



UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARIANA RODRIGUES LUGON DUTRA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
POR *Bacillus licheniformis* CCMA 1674

ALEGRE – ES
JANEIRO– 2023

MARIANA RODRIGUES LUGON DUTRA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS

PROTEOLÍTICAS POR *Bacillus licheniformis* CCMA 1674

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho
Coorientadora: Prof^a. DSc. Jussara Moreira Coelho

ALEGRE – ES
JANEIRO – 2023

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado, dado força, sabedoria e persistência perante as adversidades. Sem sua presença em minha vida, nada faria sentido.

A minha mãe Marisa Rodrigues Lugon, minha filha Júlia Lugon Ferreira, minha avó Gessi Lugão da Cunha. A vocês todo meu amor, carinho e gratidão por todo apoio, suporte, paciência e dedicação, sem vocês eu jamais chegaria onde estou.

A meu parceiro e companheiro de vida, meu namorado Carlos Marques, pelo amor, companheirismo, cumplicidade, respeito, amizade e apoio em todos os momentos.

A Universidade Federal do Espírito Santo campus Alegre, bem como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e concessão de bolsa de estudo, que foi fundamental para a permanência durante todo tempo de pesquisa e estudo.

Agradeço a indústria de processamento de pescado Atum do Brasil Captura Indústria e Comércio, pela disponibilização dos resíduos provenientes do processamento. Muito Obrigada!

Meu sincero agradecimento a minha orientadora Raquel Vieira de Carvalho, por todo conhecimento compartilhado, compreensão e auxílio ao decorrer da caminhada. Foi uma grande honra ser sua orientada.

Agradeço a professora Jussara Moreira Coelho, minha coorientadora, por toda o conhecimento e apoio.

Ao professor Sérgio Henriques Saraiva, pela disponibilidade e auxílio. Bem como os professores do programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que estiveram presentes em minha caminhada acadêmica compartilhando suas experiências e conhecimentos.

Agradeço a todos os componentes da banca de defesa que aceitaram e se disponibilizaram a contribuir para o enriquecimento da pesquisa, professores Sérgio Henriques Saraiva, Erica Cruz e Thamy Livia Ribeiro Corrêa.

À minha companheira de trabalho no laboratório em Microbiologia de Alimentos e amiga, Thálita Oliveira, pelo companheirismo, auxílio, suporte em momentos de desespero e cansaço. Sem você todo trabalho se tornaria muito mais difícil.

As minhas amigas Betsy Gois Santos, Carolina de Souza Moreira e Paula Zambe Azevedo que estão comigo desde a graduação oferecendo amizade, compreensão, incentivo, suporte emocional e carinho. A vocês toda a minha gratidão e amor.

E a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para conquista do meu principal objetivo.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1- Curva de crescimento, pH e atividade de protease em função do tempo de fermentação por *Bacillus licheniformis* CCMA1674.....29

Figura 2- Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 crescido em meio de cultivo contendo farinha do resíduo do processamento de pescado a 37 °C durante 72 horas.....32

Figura 3- Efeito da temperatura na atividade da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo contendo farinha do resíduo do processamento de pescado, crescido a 37 °C durante 72 horas.....33

Figura 4- Efeito da estabilidade na atividade da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo contendo farinha do resíduo do processamento de pescado, crescido a 37 °C durante 72 horas.....34

Figura 5- Efeito de íons metálicos e agentes inibidores na atividade da protease.....35

Figura 6- Estabilidade térmica da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 50°C.....37

Figura 7- Estabilidade térmica da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 70°C.....37

Figura 8- Estabilidade térmica da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 90°C.....38

Artigo 2

Figura 1- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado.....46

Figura 2- Curva de crescimento, pH e atividade de protease por *Bacillus licheniformis* CCMA1674, em função do tempo de fermentação em meio contendo 0,5% da farinha do resíduo de pescado, incubado a 37 °C e 150 rpm.....51

Figura 3: Diagrama de Pareto para a atividade enzimática da protease, crescimento celular e pH final em função da concentração 1,05% e pH inicial dos meios após 96 h de cultivo de *B. licheniformis* CCMA-1674.....52

Figura 4. Gráficos de superfície de resposta para a atividade da protease e para o crescimento celular (densidade ótica) por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, em função da concentração da farinha de resíduo de pescado e o pH inicial do meio de cultivo.....55

Figura 5. Aplicação da protease em caseína como substrato em temperatura ambiente e à 70 °C.....57

Figura 6. Aplicação da protease em farinha do resíduo do processamento de pescado em temperatura ambiente e à 70 °C.....58

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1- Composição dos meios de cultivo.....24

Tabela 2- Composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado.....28

Artigo 2

Tabela 1- Composição do meio de cultivo.....47

Tabela 2- Representação do planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: pH inicial do meio de cultura e concentração da farinha do resíduo do processamento de pescado.....49

Tabela 3- Crescimento microbiano, pH final e atividade de protease durante fermentação a 37 °C e 150 rpm.....

SUMÁRIO

Resumo	XII
Abstract.....	XIII
1 Introdução.....	1
1.1 Referências bibliográficas.....	3
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Utilização de resíduos agroindustriais nos processos fermentativos para a produção de enzimas microbianas.....	6
3.2 <i>Bacillus</i> produtores de enzimas	7
3.3 Proteases	8
3.4 Produção de proteases por microrganismos	10
3.4.1. Proteases produzidas pelo gênero <i>Bacillus</i>	11
3.5 Aplicação das proteases	12
3.6 Referências Bibliográficas	15
Artigo Original	22
Resumo	22
1. Introdução	22
2. Material e Métodos	24
2.1. Microrganismos e meio de manutenção	24
2.2. Preparo e pré tratamento dos resíduos provenientes do processamento de pescado.....	24
2.3. Composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado.....	25
2.4. Meio de cultivo	25
2.4.1. Preparo do pré-inóculo.....	25
2.5. Determinação do crescimento microbiano	26
2.6. Ensaio enzimático	26

2.7. Caracterização parcial da enzima	27
2.7.1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade das enzimas	27
2.7.2. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade das enzimas	27
2.7.3. Efeito dos íons metálicos na atividade das enzimas	28
2.7.4 Efeito de inibidores na atividade da enzima	28
3. Resultados e Discussão	28
3.1. Composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado.....	28
3.2- Crescimento e produção de protease por CCMA 1674.....	29
3.3. Caracterização parcial da enzima	32
3.3.1.- Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	32
3.3.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	34
3.3.3. Efeito dos íons metálicos e inibidores na atividade de protease	35
4. Conclusão	38
Referências	39
ARTIGO ORIGINAL ²	44
Resumo	44
1. Introdução.....	44
2. Material e métodos.....	46
2.1. Microrganismo.....	46
2.2. Microrganismo e as condições de manutenção.....	47
2.3. Meios de cultivo	48
2.4. Preparo do pré-inóculo	48
2.5. Medidas do crescimento do microrganismo e atividade da protease.....	48
2.6. Otimização das condições da fermentação para a produção da protease	49
2.7 Estudo da hidrólise da protease em fontes proteicas	50
3. Resultados e discussão	51
3.1. Meio de cultivo contendo resíduo	51
3.2. Otimização das condições da fermentação para a produção de protease	52
3.3 Aplicação da protease em fontes complexas de proteínas.....	58
4. Conclusão	60
Referências	61
5. CONCLUSÃO GERAL	65

Resumo

DUTRA, Mariana Rodrigues Lugon. **Produção, caracterização e aplicação de enzimas proteolíticas por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES. Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho.

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas em peptídeos e aminoácidos. Embora existam várias fontes para obtenção de enzimas, as fontes microbianas têm dominado os setores industriais, devido à fácil disponibilidade e rápido crescimento dos microrganismos. O gênero bacteriano, *Bacillus*, tem se destacado no uso laboratorial e na produção comercial de proteases, pois são capazes de se desenvolver em condições extremas de temperatura e pH. Todos os anos, uma enorme quantidade de resíduos é gerada pelas agroindústrias. A tecnologia enzimática procura empregar esses resíduos agroindustriais baratos e renováveis como substrato para a produção de enzimas por meio de processos de fermentação, visando atender à crescente necessidade mundial. Resíduos sólidos gerados na cadeia produtiva da pesca e da aquicultura correspondem a 20% do volume produzido, apresentando alto teor de proteína bruta. A utilização desses, como fonte de carbono, energia e nutrientes, tem garantido boa produção enzimática e redução dos custos dos processos industriais, além de ajudar a reduzir os impactos ambientais causados pelo descarte indevido. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da produção de protease por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, em cultivos contendo farinha do resíduo do processamento de pescado. Ao longo de todo o processo fermentativo, quando o microrganismo foi incubado em temperatura de 37 °C a 150 rpm, a atividade máxima de protease (779,27 U/mL) foi encontrada em meio contendo 0,5% de farinha de resíduo de pescado, pH 7 durante 72 horas. Os experimentos mostraram que a temperatura ótima de ação da enzima foi de 70 °C, pH 8,5, Mg²⁺ como íon estimulador e EDTA e 1-10 fenantrolina como inibidores. Quando em condições otimizadas durante 96 horas de fermentação, variando a concentração de farinha do resíduo do processamento de pescado e pH inicial, o ensaio com 1,05% de resíduo de pescado e pH inicial de 7,5 obtiveram os melhores valores na atividade da protease (821,01 U/mL). No estudo para aplicação da protease, utilizando caseína e resíduo de pescado como substrato, e testando duas temperaturas (70 °C e temperatura ambiente) observou-se maior atividade da enzima quando o resíduo de pescado foi utilizado em temperatura ambiente.

Palavras chave: Enzimas, Protease, Resíduos agroindustriais, *Bacillus*.

Abstract

DUTRA, Mariana Rodrigues Lugon. **Production, characterization and application of proteolytic enzymes by *Bacillus licheniformis* CCMA 1674**. 2022. Dissertation (Master in Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre - ES. Advisor: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

Proteases are enzymes that hydrolyze protein peptide bonds into peptides and amino acids. Although there are several sources for obtaining enzymes, microbial sources have dominated the industrial sectors, due to the easy availability and rapid growth of microorganisms. The bacterial genus, *Bacillus*, has stood out in laboratory use and in the commercial production of proteases, as they are capable of developing in extreme conditions of temperature and pH. Every year, a huge amount of waste is generated by agroindustries. Enzymatic technology seeks to use these cheap and renewable agro-industrial residues as a substrate for the production of enzymes through fermentation processes in order to meet the growing world need. Solid waste generated in the fishing and aquaculture production chain corresponds to 20% of the volume produced, with a high crude protein content. The use of these, as a source of carbon, energy and nutrients, has ensured good enzymatic production and reduced costs of industrial processes and also helps to reduce the environmental impacts caused by improper disposal. In this context, the present work aimed to evaluate the potential of protease production by *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, in cultures containing flour from fish processing waste. Throughout the entire fermentation process, when incubated at a temperature of 37 °C at 150 rpm, the maximum protease activity (779,27 U/mL) was found in a medium containing 0.5% fish residue meal, pH 7, for 72 hours. The experiments showed that the optimum temperature for enzyme action was 70°C, pH 8.5, Mg²⁺ as a stimulator ion and EDTA and 1-10 phenanthroline as inhibitors. When under optimized conditions at 96 hours, varying the concentration of fish residue meal and initial pH, the test with 1.05% of fish residue and initial pH of 7.5 obtained the best results in the protease activity (821,01 U/mL). In the study for the application of protease, using casein and fish residue as substrate, and testing two temperatures (70°C and room temperature), greater activity of the enzyme was observed when the fish residue was used at room temperature.

Keywords: Enzymes, Protease, Agro-industrial residues, *Bacillus*.

1 Introdução

Proteases são enzimas de natureza ubíqua que catalisam reações hidrolíticas resultando na quebra de moléculas de proteína em peptídeos e aminoácidos (DUBEY et al., 2019).

As proteases têm sido produzidas a partir de fontes vegetais, animais e microbianas. As proteases microbianas geralmente mostram alta atividade catalítica e capacidade de produção, sendo reconhecidas como uma das maiores e mais importantes enzimas hidrolíticas, constituindo cerca de 70% de toda a produção industrial. Desempenham um papel fundamental nos processos industriais, especialmente na indústria de couro, alimentos, detergentes e indústrias químicas, bem como na recuperação de prata e gestão de resíduos (BANERJEE & RAY, 2017; ADETUNJI & OLUFOLAHAN OLANIRAN, 2018). O gênero *Bacillus* tem estado em avanço na produção laboratorial e comercial de proteases, incluindo-se espécies como *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, entre outros. Os microrganismos desse gênero são capazes de se desenvolver em condições extremas de temperatura e pH, o que permite a produção de enzimas em uma ampla faixa de pH e temperatura. A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas e são capazes de utilizar substâncias orgânicas típicas de resíduos (BAWEJA et al., 2017) para sintetizá-las. *Bacillus licheniformis* tem a capacidade de crescer usando diversas fontes de nutrientes, bem como produzir e excretar várias enzimas hidrolíticas e produzem principalmente, proteases alcalinas e neutras (PARRADO et al., 2014).

