in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol 1000 and potassium phosphate. **Korean Journal of Chemical Engineering**, vol. 23, p. 71–76, 2006.

Olajuyigbe, F. M.; Ajele, J. O. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. **African Journal of Biotechnology**, vol. 4, n° 8, p. 776–779, 2005.

Oliveira, A. F.; Bastos, R. G.; De La Torre, L. G. Bacillus subtilis immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 110-120, 2019.

Ooi, C. W.; Hii, S. L.; Kamal, S. M. M.; Ariff, A.; Ling, T. C. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from Burkholderia pseudomallei. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 68-73, 2011.

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**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.

Phong, W. N.; Show, P. L.; Chow, Y. H.; Ling, T. C. Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 126, n° 3, p. 273–281, 2018.

Potumarthi, R.; Subhakar, C.; Pavani, A.; Jetty, A. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by Bacillus licheniformis NCIM-2042 using statistical methods. **Bioresource Technology**, vol. 99, n° 6, p. 1776–1786, abr. 2008.

Prakash, S.; Kannapiran, E.; Ramasubburayan, R.; Iyapparaj, P.; Ananthi, S.; Palavesam, A.; Immanuel, G. Production and partial purification of protease by selected bacterial strains using raw milk as substrate. **Malaysian Journal of Microbiology**, vol. 7, n° 4, p. 192–200, 2011.

Radovich, J. M. **Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells**. [S. l.: s. n.], 1985.

Rahman, R.; Basri, M.; Salleh, A. Thermostable alkaline protease from Bacillus stearothermophilus F1; Nutritional factors affecting protease production. **Ann. Microbiol.**, vol. 53, 30 nov. 2002.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases**. [S. l.: s. n.], 1998.

Razzaq, A.; Shamsi, S.; Ali, A.; Ali, Q.; Sajjad, M.; Malik, A.; Ashraf, M. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 7, n° JUN, 2019.

Rekik, H.; Zaraî Jaouadi, N.; 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.

Rodamilans, B.; Shan, H.; Pasin, F.; García, J. A. Plant viral proteases: Beyond the role of peptide cutters. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, 17 maio 2018.

Sales, A. E.; De Souza, F. A. S. D.; Teixeira, J. A.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F. Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from Bacillus sp. UFPEDA 485. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 170, n° 7, p. 1676–1688, ago. 2013.

Samad, A.; Amid, A.; Jimat, D. N.; Shukor, A. **Protease purification from *Bacillus amyloliquefaciens* B7 using Aqueous Two-Phase System (ATPS)**. [*S. l.: s. n.*], 2017.

Sánchez-Trasviña, C.; Enriquez-Ochoa, D.; Arellano-Gurrola, C.; Tinoco-Valencia, R.; Rito-Palomares, M.; Serrano-Carreón, L.; Mayolo-Deloisa, K. Strategies based on aqueous two-phase systems for the separation of laccase from protease produced by *Pleurotus ostreatus*. **Fluid Phase Equilibria**, vol. 502, 15 dez. 2019.

Sankaran, R.; Show, P. L.; Lee, S. Y.; Yap, Y. J.; Ling, T. C. Integration process of fermentation and liquid biphasic flotation for lipase separation from *Burkholderia cepacia*. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 306-316, 2018.

Sen, S.; Dasu Veeranki, V.; Mandal, B. **Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pseudofirmus* SVB1**. [*S. l.: s. n.*], 2009.

Shaikh, I. A.; Turakani, B.; Malpani, J.; Goudar, S. V.; Mahnashi, M. H.; Hamed Al-Serwi, R.; Ghoneim, M. M.; El-Sherbiny, M.; Abdulaziz Mannasaheb, B.; Alsaikhan, F.; Sindagimath, V.; Khan, A. A.; Muddapur, U. M.; Azzouz, S.; Mohammed, T.; Shakeel Iqbal, S. M. Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its Applications. **Journal of King Saud University - Science**, vol. 35, nº 1, 1 jan. 2023.

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.

Sharma, M.; Gat, Y.; Arya, S.; Kumar, V.; Panghal, A.; Kumar, A. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, vol. 15, nº 2, p. 69–78, 1 abr. 2019.

Show, P. L.; Tan, C. P.; Shamsul Anuar, M.; Ariff, A.; Yusof, Y. A.; Chen, S. K.; Ling, T. C. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 226-233, 2012.

Shrinivas, D.; Kumar, R. K.; Naik, G. R. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 39, nº 1, p. 93–98, jan. 2012.

Silva, O. S. D.; Alves, R. O.; Porto, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 209-216, 2018.

Singh, S.; Bajaj, B. **Medium Optimization for Enhanced Production of Protease with Industrially Desirable Attributes from *Bacillus subtilis* K-1**. 2015.

Sinha, J.; Dey, P. K.; Panda, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 54, nº 4, p. 476–486, 2000.

Solanki, P.; Putatunda, C.; Kumar, A.; Bhatia, R.; Walia, A. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, vol. 11, n° 10, 1 out. 2021.

Srilakshmi, J.; Madhavi, J. **Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects**. [S. l.: s. n.], 2014.

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.

Van Der Hoorn, R. A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annu Rev Plant Biol**, v. 59, p. 191-223, 2008.

Ward, O. P. 3.49 - Proteases. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p.571-582.

Ward, O. P.; Rao, M. B.; Kulkarni, A. Proteases, Production A2 - Schaechter, Moselio. In: (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2009. p.495-511.

Ward, O. P.; Rao, M. B.; Kulkarni, A. Proteases, Production. In: SCHAECHTER, M. (org.). **Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 495–511.

Whitaker, J. R. **Principles Of Enzymology For The Food Sciences**. [S. L.: S. N.], 1994.

Xu, Y.; Souza, M. A.; Pontes, M. Z. R.; Vitolo, M.; Júnior, A. P. Liquid-Liquid Extraction of Enzymes by Affinity Aqueous Two-Phase Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 46, p. 741–750, 2003.

Yang, S.-T.; Huang, H.; Tay, A.; Qin, W.; De Guzman, L.; San Nicolas, E. C. **Chapter 16. Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids**. [S. l.: s. n.], 2007.

Yesil-Celiktas, O. Patenting trends in enzyme related microfluidic applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 53-62, 2014.

Zhu, D.; Wu, Q.; Wang, N. 3.02 - Industrial Enzymes. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p.3-13.