A utilização de resíduos agroindustriais, ricos em nutrientes, não só promove o crescimento de microrganismos, mas também contribui para a preservação do meio ambiente, podendo ser uma das melhores opções para aproveitar os milhões de toneladas de biomassas geradas pelo setor agrícola a cada ano, resultando na valorização desses resíduos (BHARATHIRAJA, 2017). O pescado é representado por todos os peixes, crustáceos (camarões), moluscos (ostras e mexilhões), anfíbios (rãs), répteis (jacaré e tartarugas), equinodermos (ouriços e pepinos-do-mar) e outros animais aquáticos usados na alimentação humana. Estima-se que a produção global de peixes tenha chegado a cerca de 214 milhões de toneladas em 2020. Do montante

registrado, 87% foram destinadas ao consumo humano, enquanto que os 17% restantes foram para usos não alimentares (FAO, 2020).

A indústria de peixes está em crescimento, com mais de 196 milhões de toneladas de pescado previstas para serem processadas em 2025 (PEDRO & NUNES, 2019). Essas indústrias geram grandes quantidades de subprodutos, como cabeças, pele, guarnições, barbatanas, vísceras, armações e às vezes músculos, que são atualmente desperdiçados, subutilizados ou usados para produzir produtos de valor agregado, como farinha de peixe e silagem de peixe. O teor de proteína bruta dos subprodutos de pescado varia de 8 a 35% (GAO et al., 2021).

Esses subprodutos podem chegar a 50% do peixe inteiro, mas podem variar de 10 a 90%, dependendo da espécie de peixe e do uso pretendido (FEREIDOON et al., 2019; GAO et al., 2020). Potencialmente, os subprodutos do pescado podem ser utilizados como fontes de aminoácidos essenciais, colágeno, gelatina, lipídios poli-insaturados e enzimas (BROOKS MS, 2013).

Diante da relevância do tema, no presente estudo, o resíduo do processamento de pescado foi aplicado ao meio de cultivo para avaliar as condições ótimas para a produção de protease por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674.

1.1 Referências bibliográficas

Adetunji, A. I., & Olufolahan Olaniran, A. (2018). Treatment of lipid-rich wastewater using a mixture of free or immobilized bioemulsifier and hydrolytic enzymes from indigenous bacterial isolates. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, 132, 274–280.

Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119–143.

Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P., & Kim, S.-K. (2017). Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, 80, 125–148.

Baweja, M., Nain, L., Kawarabayasi, Y., & Shukla, P. (2016). Current technological improvements in enzymes toward their biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 7, 965.

Brooks MS, R. V. V. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: A critical review. *Journal of microbial & biochemical technology*, 05(04).

Dubey, K. K., Pramanik, A., Ankush, Khushboo, & Yadav, J. (2019). Enzyme Engineering. Em *Advances in Enzyme Technology* (p. 325–347). Elsevier.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome, 2020, 244 p.

Fereidoon, S., Vamadevan, V., Han, P., & Ruchira, S. (2019). Utilization of marine by products for the recovery of value-added products. *Journal of Food Bioactives*, 6.

Gao, J., Liu, Q., Zhao, L., Yu, J., Wang, S., Cao, T., Gao, X., & Wei, Y. (2021). Identification and antihypertension study of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from the skirt of *Chlamys farreri* fermented with *Bacillus natto*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(1), 146–158.

Gao, R., Shen, Y., Shu, W., Bai, F., Jin, W., Wang, J., & Yuan, L. (2020). Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti-inflammatory potential. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–12.

Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T., & Garcia, C. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different

feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and Microbial Technology*, 57, 1–7.

Pedro, S., & Nunes, M. L. (2019). Reducing salt levels in seafood products. In *Reducing Salt in Foods* (p. 185–211). Elsevier.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar e avaliar a produção de proteases pelo microrganismo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo submerso contendo resíduo do processamento de pescado.

2.2 Específicos

a) Avaliar o crescimento do microrganismo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meios contendo resíduos do processamento do pescado.

b) Avaliar a produção de proteases pelo microrganismo em meio submerso contendo resíduos do processamento do pescado.

c) Avaliar a atividade ótima e estabilidade da protease produzida em relação a temperatura, pH e íons metálicos.

d) Otimizar as condições de produção do complexo enzimático por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 quanto ao efeito da concentração da farinha de resíduo de pescado e do pH inicial do meio cultura.

e) Estudar a aplicação da protease em fontes complexas de proteínas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Utilização de resíduos agroindustriais nos processos fermentativos para a produção de enzimas microbianas

A biomassa agroindustrial tem sido reconhecida como uma excelente matéria prima para a produção de várias enzimas industrialmente importantes (JAIN et al., 2021). A utilização dessa biomassa agroindustrial rica em nutrientes, visando a produção de enzimas, também contribui para a preservação do meio ambiente, sendo uma das melhores opções para o aproveitamento de milhões de toneladas de biomassa geradas pelo setor agrícola a cada ano (BHARATHIRAJA et al., 2017).

De acordo com dados reportados, com o aumento da industrialização do setor agrícola, há um aumento de resíduos que representa um desafio para o meio ambiente (TRIPATHI et al., 2019), com produção anual de biomassa da agricultura cerca de 5 milhões de toneladas métricas. Todas as situações prevalecentes fizeram com que pesquisadores analisassem as opções para converter esses resíduos agrícolas em materiais com possibilidades de aplicação na produção de biocombustíveis, por exemplo, assim como para sua utilização como matéria prima para produção de várias enzimas, reduzindo a carga poluidora gerada por eles (RAINA et al., 2022).

Segundo a FAO 2020, estima-se que a produção global de peixes tenha chegado a cerca de 214 milhões de toneladas, equivalente a US\$ 401 bilhões. (FAO, 2020). Os resíduos de pescados são constituídos de proteína (15-30%), gordura (0-25%) e água (50-80%) (GHALY et al., 2013). Esses subprodutos incluem carcaça (15–20%), pele e barbatanas (1–3%), ossos (9–15%), cabeças (9–12%), vísceras (12–18%) e escamas (5%) (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015). Os músculos e tecidos de peixes são compostos por proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas (HAYES & FLOWER, 2013).

A quantidade de resíduos gerados pela indústria de pescados vem aumentando atualmente devido ao aumento no consumo desses produtos, impulsionado por uma nova percepção do valor nutricional do pescado, e à mudança das tendências de consumo em relação a produtos industrializados. Além disso, os padrões de qualidade e higiene mais rigorosos, impostos nos últimos anos às

indústrias, causaram um aumento significativo nas quantidades de resíduos e águas residuais geradas durante o processamento (FRAGA-CORRAL et al., 2022).

A incorporação de resíduos agroindustriais na economia pode ajudar a ampliar a criação de bioprodutos sustentáveis e bioenergia. O objetivo mais importante é maximizar os lucros financeiros e, ao mesmo tempo, proteger o meio ambiente (DANESHVAR et al., 2021).

3.2 *Bacillus* produtores de enzimas

Um crescente interesse mundial em enzimas microbianas é atribuído à sua atividade catalítica, estabilidade, bem como facilidade de produção e otimização em comparação com as enzimas de animais e plantas. De acordo com os dados relatados, atualmente, os fungos respondem por 60% da síntese enzimática comercial, bactérias respondendo por 24%, leveduras por 4%, *Streptomyces* por 2%, animais superiores por 6% e plantas por 4% (AL- MAQTARI et al., 2019). As microalgas também têm despertado grande interesse hoje em dia, devido ao seu vasto potencial para uso nas indústrias de energia verde, nutracêutica e biofarmacêutica e são muito procuradas como matéria prima energética para a fabricação de biodiesel, bioetanol e gás biohidrogênio (CHAI et al., 2021; YAP et al., 2021; LOW et al., 2021).

A produção de enzimas microbianas por fermentação é considerada uma das opções mais relevantes e envolve vários estágios. Foi nas décadas de 1980 e 1990 que a indústria de enzimas expandiu após a descoberta da produção de enzimas microbianas (WANG et al., 2007).

O gênero *Bacillus* é conhecido como um dos maiores da microbiologia. São bactérias gram-positivas em forma de bastonetes, formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e a maioria catalase positiva (SNEAT et al., 1986). Dentro do gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus subtilis* é reconhecido por englobar cinco espécies fisiologicamente similares (GORDON et al., 1973): *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*.

Os microrganismos desse gênero são capazes de se desenvolver em condições extremas de temperatura e pH, o que permite a produção de enzimas com atuação em uma ampla faixa de pH e temperatura (RAINA et al., 2022). A maior parte

das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas (WANG et al., 2007).

As cepas de *Bacillus* são conhecidas por sua alta capacidade de produção e excreção de proteínas. Além disso, diferentes espécies têm alto desempenho de crescimento, manipulação genética estabelecida e suportam fermentação em larga escala, o que as tornam excelentes para aplicação industrial (SAMANTA, 2020). Várias espécies, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus* (anteriormente chamado de *Bacillus stearothermophilus*), foram relatadas, na literatura, por serem bons produtores de enzimas hidrolíticas em fermentações do tipo submersa em escala industrial (RAMESH et al., 2020).

A produção de enzimas por microrganismos é geralmente afetada por condições de pH, temperatura, agitação, meio de cultura, durante as fases de crescimento microbiano. As condições ótimas e ideais do meio de cultivo é um aspecto crucial para a produção de enzimas na prática comercial (DERMIKI, & FITZGERALD, 2020).

Os microrganismos do gênero *Bacillus* produzem uma variedade de enzimas extracelulares importantes, podendo-se citar as amilases, proteases, celulases, poligalacturonases dentre outras.

3.3 Proteases

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como peptidases ou proteases, são catalisadores de proteínas e as principais responsáveis pela hidrólise de uma ligação peptídica (amida) em substratos peptídicos e proteicos. O histórico sobre as proteases serem as principais responsáveis por proteínas não seletivas de degradação, mudou drasticamente ao longo dos anos, e agora elas são consideradas importantes moléculas sinalizadoras (RAWLINGS et al., 2018).

De acordo com a Enzyme Commission (EC), as proteases pertencem ao grupo 3 das hidrolases e subgrupo 4, hidrólise de ligações peptídicas, mas pode ainda ser classificadas de acordo com a fonte de isolamento (animal, vegetal ou microbiano), ação catalítica (endo ou exopeptidase), sítio ativo, carga, tamanho molecular e especificidade do substrato (SUMANTHA et al., 2006).

Os sítios ativos dividem as proteases em dois grupos exopeptidase e endopeptidases. Uma exopeptidase é qualquer protease capaz de clivar ligações peptídicas terminais distintas, as ligações adjacentes aos terminais amino ou carboxila. Esta clivagem resulta na liberação de dipeptídeo ou um único aminoácido da cadeia proteína-peptídeo (NAVEED et al., 2021). Com base no local de clivagem, seja no terminal C ou no terminal N, essas peptidases são de dois tipos. Se o local de ação é o terminal C, a peptidase é chamada de carboxipeptidase, caso a peptidase tenha o terminal N como local de ação, é considerada como aminopeptidase (SANI et al., 2017; SAWANT & NAGENDRAN, 2014). Ao contrário da exopeptidase, endopeptidase divide as ligações peptídicas dentro da molécula de proteína, ou seja, as ligações de aminoácidos que são não terminais, em um local distante do substrato (KUMAR, 2020). Endopeptidases são classificados em vários tipos com base na influência da presença de um grupo funcional específico no sítio ativo, podendo-se citar a serina protease, protease aspártica, protease de cisteína e metaloprotease (SANI et al., 2017).

Assim proteases podem ser divididas em seis grupos: serina proteases, que possuem um resíduo nucleofílico de serina no centro catalítico; cisteína proteases com uma cisteína ativa; treonina proteases com uma treonina; metaloproteases, que requerem a presença de um metal cátion no sítio ativo; aspartil proteases, onde a catálise é realizada por ácido aspártico e proteases de tipo de catálise desconhecido. Interessantemente, proteases de serina, cisteína e treonina exibem um tipo covalente de hidrólise de substrato, que envolve a formação de uma ligação covalente, denominada intermediário tetraédrico, entre o grupo nucleofílico no sítio ativo (-OH ou -SH) e o substrato envolvido na reação (RAWLINGS et al., 2018).

Podem também ser classificadas de acordo com o intervalo de pH no qual tem atividade mais elevada. São denominadas de proteases ácidas as com maior atividade entre pH 2-6, proteases neutras entre pH 6-8 e proteases alcalinas apresentam alta atividade entre pH 8-13 (RAO et al., 1998; SOUZA et al, 2015). Além das proteases ácidas, alcalinas e neutras, várias outras proteases específicas como carboxipeptidases, aminopeptidases e metaloproteases estão disponíveis e comumente utilizadas (GURUMALLESH et al., 2019).

A estrutura do sítio ativo da protease define sua ligação ao substrato e determina como o substrato se ajustará à enzima e, conseqüentemente, é o responsável por definir a especificidade do substrato pela protease (TURK, 2006). Essa especificidade

é o que determina a posição onde a enzima será capaz de hidrolisar e é importante na escolha da protease de acordo com a proteína que será hidrolisada, modulando o grau de hidrólise, bem como o perfil de aminoácidos liberados (TAVANO, 2013).

3.4 Produção de proteases por microrganismos

As enzimas proteolíticas podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou microbianas (ARSHAD et al., 2019).

Em 1960, tecidos vegetais ou exsudatos e órgãos animais eram as principais fontes de extração de enzimas. Após 20 anos, todo o cenário mudou e a maioria das enzimas industriais passou a ser produzida a partir de fontes microbianas (VITTALADEVARAM, 2017). Quando comparados a plantas e animais, os microrganismos representam uma atrativa fonte de proteases, pois podem ser cultivados em grandes quantidades em um tempo relativamente curto por métodos de fermentação estabelecidos, e produzem um suprimento regular e abundante da quantidade desejada de produtos. Além disso, as proteases microbianas têm maior vida útil, podendo ser armazenadas em condições abaixo do ideal por semanas sem perda significativa de atividade (BORAD et al., 2017).

A primeira etapa na produção de proteases é a etapa de isolamento microbiano. Os produtos da fermentação são quantificados a determinar os melhores microrganismos produtores, que devem ser capazes de produzir a enzima em um rendimento desejável. Os microrganismos usados na produção de proteases são geralmente isolados em locais com condições adversas que refletem o tipo e as características da enzima que será produzida (DOS SANTOS AGUILAR & SATO, 2018).

O tipo de fermentação, submersa (SmF) ou sólida (SSF), tem influência no crescimento microbiano e também na produção de enzimas (BIESEBEKE et al., 2002). A principal diferença entre eles é a quantidade de água. No SmF os microrganismos crescem em meio líquido com alta disponibilidade de água livre, já a SSF é realizada na ausência ou quase ausência de água, onde os microrganismos crescem em substratos sólidos e úmidos que agem como fontes de nutrientes (SOCCOL et al., 2017).

A fermentação submersa é geralmente utilizada nos processos industriais para produção de enzimas. Este processo envolve o crescimento de microrganismos cuidadosamente selecionados em recipientes fechados contendo meio de fermentação rico em nutrientes e uma alta concentração de oxigênio. À medida que os microrganismos decompõem os nutrientes, eles liberam as enzimas desejadas na solução. A maioria das enzimas industriais é secretada por microrganismos no meio de fermentação, a fim de quebrar as fontes de carbono e nitrogênio. Parâmetros como temperatura, pH, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono são medidos e controlados para otimizar o processo de fermentação. Como a maioria das enzimas industriais são extracelulares, permanecem no caldo fermentado após a remoção da biomassa (RENGE et al., 2012).

A fermentação em líquido envolve uma série de etapas que são caracterizadas em processos *upstream*, *midstream* e *downstream* (MITCHELL et al., 2000; ASHOK et al., 2017). O processo *upstream* envolve a preparação de substratos e meios de crescimento e o isolamento de microrganismos usados para a fermentação, seguido pelo processo *midstream* durante o qual o substrato é inoculado e fermentado, e então o processo *downstream* onde os produtos finais obtidos são processados para embalagem (LIN et al., 2020; SÉLO et al., 2021; WARD et al., 2020; al., 2022).

Segundo Téllez-Luis, Ramírez e Vázquez (2004), o meio de cultura representa 30% do custo de um processo de fermentação e sua composição reflete no crescimento microbiano e na produção de metabólitos, portanto, desempenha um papel significativo na produção de enzimas. Outros fatores como temperatura, pH e tempo de incubação também influenciam o metabolismo microbiano (ABIDI, LIMAM, & NEJIB, 2008).

Cada microrganismo tem suas próprias condições para produção máxima de enzimas, sendo necessário o estudo para conhecimento das condições ótimas para o aumento da atividade de protease.

3.4.1. Proteases produzidas pelo gênero *Bacillus*

Dentre as bactérias, destacam-se as bactérias lácticas (BAL), reconhecidas entre os microrganismos como as mais valiosas para obtenção de peptídeos bioativos, devido à sua alta adaptabilidade a diferentes ambientes. São consideradas seguras, uma vez que essas bactérias são conhecidas como “bactérias amigáveis”

pois várias cepas são identificadas como “geralmente reconhecidas como seguras” (GRAS – Generally Recognized as Safe), e também, pelo eficiente sistema proteolítico que as caracteriza (LAFARGA & HAYES, 2017; MELINI et al., 2019).

Com o recente desenvolvimento da biotecnologia, há um crescente interesse e demanda por enzimas com propriedades específicas. Portanto, a demanda por proteases altamente ativas industrialmente com especificidade apropriada e estabilidade de temperatura, pH e íons metálicos fazem com que continue a aumentar a busca por novas fontes da enzima (VIJAYARAGHAVAN & VINCENT, 2012)

Microrganismos alcalifílicos são extremamente dependentes do pH extracelular para seu crescimento celular e produção de enzimas. Esses microrganismos crescem de forma ideal sob condições de pH acima de pH 9. Geralmente, o pH citoplasmático desses microrganismos pode ser estimado a partir do pH ótimo de enzimas intracelulares ou medindo a distribuição interna e externa de bases fracas que não são ativamente transportadas pelas células. Cada enzima tem uma faixa de pH ideal na qual exibe atividade máxima (SHARMA et al., 2019).

A temperatura é outro parâmetro importante que precisa ser controlada para o máximo crescimento celular e produção de enzimas protease. A protease mostra atividade ótima em temperaturas variando de 40 a 70 °C (BARZKAR, 2020).

A presença de íons metálicos influencia a atividade da protease. Para atividade máxima, essas enzimas requerem um íon divalente, como Mn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} , ou uma combinação de íons divalentes. Indiscutivelmente, esses cátions protegem a enzima contra a desnaturação térmica e desempenham um papel importante na manutenção da conformação ativa da enzima em temperaturas muito altas (ANNAMALAI et al., 2014).

3.5 Aplicação das proteases

As proteases alcançaram interesse biotecnológico devido a várias aplicações industriais como nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de papel, couro e têxtil, bem como na síntese de peptídeos (RAZZAQ et al., 2019). É um dos 3 maiores grupos de enzimas usadas industrialmente. O grupo das proteases, constituem o mais importante grupo de enzimas industriais, representando pelo menos 60% de todas as vendas de enzimas industriais de todo mundo. São consideradas ferramentas chave

em biotecnologia e áreas afins devido à sua natureza catalítica (FRAATZ et al., 2014; JEMLI et al., 2016).

O tipo de aplicação da enzima basicamente define o processo de produção. Por exemplo, as enzimas usadas em tecidos, rações animais e alimentos são produzidas amplamente sem exigência de elevado nível de pureza, enquanto as enzimas a serem utilizadas em medicamentos e produtos de saúde normalmente requerem tal nível (VACHHER et al., 2021). A enzima recém-produzida deve ser isolada, purificada e caracterizada para detectar suas propriedades para aplicações industriais. Esta etapa aumenta sua atividade específica para ser mais compatível com sua aplicação (ADINARAYANA et al., 2003).

Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão óbvias que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando um mercado de aproximadamente U\$ 2,3 bilhões.

As proteases alcalinas são amplamente utilizadas em várias indústrias, como detergentes, couro, amaciamento de carnes, e tratamento de águas residuais. Essas proteases alcalinas produzidas a partir de fontes microbianas foram relatadas como altamente estável, eficaz e conveniente na produção em larga escala (ABDULLAH AL-DHABI et al., 2020).

Nos últimos anos, as proteases deixaram de ser aditivos para se tornarem um dos componentes padrão de todos os tipos de detergentes (DOS SANTOS AGUILAR & SATO, 2018). Essas enzimas têm sido aplicadas para melhorar a capacidade de limpeza dos detergentes por cerca de 6 décadas e agora são constituintes bem aceitos em detergentes domésticos em pó e líquidos e removedores de manchas. As proteases são usadas na forma de pó na composição do detergente, sendo preparado como grânulos característicos contendo cera que estão presentes nos detergentes enzimáticos e protegem o usuário da inalação indesejável de poeiras de protease (WARD, 2011). Um dos requisitos para o uso de proteases na formulação de detergentes é sua alta atividade e estabilidade em altos valores de pH e temperatura, além de ser resistente e compatível com agentes quelantes e oxidantes presentes na formulação. Na moderna indústria de detergentes, onde os surfactantes podem ser aplicados como aditivos, as proteases alcalinas que são estáveis em pH alcalino e têm propriedades termoestáveis são preferidas (HMIDET et al., 2009). Portanto, a presença de pH alcalino, alta especificidade de substrato,

termoestabilidade e compatibilidade com solventes orgânicos, enfatiza a demanda industrial dessa enzima (YILDIRIM et al., 2017).

A utilização de proteases na indústria de alimentos já é bem conhecida, e têm sido utilizadas para diversos fins, como produção de lácteos, panificados, na clarificação de goma xantana, entre outros (DOS SANTOS AGUILAR & SATO, 2018).

As proteases são principalmente aplicadas na produção de laticínios, possuem propriedades coagulantes de leite e a maioria delas são pertencentes à classe das aspártico proteases. As enzimas coagulantes do leite podem ser divididas em coalhos animais, coagulantes de leite microbianos e quimosina geneticamente modificada. Coalho de bezerro é uma enzima de coagulação do leite obtida a partir de estômagos de bezerros sendo o principal componente do coalho de bezerro a quimosina (FERNÁNDEZ-SALGUERO et al., 2003). Nos últimos anos, com a expansão da produção global de queijo, tornou-se progressivamente mais difícil fornecer estômagos de bezerros adequados, dos quais o coalho pode ser obtido (AMIRA et al., 2017). Para superar esse problema, a quimosina recombinante (de microrganismos geneticamente modificados) foi introduzida e obteve a aprovação do FDA para aplicações na fabricação de queijos em 1989 (FERNÁNDEZ-SALGUERO et al., 2003). No entanto, diferentes fatores, como por exemplo, coalho de bezerro de alto custo, questões religiosas, dieta (vegetarianismo ou consumidores que são contra produtos geneticamente modificados) e proibição de quimosina recombinante em alguns países, bem como demanda para a produção de queijos com sabor e textura novos e especiais, motivaram os pesquisadores a encontrar novos coagulantes de leite (ABD EL-SALAM et al., 2017). A quimosina foi gradualmente substituída por algumas proteases microbianas produzidas por microrganismos GRAS, como *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* e *Endothia parasitica* (RAO et al., 1998).

Na indústria de panificação, proteases são usadas na degradação de proteínas para a fabricação de bolachas assadas e biscoitos (ADRIO & DEMAINE, 2014). Na indústria cervejeira, são utilizadas para a extração de proteínas de cevada, bem como de malte e também usadas para obter o número preferido de nutrientes, como nitrogênio (PANDEY, 1999).

Proteases alcalinas têm a capacidade de tornar o couro mais elástico e ajudam a degradar a queratina, possuindo uma grande eficácia no biotratamento do couro. Apesar das fortes condições alcalinas, este processo é mais seguro e agradável ao

meio ambiente do que os métodos tradicionais de tratamento com sulfeto de sódio (MALATHI & CHAKRABORTY, 1991).

Atualmente, várias enzimas microbianas têm usos medicinais proeminentes como remoção de pele morta, tratamento de distúrbios digestivos, doenças infecciosas, câncer, por enzimas fibrinolíticas, enzimas desintoxicantes, entre outras (IANIRO et al., 2016; TAIPA et al., 2019; DHANKHAR et al., 2020). Além de sua utilidade no tratamento de condições que ameaçam a vida, essas enzimas são usadas no diagnóstico de doenças (VIMAL & KUMAR, 2019).

A protease de microrganismos pode ser utilizada na bioconversão de resíduos em biomassa útil, desempenhando assim um papel considerável na gestão de resíduos. Os resíduos proteínicos são solubilizados pela protease, que diminui a demanda biológica de oxigênio dos sistemas aquáticos. Atualmente é comum o uso de proteases para gerenciamento de resíduos de diferentes atividades domésticas e indústrias de processamento de alimentos (SHARMA et al., 2019).

As proteases são enzimas extremamente versáteis. Conhecer suas características para aplicações industriais tem se tornado de grande relevância na pesquisa. As proteases têm aplicações em alimentos, detergentes, tratamento químico, farmacêutico, de couro e de águas residuais indústrias. O uso dessas enzimas gerou oportunidades para o desenvolvimento de produtos modernos e sustentáveis.

3.6 Referências Bibliográficas

Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioprocess Processing*, 92(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.009>

A. Sumantha, C. Larroch, A. Pandey, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2006) 211–220

Abd El-Sal, B. A. E.-Y., Ibrahim, O. A. E.-H., & El-Sayed, H. A. E.-R. (2017). Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* L.) flowers as coagulant on white soft cheese. *International journal of dairy science*, 12(4), 254–265.

Amira, A. B., Makhoul, I., Petrut, R. F., Francis, F., Bauwens, J., & Attia, H. (2017). *Effect of extraction pH on techno-functional properties of crude extracts from wi.*

Adinarayana, K., Ellaiah, P., & Prasad, D. S. (2003). Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, 4(4), 1–9.

Abidi, F., Limam, F., & Nejib, M. M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, 43, 1202–1208.

Al-Maqtari, Q.A., Al-Ansi, W., Mahdi, A.A., 2019. Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry - a review. *Int. J. Agri. Inn. Res.* 8, 62–82. Almeida, A.F., Dias

Arshad, N., Siow, H.-L., Ngoh, Y.-Y., Sofian, N. A. H. S., & Gan, C.-Y. (2019). Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides. *Enzymes in Food Biotechnology* (p. 343–367). Elsevier

Barzkar, N. (2020). Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>

Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., & Punt. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project.

Borad, S. G., Kumar, A., & Singh, A. K. (2017). Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3690–3702.

Chai, W.S., Bao, Y., Jin, P., Tang, G., Zhou, L., 2021. A review on ammonia, ammonia-hydrogen and ammonia-methane fuels. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 147, 111254.

Daneshvar, E., Wicker, R. J., Show, P.-L., & Bhatnagar, A. (2022). Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO₂ biofixation and biomass valorization – A review. *Chemical Engineering Journal (Lausanne, Switzerland: 1996)*, 427(130884), 130884.

Dermiki, M., & FitzGerald, R. J. (2020). Physicochemical and gelling properties of whey protein hydrolysates generated at 5 and 50 °C using Alcalase® and Neutrase®, effect of total solids and incubation time. *International Dairy Journal*, 110(104792), 104792.

Dhankhar, R., Gupta, V., Kumar, S., Kapoor, R.K., Gulati, P., 2020. Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2857–2869. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10432-2>.

Dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 103, 253–262.

Fernandez-Salguero, J., Prados, F., Calixto, F., Vioque, M., Sampaio, P., & Tejada, L. (2003). Use of recombinant cyprosin in the manufacture of Ewe's milk cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7426e7430.

Fraatz, M. A.; Ruhl, M.; Zorn, H. Food and feed enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 143, 229–256. Doi:10.1007/10_2013_235, 2014.

Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins' biological activities and their potential for valorization. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(1), 137.

Ghaly, A. E.; Ramakrishnan, V. V.; Brook, M. S.; Budge, S. M.; Dave, D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, aminoacids and oils: a critical review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 5(4), 107-129, 2013.

Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C.H.N. (1973) The genus *Bacillus*. United States Department of Agriculture. Washington.

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254–267.

Han, L., Zhao, Y., Cui, S., & Liang, B. (2018). Redesigning of microbial cell surface and its application to whole-cell biocatalysis and biosensors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(2), 396–418.

Hayes, M., & Flower, D. (2013). Bioactive Peptides from Marine Processing Byproducts. *Em Bioactive Compounds from Marine Foods* (p. 57–71). John Wiley & Sons Ltd.

Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.-K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical*

Ianiro, G., Pecere, S., Giorgio, V., Gasbarrini, A., Cammarota, G., 2016. Digestive enzyme supplementation in gastrointestinal diseases. *Curr. Drug Metabol.* 17, 187–193.

Jain, A., Sarsaiya, S., Kumar Awasthi, M., Singh, R., Rajput, R., Mishra, U. C., Chen, J., & Shi, J. (2022). Bioenergy and bio-products from bio-waste and its associated modern circular economy: Current research trends, challenges, and future outlooks. *Fuel* (London, England), 307(121859), 121859.

Jemli, S.; Ayadi-Zoauri, D.; Hlima, H. B.; Bejar, S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 246–258, 2014.

Kumar, M. (2020). Industrial applications of protease: a review. *J. Nat. Remedies*, 20(4), 1–6.

Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Effect of pre-treatment on the generation of dipeptidyl peptidase-IV-and prolyl endopeptidase-inhibitory hydrolysates from bovine lung. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 56(1), 12–24.

Low, S. S., Bong, K. X., Mubashir, M., Cheng, C. K., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, Y. C., Lee, K. T., Munawaroh, H. S. H., & Show, P. L. (2021). Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (POME) treatment and biofuel production. *Sustainability*, 13(6), 3247.

Malathi, S.; Chakraborty, R.(1991) Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl Environment Microbiology*, 57:712–716.

Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 73, 204–212.

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. *Nutrients*, 11(5), 1189.

Mussato, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007). Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, 41:28-33.

Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323.

Pandey, A. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 149–162.

Raina, D., Kumar, V., & Saran, S. (2022). A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques. *Chemosphere*, 294(133712), 133712.

Ramesh, A., Harani Devi, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). Commercial Applications of Microbial Enzymes. *Em Microorganisms for Sustainability* (p. 137–184). Springer Singapore.

Rao, M. B et al. molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and molecular biology reviews*, v.62, n3, p.597-635. ISSN 1092-2172, 1998.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M., 2019. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.

Renge, V., Khedkar, S., & Nandurkar, N. R. (2012). Enzyme synthesis by fermentation method: a review. *Sci Rev Chem Comm*, 2, 585-e90.

Sani, J. T., Gharibi, S. O. S., & Shariati, M. A. (2017). The importance of alkaline protease commercial applications: a short review. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol*, 5(1).

Samanta, S., 2020. α -Amylases: an overview on molecular structure and biotechnological perspectives. In: Thatoi, H., das Mohapatra, P.K., Mohapatra, S., Mondal, K.C. (Eds.), *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press.

Sawant, R., & Nagendran, S. (2014). Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 3(6), 568–579.

Sneat, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.) (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2 Williams & Wilkins, Baltimore.

Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology (New Rochelle, N.Y.)*, 15(2), 69–78.

Soccol, C. R., Costa, E. S. F., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P.d. S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*.

Souza, P. M. D. A biotechnology perspective of fungal protease. *Brasillian jornal of microbiology*, n. 46, n.2, p. 337- 345. ISSN 1517- 8382, 2015.

Taipa, M.A., Fernandes, P., Carvalho, C.C.C.R., 2019. Production and purification of therapeutic enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1148, 1–24.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 90, 1–11

Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J., & Vázquez, M. (2004). Production of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL–3191 using glycerol as carbon source. *Food Technology and Biotechnology*, 42(2), 75–81.

Turk, B. (2006). Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 785–799.

Tripathi, N.K., Shrivastava, A., 2019. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 420.

Vachher, M., Sen, A., Kapila, R., Nigam, A., 2021. Microbial therapeutic enzymes

Vimal, A., Kumar, A., 2019. Chapter 35— transforming the healthcare system through therapeutic enzymes. In: Kuddus, M. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*, Raipur. Academic Press, pp. 603–625.

Vittaladevaram, V., 2017. Fermentative production of microbial enzymes and their applications: present status and future prospects. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 5 (4), 90–94.

Wang, Q.; Fan, X.; Huab, Z.; Chenb, J. Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal, London*, v. 34, n. 1, p. 107-113, 2007.

Ward, O. P. Proteolytic enzymes. In: BLANC, H. W.; DREW, S.; WANG, D. (eds). *Comprehensive Biotechnology*. v. 3, Oxford, UK: Pergamon Press, 1985, 818 p.

Xu, K., Chen, X., Zheng, R., & Zheng, Y. (2020). Immobilization of multi-enzymes on support materials for efficient biocatalysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 660.

Ward, O. P. (2011). Proteases. In M. Moo-Young (Ed.). *Comprehensive biotechnology* (pp. 571–582). Amsterdam: Elsevier

Yap, J. K., Sankaran, R., Chew, K. W., Halimatul Munawaroh, H. S., Ho, S.-H., Rajesh Banu, J., & Show, P. L. (2021). Advancement of green technologies: A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. *Chemosphere*, 281(130886), 130886.

Yildirim, V., Baltaci, M. O., Ozgencli, I., Sisecioglu, M., Adiguzel, A., & Adiguzel, G. (2017). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 468–477.

Produção, caracterização e aplicação de enzimas proteolíticas por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674

Artigo Original ¹

Resumo

As proteases são enzimas que representam uma das maiores e mais importantes classes de enzimas hidrolíticas, constituindo grande porcentagem de todo o mercado de enzimas industriais. Essas enzimas de origem microbiana apresentam-se como a melhor fonte no que diz respeito às suas diversas propriedades bioquímicas. O uso dos processos biotecnológicos permite a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, as quais podem ser obtidas a partir de microrganismos cultivados em meios contendo resíduos agroindustriais. A utilização destes resíduos, como fonte de carbono, energia e nutrientes para a obtenção da protease, tem garantido boa produção enzimática e redução dos custos do processo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento e a produção de proteases por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo contendo farinha do resíduo do processamento de pescado. A enzima produzida foi caracterizada em relação ao pH, temperatura, íons metálicos e inibidores. O crescimento de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 foi observado durante 120 horas, onde foi determinado o crescimento do microrganismo por densidade ótica (D.O.) a 600 nm e pH e a atividade de protease. A maior produção de enzimas foi observada, em 72 horas de fermentação (779,27 U/mL), com um valor de D.O. de 2,38 e pH de 7,9. O efeito do pH, temperatura, íons metálicos e inibidores foi avaliado, encontrando os valores de pH ótimo de 8,5 (1110,74 U/mL), temperatura ótima 70 °C (943,09 U/mL) e o Mg²⁺ como íon estimulador (122% de atividade relativa) e EDTA e 1-10 fenantrolina como inibidores.

Palavras chave: Protease, *Bacillus*, resíduo de pescado

1. Introdução

As proteases são uma classe significativa de enzimas com inúmeros usos industriais em diferentes setores. A principal função da enzima protease é hidrolisar e catalisar a ligação peptídica presente nas proteínas (Mótyán et al., 2013).

¹ Artigo formatado conforme normas da revista Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

O grupo das proteases, constituem o mais importante de enzimas industriais, representando pelo menos 60% de todas as vendas de enzimas industriais de todo mundo, considerado ferramentas chave em biotecnologia e áreas afins devido à sua natureza catalítica (Jemli et al., 2016).

Podem ser obtidas de uma variedade de fontes, incluindo microrganismos, animais e plantas. As proteases microbianas possuem características interessantes no sentido de baixo custo de produção, boa estabilidade e especificidade. Desempenham um papel fundamental na indústria especialmente em couro, alimentos, detergentes e indústrias químicas, bem como no tratamento de resíduos (Banerjee e Ray, 2017; Adetunji e Olaniran, 2018a).

As proteases microbianas não só desempenham um papel significativo nos processos metabólicos dos organismos, mas também têm atraído atenção notável em aplicações industriais, devido à sua forte especificidade, condições de reação suaves, respeito ao meio ambiente e fácil inativação ou controle em comparação a catalisadores químicos (Bioeng, 2011).

Os microrganismos do gênero *Bacillus* são organismos industriais atraentes, devido às suas altas taxas de crescimento levando a um curto ciclo de fermentação, capacidade de secretar proteínas no meio extracelular e seu *status* GRAS (Generally Recognized as Safe ou ainda Geralmente Considerado Seguro) (Alcaraz et al., 2010). A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas (Wang et al., 2007).

As indústrias agroindustriais que operam em todo o mundo geram grandes quantidades de resíduos e subprodutos agroindustriais como farelo, bagaço de cana, tortas de óleo, cascas (Musa et al., 2018; Sath et al., 2018), resíduos de crustáceos/peixes (Hepziba Suganthi e Ramani, 2016). Esses resíduos se apresentam como uma rica fonte de proteínas, carboidratos, lipídios, carbono, nitrogênio e outros minerais essenciais, podendo atuar então como suporte para o crescimento de microrganismo, e por esse motivo têm sido explorados para produção de produtos de valor agregado, como as enzimas (Sangwan et al., 2016; Salgaonkar e Braganca, 2015).

Segundo a FAO 2020, estima-se que a produção global de peixes tenha chegado a cerca de 179 milhões de toneladas, equivalente a US\$ 401 bilhões. Do montante registrado, 157,4 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano, enquanto cerca de 20 milhões de toneladas restantes representaram os resíduos sólidos gerados. Assim, a geração de resíduos é um desafio para o setor pesqueiro, visto que muitas vezes são descartados em lixões, córregos, rios e mares. Os resíduos de peixe são constituídos de proteína (15-30%), gordura (0-25%) e

água (50-80%) (GHALY et al., 2013). Esses subprodutos incluem carcaça (15–20%), pele e barbatanas (1–3%), ossos (9–15%), cabeças (9–12%), vísceras (12–18%) e escamas (5%) (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a produção de proteases pela bactéria *Bacillus licheniformis* CCMA1674 em cultivos submersos, utilizando resíduos da indústria de pescado como substrato e caracterizar a enzima produzida.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos e meio de manutenção

Para o desenvolvimento deste estudo, foi utilizada uma cultura bacteriana de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, isolada por Pereira (2018) durante a secagem via natural de frutos de café Conilon do sul do Estado do Espírito Santo e identificada no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. A cultura encontra-se armazenada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, Alegre, ES.

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, Alegre, ES.

O microrganismo foi mantido em placas de Petri em meio TSY, composto por (g.L⁻¹ de água destilada): triptona – 20; NaCl – 10; extrato de levedura – 10; ágar – 20; sob refrigeração de 4 °C.

2.2. Preparo e pré tratamento dos resíduos provenientes do processamento de pescado

Os resíduos provenientes do processamento de pescado (carcaças, pele e cabeça) foram obtidos em empresa de processamento de pescado situada no município do litoral sul do Espírito Santo. Os resíduos foram esterilizados em autoclave, secos e triturados por um multiprocessador até a obtenção de uma farinha com granulometria de 0,42 mm, que foi utilizada no experimento. Após o processo de moagem, a farinha foi acondicionada em sacos assépticos com 500 g de amostra e devidamente identificadas e guardadas em freezer à – 20 °C, de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al., (2012).

2.3. Composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado

As determinações de umidade e substâncias voláteis, proteínas, lipídeos e resíduo mineral fixo foram realizadas em triplicata segundo os Métodos Físico-Químicos IAL (Instituto Adolfo Lutz) (2008).

Para a determinação da umidade, as amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 105 °C até peso constante. O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio em proteína. A determinação de lipídeo foi obtida pela extração com éter de petróleo em aparelho especial para determinação de gordura e a matéria mineral foi obtida por incineração completa dos compostos orgânicos em Mufla a 550 °C, restando os compostos inorgânicos.

2.4. Meio de cultivo

Com base em testes preliminares, os seguintes meios de cultura foram preparados:

Tabela 1

Composição dos meios cultivos.

Composição (g.L ⁻¹)	Meio 1	Meio 2	Meio 3
KCl	0,30	0,30	0,30
K ₂ HPO ₄	0,87	0,87	0,87
CaCl ₂	0,29	0,29	0,29
MgSO ₄ ,	0,50	0,50	0,50
Peptona	0,10	0,10	0,10
Soluções traços de metais* (mL)	1,00	1,00	1,00
Caseína	5,0	-	-
Farinha de resíduo de pescado	-	5,00	-
Whey Protein (ISOFORT® - Vitafor)	-	5,00	2,50

*Solução de traços de metais (g.L⁻¹):CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴; H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄,1,0x10⁻³.

2.4.1. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado semeando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período, 10 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células, que foram posteriormente sugadas com auxílio de uma pipeta estéril. Estas células

foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento e incubadas por mais 24 horas em *shaker* rotatório marca CIENLAB (modelo CE – 720) a 37 °C sob agitação de 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular os meios de cultivo.

2.5. Determinação do crescimento microbiano

Os meios de cultivo preparados foram inoculados com 10 % (v/v) dos seus respectivos pré-inóculos e incubados a 37 °C em *shaker* rotatório operando a 150 rpm. Foram retiradas amostras para determinação do crescimento microbiano, de acordo com a metodologia descrita Janssen et al., (1994).

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica a 600 nm com utilização de um espectrofotômetro (THERMO FISHER SCIENTIFIC, modelo: EVO300 PC, Estados Unidos). A retirada das amostras foi realizada retirando os meios de cultivo de 2 frascos, onde foi realizada leitura em triplicata de cada frasco. Foi utilizada a medida do pH do meio, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, para acompanhar o crescimento celular (IAL, 2008), utilizando pHmetro. De 2 frascos, foi retirado amostras em triplicata de cada e realizado a medida.

2.6. Ensaio enzimático

O extrato bruto enzimático ou o sobrenadante, livre de células, foi obtido nos mesmos tempos utilizados para a determinação do crescimento microbiano, por centrifugação do caldo fermentado em centrífuga (HERMLE, modelo: Z326K) a 1020 g durante 15 minutos a 4 °C, baseado nos trabalhos de Janssen et al., (1994).

A atividade proteolítica do extrato bruto enzimático foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (m/v) preparada em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,0). Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1 mL do substrato e, após a incubação em banho-maria a 60 °C por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA. A amostra foi centrifugada a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH (1 M). Uma amostra controle foi preparada em tubo de ensaio contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o TCA, que foi adicionado antes do extrato enzimático. A coloração

desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen et al., 1994). Uma curva de calibração de proteína foi usada seguindo o método de Lowry modificado por Peterson (1977), utilizando-se solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.7. Caracterização parcial da enzima

Para a caracterização parcial da enzima, o meio que proporcionou a maior atividade enzimática foi preparado e utilizado para a obtenção do extrato bruto enzimático.

2.7.1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade das enzimas

O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado nos valores de pH de 5,0 a 9,5 em intervalos de 0,5 unidades. As soluções tampão utilizadas foram: citrato de sódio (pH 5,0), fosfato de potássio (pH 6,0, 6,5 e 7,0), tris-HCl (pH 7,5, 8,0 e 8,5), e glicina-NaOH (9 e 9,5), todas na concentração de 100 mM. O experimento consistiu no preparo do reagente azocaseína, 0,2% (m/v), em cada solução tampão, e a atividade enzimática determinada de acordo com a metodologia descrita no item 2.6.

A estabilidade da protease em diferentes valores de pH (5,0 a 9,5) foi avaliada incubando-se apenas o sobrenadante (extrato bruto) nas soluções tampão descritas anteriormente por 3 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, a atividade residual (%) da protease foi determinada conforme descrito no item 2.6.

2.7.2. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade das enzimas

O efeito da temperatura na atividade da protease foi determinado incubando-se o extrato bruto enzimático com o substrato no tampão ótimo encontrado no item 2.8.1 em temperaturas variando de 30 a 100°C, em intervalos de 10°C. Após 10 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada de acordo com as condições descritas no item 2.6.

A estabilidade térmica da enzima foi determinada pela incubação do sobrenadante durante 2 horas em banho-maria com temperaturas constantes entre 30 e 100 °C, e a cada 30 minutos, medida a atividade. Transcorrido este tempo, a atividade foi obtida segundo item 2.6.

2.7.3. Efeito dos íons metálicos na atividade das enzimas

Para avaliar o efeito dos íons metálicos sobre a atividade da protease, o extrato bruto enzimático foi incubado com os íons correspondentes na temperatura e pH ótimos encontrados nos itens 2.7.1 e 2.7.2 a uma concentração de 5 mM por 10 minutos. Foram utilizados íons cloretos de Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} e sulfatos de Mg^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} . Um controle foi preparado, incubando-se o extrato bruto enzimático na ausência de íons, e sua atividade foi considerada como 100% de atividade relativa (%) e determinada nas condições descritas no item 2.6.

2.7.4 Efeito de inibidores na atividade da enzima

O efeito de inibidores na atividade da enzima foi medido por uma pré-incubação da enzima com cada inibidor por 10 minutos, nas condições ótimas de pH e temperatura obtidas anteriormente e conforme descrito no item 2.6.

Os inibidores utilizados foram: EDTA (5 mM) e 1,10-fenantrolina (1 mM). Um controle foi realizado para a atividade enzimática sem a adição de inibidores.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado

Os resultados obtidos para a composição centesimal da farinha do resíduo do processamento de pescado podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2

Composição centesimal da farinha de resíduo de pescado

Componente	Resultados	LQ
Proteína	51,70 g/100 g	-
Lipídeos Totais	5,61 g/100 g	0,50
Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	30,07 g/100 g	0,50
Umidade e Substâncias voláteis	< 0,50 g/100 g	0,50

*g/100 g: grama por cem gramas; LQ: limite de quantificação

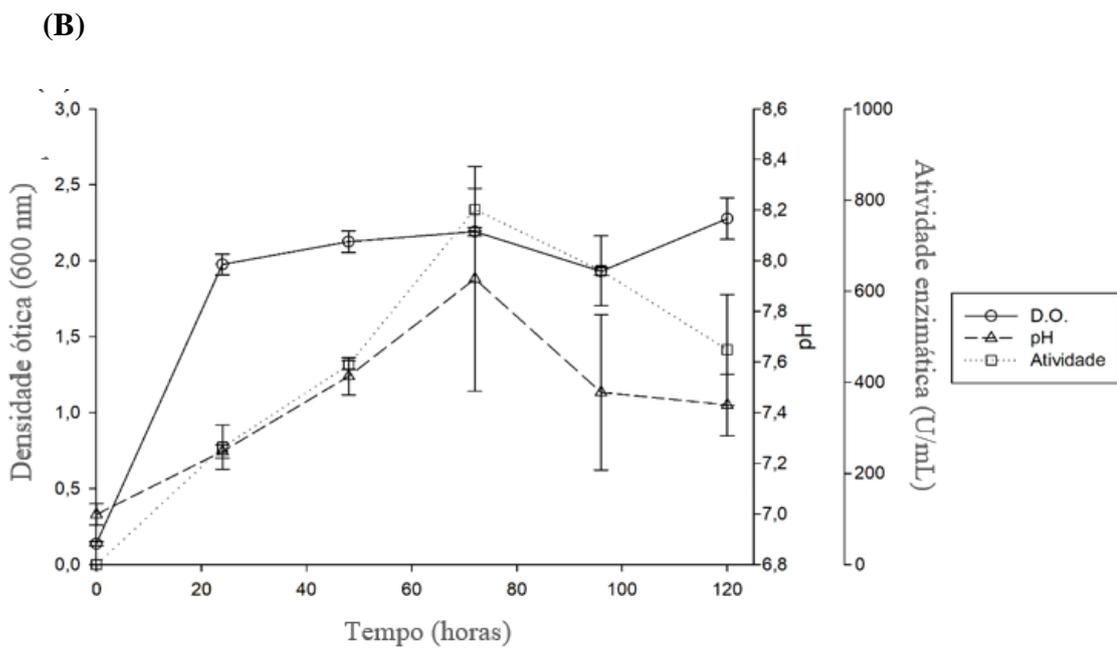
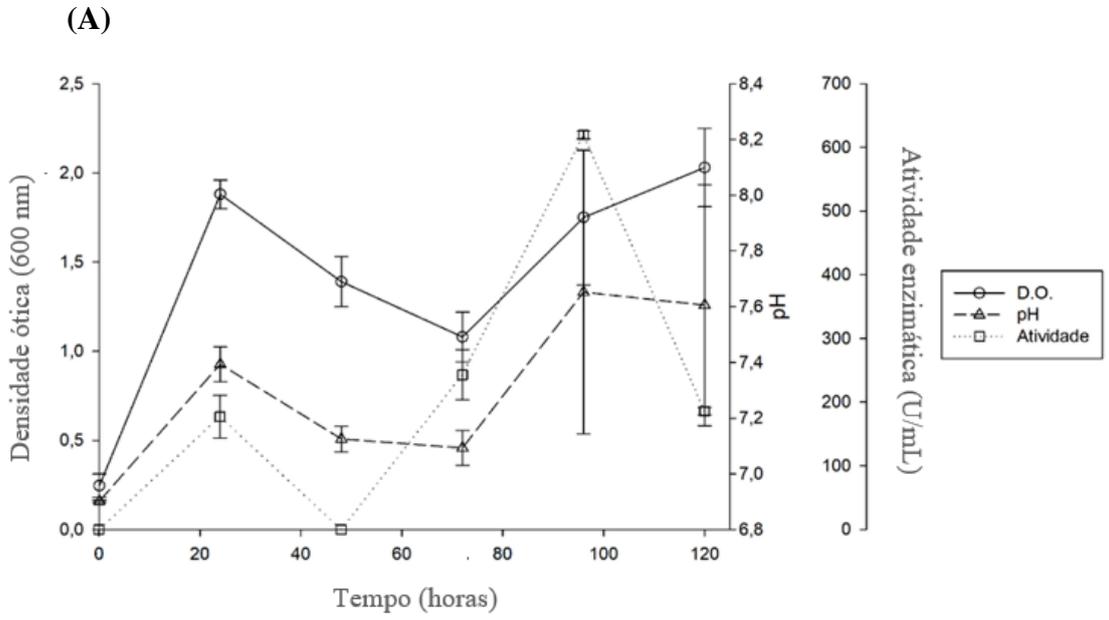
O pescado constitui de rica fonte proteica, o que foi confirmada no resultado obtido, com elevado teor de proteína (51,70 g). Abimorad e Carneiro (2004), Oliveira Filho e Fracalossi (2006), Boscolo et al. (2008) e Gonçalves et al. (2009) relataram que a farinha de peixe exibiu teores de 58,30%, 60,56%, 50,37% e 54,46% de proteína bruta, respectivamente, valores próximos ao encontrado no presente trabalho.

Higuchi (2015) encontrou 27,89% de teor de resíduo mineral fixo na farinha do peixe Patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*), o que é semelhante aos obtidos por Gonçalves et al. (2009), Santos (2013) e o presente estudo. Stevanato et al., (2007) encontraram valores semelhantes aos resultados do estudo. Rocha et al. (2011), estudando farinha de peixe, elaborada com resíduo de tilápia do Nilo, encontraram 2,22% de umidade; 77,96% de proteína bruta; 9,43% de lipídios totais e 13,98% matéria mineral. O elevado valor deste constituinte, deve-se principalmente ao baixo teor de água, ou seja, no processo de elaboração da farinha houve uma redução na umidade e, desta forma, ocorreu um aumento na concentração de proteína, lipídeos totais e cinzas.

3.2- Crescimento e produção de protease por CCMA 1674

No presente estudo, a produção de enzimas proteolíticas foi alcançada usando a cepa bacteriana *Bacillus licheniformis* CCMA 1674. Três meios foram avaliados quanto ao crescimento celular, pH e atividade enzimática. O Meio 1 foi enriquecido com 0,5% de caseína, o meio 2 continha farinha de resíduo de pescado (0,5%) e o meio 3 foi adicionado farinha de resíduo de pescado (0,5%) e whey protein (0,25%), de acordo com a Tabela 1 no item 2.4.

O crescimento de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 iniciou de imediato após a incubação, em todos os meios de cultura (Figura 1). Durante as primeiras 24 horas de incubação, foi observada uma fase exponencial. Após esse tempo, foi observado que a velocidade de crescimento variou em todos os meios, alcançando então a fase estacionária com 72 horas para os meios 1 e 3 e 48 horas para o meio 2.



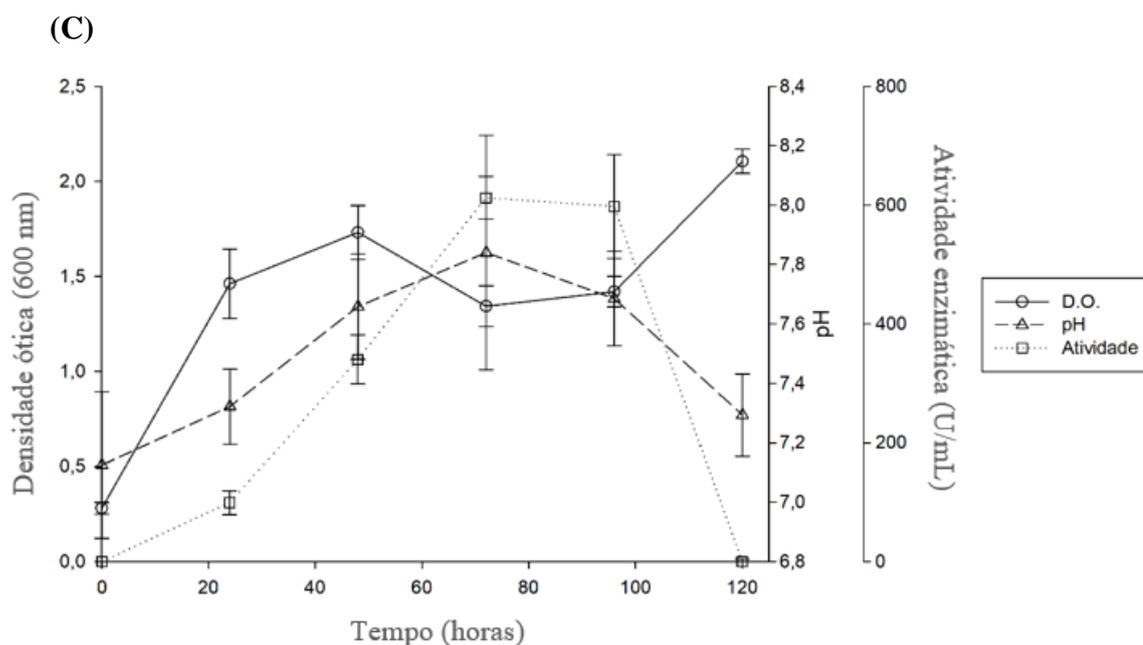


Figura 1: Curva de crescimento, pH e atividade de protease em função do tempo de fermentação por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 em meio 1 contendo caseína (A), meio 2 contendo farinha do resíduo do processamento de pescado (B) e meio 3 contendo Whey Protein (ISOFORT®) e farinha de resíduo de pescado (C). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

O perfil do pH também é ilustrado na Figura 1. Observa-se que os meios 2 e 3 apresentaram perfil similar, com pH tendo ligeiro aumento de 7,0 a 7,8 nas primeiras 72 horas com queda nos tempos 96 e 120 horas, com pH passando de 7,8 para 7,2. O meio 1 apresentou pequeno aumento de pH nas primeiras 24 horas onde o pH passou de 7,0 para 7,4 e queda até o tempo de 72 horas (passando de 7,4 para 7,0), e pouco aumento de 96 a 120 horas de incubação, onde houve aumento de pH 7,0 a 7,6.

O aumento inicial do pH do meio indica que não houve a produção de ácidos durante a fase inicial do crescimento bacteriano. De acordo com Ming Chu (1922), a alcalinização ou a acidificação de um meio de cultura reflete o consumo de substrato. Quando o nitrogênio orgânico está sendo assimilado, o meio se torna alcalino e quando íons de amônio estão sendo utilizados, o meio se torna mais ácido.

Foi observado uma produção de protease satisfatória em todos os meios avaliados. Verificou-se que *B. licheniformis* CCMA 1674 obteve melhor resultado de produção de protease no meio 2, fato esse que pode ser explicado, levando-se em consideração o alto teor de proteínas presentes na farinha de resíduo de pescado (51,70 g/100 g). Nesse meio, o melhor tempo de fermentação foi de 72 h, apresentando atividade proteásica de 779,27 U/mL, conforme mostrado na Fig.1 Esse valor foi superior ao obtido por Couto et al., (2022), que

utilizaram o microrganismo *Paenibacillus graminis* MC 2213, onde a fermentação foi realizada em meio de cultura contendo farinha de semente de *Gliricidia sepium*, com atividade da protease de 13,45 U/mL, no mesmo tempo. Barbosa et al. (2014), avaliaram a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura constituído por farinha de casca de maracujá e soro de leite, obtiveram atividade máxima (2,5 U/mL) de protease após 72 horas de fermentação. Maghsoodi et al., 2013, utilizando *Bacillus licheniformis*, obteve maior valor de crescimento após 72 horas de incubação e a atividade proteolítica aumentou com o tempo de cultivo atingindo o valor máximo (176,7 U/ml) após 72 h de incubação a 37°C e pH 7,6. Shaikh et al., 2023 mostraram a variação no crescimento do *Bacillus nakamurai* PL4 e produção de protease. Em 72 horas de incubação, observou-se que o crescimento celular foi alto (DO a 600 nm: 0,7612) e atividade máxima de protease (0,92 U/mL).

3.3. Caracterização parcial da enzima

A caracterização da enzima foi realizada utilizando o Meio 2, que mostrou a maior produção de protease.

3.3.1.- Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A protease produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA-1674 foi avaliada na faixa de pH entre 5,0 a 9,5 (Figura 2). O pH ótimo encontrado foi de 8,5 na presença de tampão Tris-HCl (1110,74 U/mL). Observou-se baixa atividade enzimática em pH 5, na presença de citrato de sódio. Barbosa, (2015) em seu estudo sobre a utilização de farinha de casca de maracujá para a produção de protease por *Bacillus sp.*, encontrou pH ótimo acordante ao encontrado no presente estudo. A maioria dos *Bacillus sp.* relatados em literaturas, possuem pH ótimo na faixa de 7,0 a 11,0 para a produção de protease.

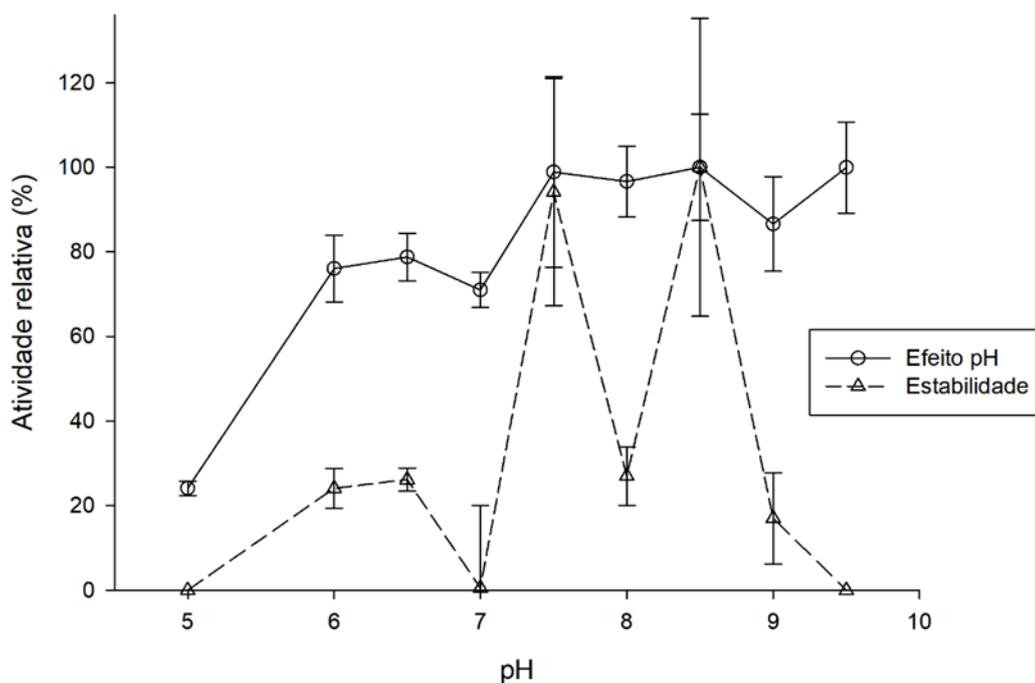


Figura 2: Efeito do pH na atividade da protease (—○—) e estabilidade (—△—) da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 crescido em meio de cultivo contendo farinha do resíduo de pescado a 37 °C durante 72 horas (100% de atividade = 1110,75 U/mL). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Marathe et al., (2018) registraram a atividade de protease alcalina isolada de *Bacillus subtilis* de $103,26 \pm 2,11$ U/ml em pH 10 em tampão acetato de sódio e $92,25 \pm 1,82$ U/mL em pH 10 em tampão fosfato. Da mesma forma, proteases de espécies de *Bacillus* como *B. pumilis*, *B. firmus* e *B. licheniformis* foram ativas em pH 9–11 (Kiranmayee e M, 2007).

Em relação à estabilidade da enzima do presente estudo, verificou-se que a protease se manteve estável entre os pH 7,5 (1058,23 U/mL), 8 (1073,18 U/mL), 8,5 (1110,75 U/mL) 9 (961,53 U/mL) e 9,5 (1110,05 U/mL). De acordo com Ravindran e Jaiswal, (2016), é comum que enzimas sejam mais estáveis em valor de pH igual ao seu pH ótimo de atividade, o que pode ser observado no presente estudo. O perfil da estabilidade de pH de *Bacillus licheniformis* K7A (Hadjidj et al., 2018), indicou que a protease foi altamente estável na faixa de pH de 7-12. Deng et al., (2010) encontraram valores ótimos de pH de 8,5 a 10, utilizando *Bacillus sp.* Este resultado está de acordo com Jain et al., (2012) e Ben Elhoul et al., (2015).

Observa-se que a enzima sofreu perda considerável (76%) de atividade em condições ácidas (\leq pH 6), portanto, pode ser caracterizada como uma protease alcalina.

3.3.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

A enzima obtida durante o cultivo de 72 horas de fermentação a 37 °C e 150 rpm de agitação, foi avaliada em diferentes temperaturas, abrangendo uma faixa de 30 °C a 100 °C, conforme o item 2.6. em ensaios em pH 8,5. Nota-se que a atividade enzimática foi crescente até 70 °C, e apresentou queda a partir de 80 °C. A temperatura ótima encontrada foi de 70 °C onde a atividade de protease foi de 943,10 U/mL (Figura 3).

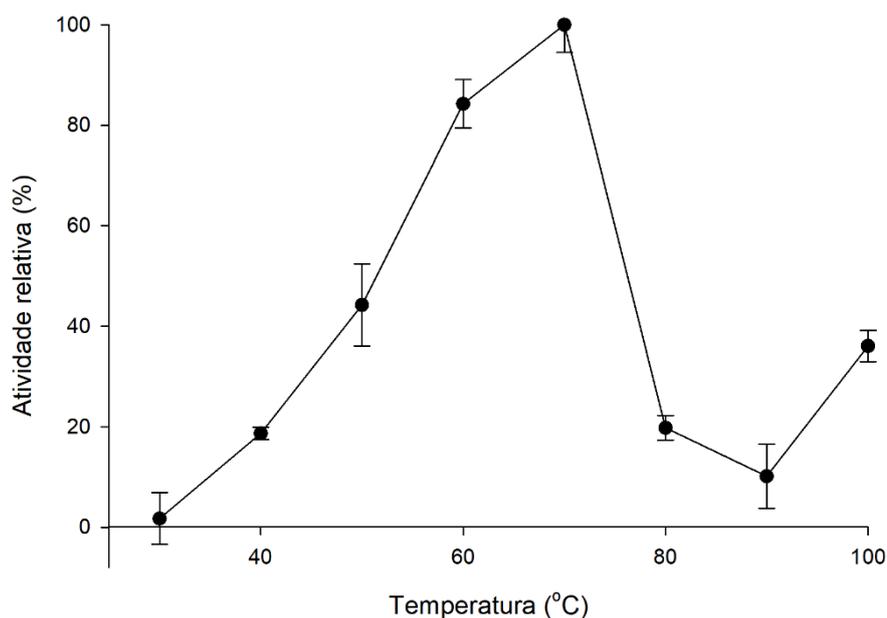


Figura 3: Efeito da temperatura na atividade da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo contendo farinha do resíduo de pescado, crescido a 37 °C durante 72 horas. (100% de atividade = 943,10 U/mL de proteína, encontrado na temperatura de 70°C). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

A maior atividade de protease foi detectada também a 60 °C (312,6 U/mL), no entanto, uma atividade substancial foi observada a 70 °C (306,2 U/mL) e 80 °C (301,6 U/mL) por Singha; Bajaj (2015). Ao medir a atividade enzimática em diferentes temperaturas, Emran et al., (2020), encontraram atividade ótima a 70 °C, o que corrobora com o presente estudo. Este resultado foi superior a 45 °C (Harer et al., 2018), 55 °C (Gulmus e Gormez, 2020; Zheng et al., 2020) e 60 °C (Ahmad et al., 2020; Hammami et al., 2020; Iqbalsyah et al., 2019) relatado para bactérias proteases alcalinas, mas o resultado semelhante foi relatado por Gaonkar e Furtado (2020) e Lakshmi et al. (2018).

Os ensaios de termoestabilidade (Figura 4) realizados revelaram que a protease manteve sua atividade em 20% de 30 até 120 minutos nas temperaturas 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 80°C

e 90°C. Em 70°C manteve-se estabilidade a 40% de 30 a 120 minutos, já a 100°C observou-se que a atividade se manteve em 15% em média de 30 a 120 minutos. Estudos de estabilidade térmica para proteases alcalinas indicaram que a atividade da enzima produzida pelo *Bacillus invictae* AH1 diminuiu para 10,48% de sua atividade máxima após pré-incubação a 60 °C por 1 h (Hammami et al., 2020), enquanto a enzima produzida por *Geobacillus* SBS-4S (um subgrupo de *Bacillus*) reteve 50% de sua atividade após pré-incubação a 60 °C por 110 min (Ahmad et al., 2020).

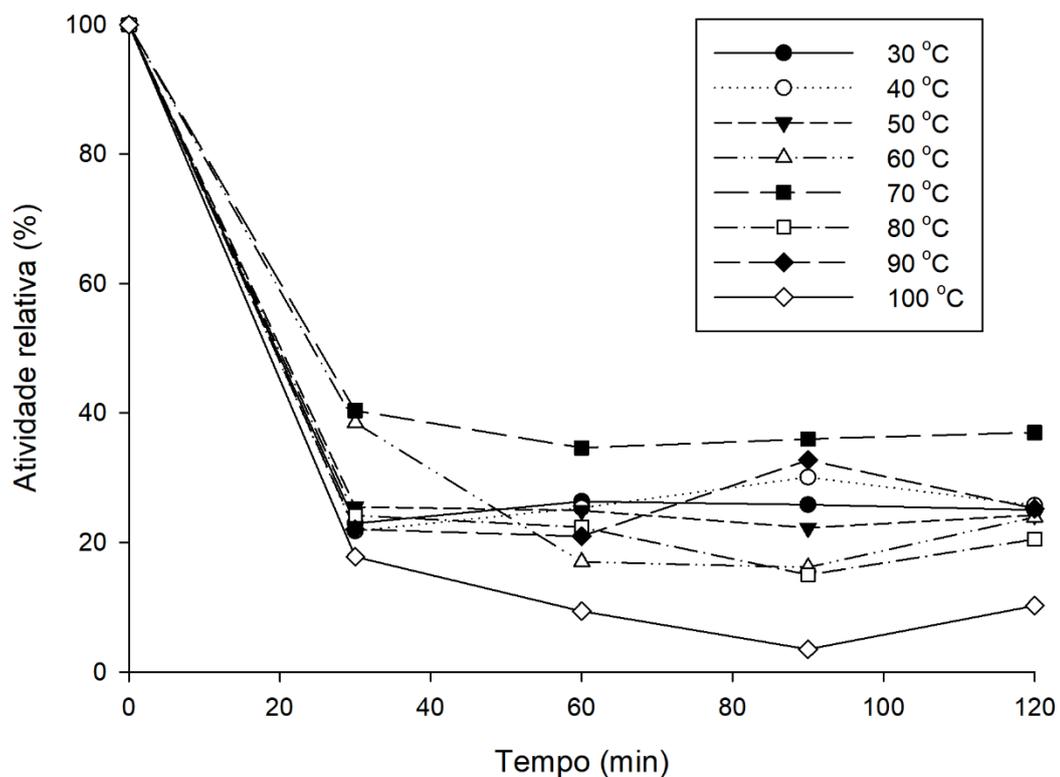


Figura 4: Estabilidade da protease secretada por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio de cultivo contendo farinha do resíduo de pescado, crescido a 37 °C durante 72 horas (100% de atividade = 943,10 U/mL, medida em pH 8,5, 70°C por 10 minutos). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

3.3.3. Efeito dos íons metálicos e inibidores na atividade de protease

Os íons metálicos foram utilizados na concentração de 5 mM. A atividade da protease foi elevada na presença de Mg^{2+} (122,71%). A atividade da enzima produzida por *B. licheniformis* CCMA 1674 foi inibida completamente por Fe^{2+} (Figura 5).

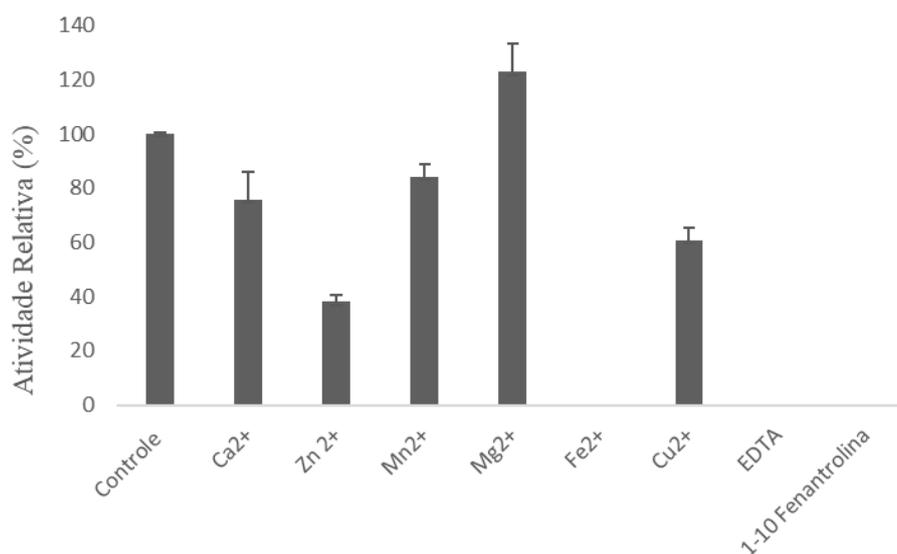


Figura 5: Atividade relativa de íons metálicos e inibidores de atividade de protease, incubadas a 70 °C por 10 minutos. A atividade relativa foi expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de íons metálicos (100% de atividade = 510,05 U/mL). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Couto et al. (2022) obtiveram resultado positivo para os íons Cu²⁺ (275,42%), Zn²⁺ (132,62%) e Na⁺ (126,69%) e inibição apenas por Mg²⁺ (97,45%). Nasri et al. (2011) relataram que a adição de Mg²⁺ e Ca²⁺ aumentou a atividade da enzima em cerca de 13% e 15%, respectivamente. De acordo com Nascimento et al. (2017), é provável que Ca²⁺ esteja envolvido no mecanismo de enzimas fibrinolíticas implicando a ligação a grupos carboxilas, alterando assim seu sítio ativo.

Os inibidores específicos são ferramentas valiosas para a identificação dos principais tipos de peptidases. Em relação as metaloproteases os inibidores mais específicos são a 1,10-fenantrolina ou o etileno-diamino-tetracético (EDTA) (Rawling, 1994). O efeito dos inibidores de protease (Figura 5) sobre a enzima, mostrou que a atividade enzimática foi completamente inibida por EDTA (10 mM) e 1-10 fenantrolina. Bhange et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes no estudo realizado, onde o EDTA e 1-10 Fenantrolina afetaram negativamente a atividade da protease. Jellouli et al., (2011) utilizando EDTA, reteve 38,8% da atividade quando pré-incubado em concentração de 10 mM do inibidor.

A estabilidade térmica da enzima do presente estudo foi realizada utilizando o Mg²⁺, por este íon ter ativado a enzima. O Mg²⁺ foi incubado com o extrato bruto enzimático e foi testado em três diferentes temperaturas, 50 °C (Figura 6), 70 °C (Figura 7) e 90 °C (Figura 8)

avaliando-se a atividade a cada 30 minutos durante 2 horas. O melhor resultado foi obtido na temperatura de 50 °C em 90 minutos (578,45%). Hadj-Ali et al., 2007, utilizando *Bacillus licheniformis* NH1, a estabilidade da protease foi determinada pela incubação da enzima em diferentes tampões por 1 e 24 h a 23°C e a atividade residual foi medida em pH 10,0 e 60°C. A protease foi estável entre pH 5,0 e 12,0, e maior estabilidade foi observada na faixa de pH 10,0–12,0.

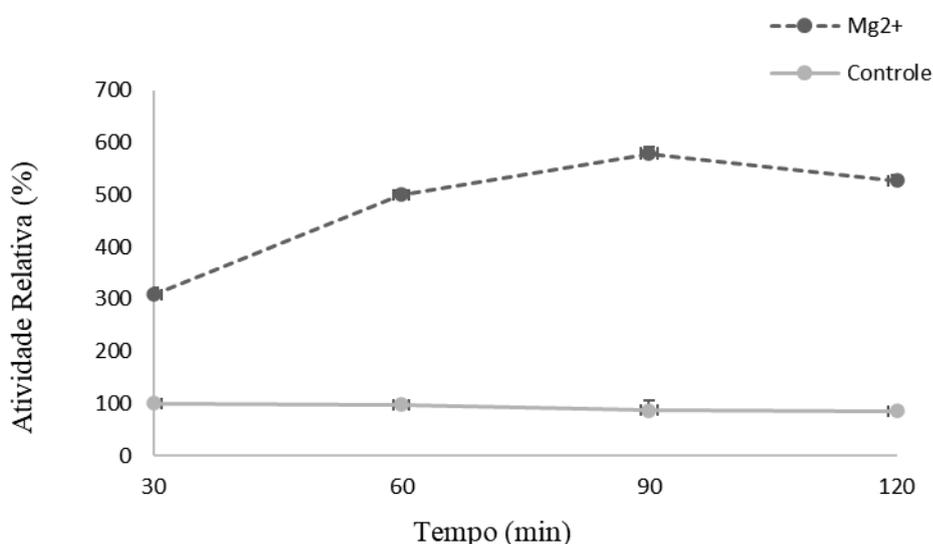


Figura 6. Estabilidade da protease secretada pelo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 50 °C (100% de atividade= 240,49 U/mL medido na ausência de Mg²⁺ em 30 minutos). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

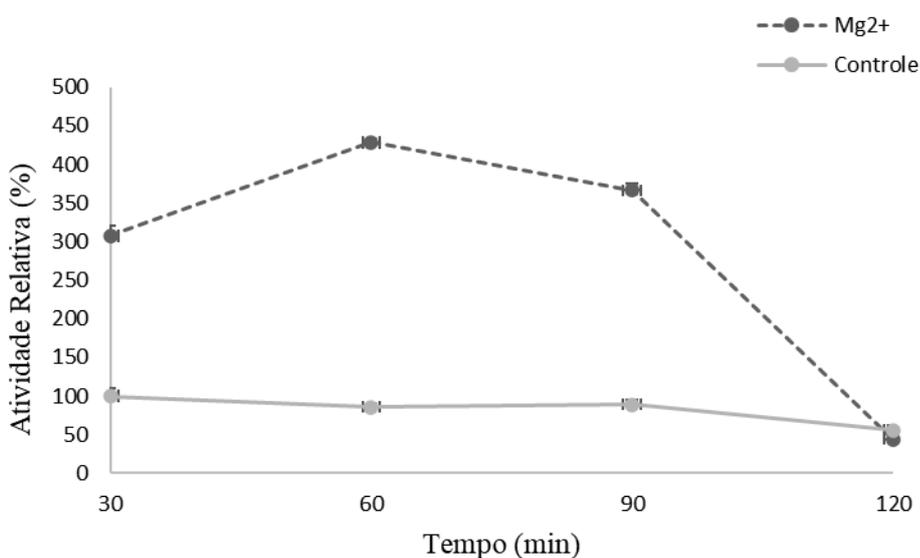


Figura 7. Estabilidade da protease secretada pelo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 70 °C (100% de atividade= 380,66 U/mL medido na ausência de Mg²⁺ em 30 minutos). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

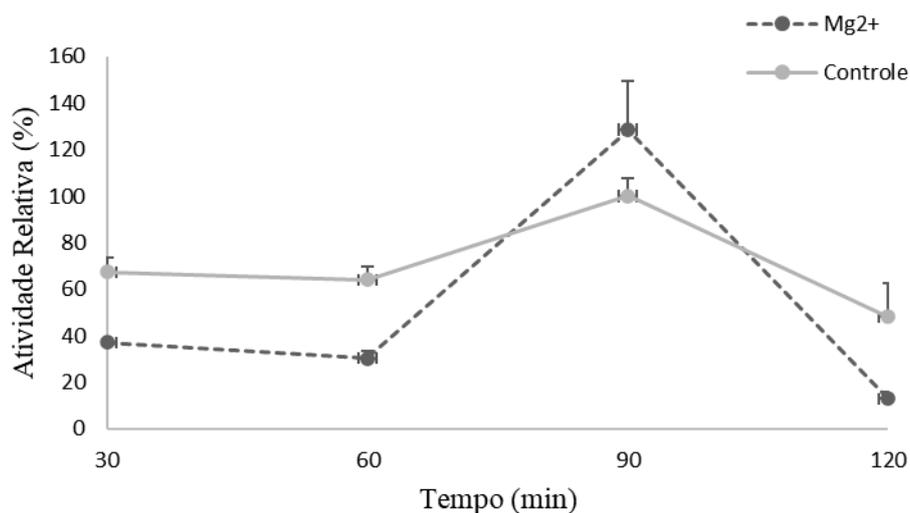


Figura 8. Estabilidade da protease secretada pelo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na presença de Mg²⁺ a 90 °C (100% de atividade = 308,66 U/mL medido na ausência de Mg²⁺ em 90 minutos). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

4. Conclusão

O presente trabalho demonstrou que *Bacillus licheniformis* 1674, isolado durante a secagem natural de frutos de café Conilon, do sul do Estado do Espírito Santo, foi capaz de produzir protease em fermentação submersa a partir de resíduos do beneficiamento de pescados. Uma alternativa favorável a produção dessa enzima que além de reduzir o impacto ambiental pode ainda reduzir o custo dos meios de cultivo.

A protease produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 exibiu atividade máxima quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo farinha de resíduo de pescado (0,5%) por 72 horas de fermentação. O pH ótimo encontrado foi 8,5 e a temperatura ótima da protease foi de 70 °C com atividade enzimática máxima de 1110,74 U/mL. A enzima obteve aumento de 122,71% na atividade na presença do íon Mg²⁺, e por outro lado, foi completamente inibida por Fe²⁺, EDTA e 1-10 fenantrolina.

Como perspectivas para novos trabalhos, sugere-se estudos para otimização do meio de cultivo para produção da protease, além de estudos da aplicação da enzima.

Declaração de Conflito de interesse

A autora declara não ter conflito de interesse na publicação deste artigo.

Agradecimentos

Este estudo teve apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES). E contribuição da Professora DSc Raquel Vieira de Carvalho

Referências

Abimorad, E. G., & Carneiro, D. J. (2004). Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(5), 1101–1109. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982004000500001>

Abreu, L. F.; Ribeiro, S. C.; DE Araújo, E. A. F. Processo agroindustrial: elaboração de farinha de resíduos de tabaqui (*Colossoma macropomum*) para uso como ingrediente de rações de pescado. Embrapa Amazônia Oriental-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2012.

Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2020). Statistical modelling and optimization of protease production by an autochthonous *Bacillus aryabhattai* Ab15-ES: A response surface methodology approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24(101528), 101528. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101528>.

Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(1), 332. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>.

Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioprocess Processing*, 92(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.009>.

Barbosa, B. J. Utilização da farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) para produção de enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2. (2015) 96 f.:il.- Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

B.B. Salgaonkar, J.M. Braganca, Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3, *Int. J. Biol. Macromol.* 78 (2015) 339–346.

Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 33, 119–143. B.

Ben Elhoul, M., Zarái Jaouadi, N., Rekik, H., Bejar, W., Boulkour Touiou, S., Hmidi, M., Badis, A., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2015). A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International journal of biological macromolecules*, 79, 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.006>

Bhange, K., Chaturvedi, V., & Bhatt, R. (2016). Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 10, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>.

Boscolo, W. R., Hayashi, C., Feiden, A., Meurer, F., & Signor, A. A. (2008). Composição química e digestibilidade aparente da energia e nutrientes da farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápias, para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciencia rural*, 38(9), 2579–2586. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000900027>.

Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., & Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101(18), 7111–7117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.130>

Emran, M. A., Ismail, S. A., & Hashem, A. M. (2020). Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26(101631), 101631. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101631>

FAO. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - Contribución a la Seguridad Alimentar y la Nutrición para todos. Roma. 2018

Fernandes, N.R. - Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

Ghaly, A. E.; Ramakrishnan, V. V.; Brook, M. S.; Budge, S. M.; Dave, D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, aminoacids and oils: a critical review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 5(4), 107-129, 2013.

Gonçalves, G. S.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M. Rocha, D. F.; Kleeman, G. K.; Santa Rosa, M. J. Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do Nilo. *Boletim Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 35, n. 2, p. 201-213, 2009.

Hadj-Ali, N. E., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., & Nasri, M. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.007>

Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., & Jaouadi, B. (2018). Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167>

Hepziba Suganthi, S., & Ramani, K. (2016). Microbial assisted industrially important multiple enzymes from fish processing waste: purification, characterization and application for the simultaneous hydrolysis of lipid and protein molecules. *RSC Advances*, 6(96), 93602–93620. <https://doi.org/10.1039/c6ra11867d>.

Higuchi, L.H. Produção, caracterização nutricional e utilização de farinhas e óleos de resíduos de peixe neotropicais em dietas para Tilápia do Nilo– Jaboticabal, 2015 xvii, 86 p. ;

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008

Jain, D., Pancha, I., Mishra, S. K., Shrivastav, A., & Mishra, S. (2012). Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. *Bioresource Technology*, 115, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.081>

Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H. B., Manni, L., Agrebi, R., & Nasri, M. (2011). Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 46(6), 1248–1256. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.012>

Kiranmayee, R., & M, L. N. (2007). Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African journal of biotechnology*, 6(21), 2493–2496. <https://doi.org/10.5897/ajb2007.000-2395>

Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Durães Sette, L., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., & Pessoa, A. (2020). Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports* (Amsterdam, Netherlands), 28(e00546), e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>

Maghsoodi, V., Kazemi, A., Nahid, P., Yaghmaei, S., & Sabzevari, M. A. (2013). Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. *Sharif University of Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scient.2013.01.007>

Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 73, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>.

Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., & Nair, S. S. (2018). Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 16(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.001>.

Ming Chu, I., Less, C., Li, T.S. (1992). Some Observations on Protease Production in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v.14, n.4, p. 755-761.

Musa, H., Kasim, F. H., Gunny, A. A. N., Gopinath, S. C. B., & Ahmad, M. A. (2018). Biosecretion of higher halophilic lipase by a novel *Bacillus amyloliquefaciens* AIKK2 using agro-waste as supporting substrate. *Process biochemistry* (Barking, London, England). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.022>

M.T.T do Couto, A.V. da Silva, R. V. Da Silva Sobral, C.H. Rodrigues, M. N. C. Cunha, A.C. L. Leite, M.V. B. Figueiredo, J. de P. Oliveira, R. M. P. B. Costa, A. E. S. Conniff, A. L. F. Porto, T. P. Nascimento. *Process Biochemistry* 118 (2022) 335–345.

Oliveira Filho, P. R. C.; Fracalossi, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1581-1587, 2006. Suplemento.

P.S. Panesar, R. Kaur, G. Singla, R.S. Sangwan, Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes : Progress and Prospects, 3 (2016) 208–227.

Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 19–61. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44004-2)

Ravindran, R.; Jaiswal, A. K. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, Dublin, v. 34, n. 1, p. 58-69, 2016.

Rocha, J. B. S.; Silveira, C. S.; Ledo, C. A. S.; Barreto, E. N. S. Composição e estabilidade de farinha de tilápia (*Oreochromis niloticus*) produzida artesanalmente para o consumo humano. *Magista, Cruz das Almas*, v. 23, n. 4, p. 215-22, 2011.

Vijayaraghavan, P., & Vincent, S. G. P. (2012). Cow dung as a novel, inexpensive substrate for the production of a halo-tolerant alkaline protease by *Halomonas* sp. PV1 for eco-friendly applications. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.014>

S. Singha, B.K. Bajaj, *Chem.* (2015). Medium Optimization for Enhanced Production of Protease with Industrially Desirable Attributes from *Bacillus subtilis* K-1. *Eng. comm.* 202 1051– 1060. <https://doi.org/10.1080/00986445.2014.900052>

Sundararajan, S., Kannan, C. N., & Chittibabu, S. (2011). Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(2), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.09.009>.

Saggu, S. K., & Mishra, P. C. (2017). Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PloS One*, 12(11), e0188724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188724>

Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1).

SANTOS, P. H. G. Avaliação de subprodutos do abate de animais terrestres e de resíduos do processamento de peixes como fonte de proteína em rações para o camarão branco do pacífico,

Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931). 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013

Stevanato, F. B., Petenucci, M. E., Matsushita, M., Mesomo, M. C., Souza, N. E. de, Visentainer, J. E. L., Almeida, V. V. de, & Visentainer, J. V. (2007). Avaliação química e sensorial da farinha de resíduo de tilápias na forma de sopa. *Food Science and Technology*, 27(3), 567–571. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612007000300022>

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. (2023). Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its Applications. *Journal of King Saud University. Science*, 35(1), 102429. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>

Shajahan, S., Moorthy, I. G., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University. Science*, 29(3), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.001>

Wang, Q., Fan, X.-R., Hua, Z.-Z., & Chen, J. (2007). Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.004>

Z. Limam, S. Selmi, S. Sadok, A. El Abed, Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties *African J. Biotechnol.* 10 (2011) 640– 647.

Estudo da otimização de condições de cultivo de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 na produção de proteases e aplicação na hidrólise de algumas fontes

ARTIGO ORIGINAL ²

Resumo

Bacillus licheniformis CCMA 1674 foi capaz de crescer e secretar proteases quando cultivado em culturas líquidas contendo farinha de resíduo do processamento de pescado. Neste estudo, a otimização de condições do meio de cultivo foi realizada seguindo a técnica de delineamento composto central rotacional (DCCR), em relação às variáveis independentes: pH inicial do meio de cultura e concentração de farinha de resíduo de pescado, com três repetições do ponto central, durante 96 horas de fermentação à temperatura de 37 °C e 150 rpm. Dentre as variáveis independentes estudadas, a concentração de farinha de resíduo de pescado foi a que exerceu efeito significativo nas variáveis respostas observadas, enquanto o pH inicial não apresentou efeito significativo, com limite de confiabilidade de 95%. O ensaio que obteve melhor produção de protease foi o ensaio 11 onde havia a concentração de 1,05% de farinha de resíduo de pescado e pH inicial de 7,5 (atividade de 428,025 U/mL). O estudo sobre a aplicação da enzima na hidrólise das fontes, caseína e farinha de resíduo de pescado, demonstrou que a atividade de protease foi de 821,01U /mL e 458,22 /mL , nas concentrações de resíduo a 1% e 0,1% de caseína, respectivamente, em temperatura ambiente e diminuiu para 0 e 363,27 U/mL para as mesmas fontes quando incubadas a 70°C.

Palavras chave: DCCR, Farinha do resíduo do processamento de pescado, hidrólise, enzimas hidrolíticas, enzimas proteolíticas

1. Introdução

As proteases são consideradas enzimas capazes da clivagem da ligação peptídica nas grandes moléculas de proteína, convertendo-as em aminoácidos e peptídeos. Essas enzimas são onipresentes na natureza, encontradas em plantas, animais e microrganismos (Barrett e McDonald, 1986).

² Artigo formatado conforme normas da revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*

São de natureza hidrolítica e têm um potencial significativo para aplicações industriais que requerem hidrólise de proteínas (Yadav et al., 2019), destacando-se por serem extensivamente usadas para várias aplicações, incluindo na indústria de alimentos, têxteis, de produtos farmacêuticos e processamento de couro (Reddy et al., 2022).

As enzimas de origem microbiana atendem às demandas industriais e oferecem vantagens sobre os catalisadores inorgânicos, incluindo sua produção econômica, manuseio conveniente, fácil recuperação do meio de reação e reutilização em processos industriais (Berini et al., 2017).

Recentemente, a aplicação de tecnologias mais econômicas em níveis industriais, apontam para a utilização de resíduos agroindustriais, por facilitarem o crescimento de microrganismos, contribuindo para o desenvolvimento de produtos de valor agregado, como a produção de enzimas (Sadh et al., 2018). Esses resíduos agroindustriais estão disponíveis em grandes quantidades, tanto em nível local quanto global, atingindo centenas de milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019).

A indústria de pescados apresenta-se em crescimento, com mais de 196 milhões de toneladas de pescado previstas para serem processadas até 2025 (Pedro e Nunes, 2019). Essa indústria gera grandes quantidades de subprodutos, como cabeças, pele, barbatanas, vísceras, armações e às vezes músculos, que são atualmente desperdiçados, subutilizados ou usados para produzir produtos de valor agregado, como farinha de peixe e silagem de peixe. Esses subprodutos podem chegar a 50% do peixe inteiro, mas podem variar de 10 a 90%, dependendo da espécie de peixe e do uso pretendido (Gao et al., 2020).

Os processos fermentativos utilizados para a produção de enzimas microbianas, como as proteases, podem ser afetados por fatores intrínsecos e extrínsecos ao microrganismo utilizado. Variações na composição dos meios de cultivo, tipos e concentrações de substratos, assim como temperatura de incubação, pH inicial, agitação, aeração, entre outros podem afetar de forma positiva ou não (ação inibitória) a produção de enzimas de interesse industrial (Shaikh et al., 2023; Cahyaningtyas et al., 2021; Lario et al., 2020). Além disso, o alto custo de sua produção, tem levado a pesquisas visando melhorar as condições de cultivo e maximizando a síntese enzimática (Delatorre, 2008; Reddy et al., 2022; Mazhar et al., 2023). Assim, uma estratégia que vem se destacando no campo da produção enzimática são os estudos de otimização, que permitem um delineamento das condições de cultivo com uma combinação ótima de fatores como os já citados, e o efeito de suas interações, promovendo a produção máxima de atividade enzimática e minimizando o custo de sua produção (Bashir et al., 2018; Prajapati et al., 2021). Devido a essas demandas, desenhos experimentais estatísticos têm sido

reconhecidos como formas ideais para estudos de otimização em bioprocessos (Eswari et al., 2016).

Diante do exposto, o presente estudo, propôs um estudo de otimização dos parâmetros, concentração de farinha do resíduo de processamento de pescado e pH inicial dos meios de cultivo, para a aumentar a produção de protease, por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674. Além disso, a enzima produzida foi aplicada em caseína e farinha de resíduo de pescado.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismo

A cultura bacteriana de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, utilizada no presente estudo foi isolada por Pereira (2018) durante a secagem natural de frutos de café Conilon do sul do Estado do Espírito Santo e foi identificada pelo Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Esta cepa de estudo, identificada inicialmente como *Bacillus licheniformis* S3BT55, onde o termo S indica “Face Soalheira”, refere-se a cepas isoladas em locais de plantio de café que receberam maior influência de radiação solar direta ao longo do ano (Sediyama et al., 2001). Apresentou semelhança desta estirpe bacteriana com outras espécies proteolíticas de *Bacillus*, conforme apresentada na árvore filogenética estabelecida (Fig. 1).

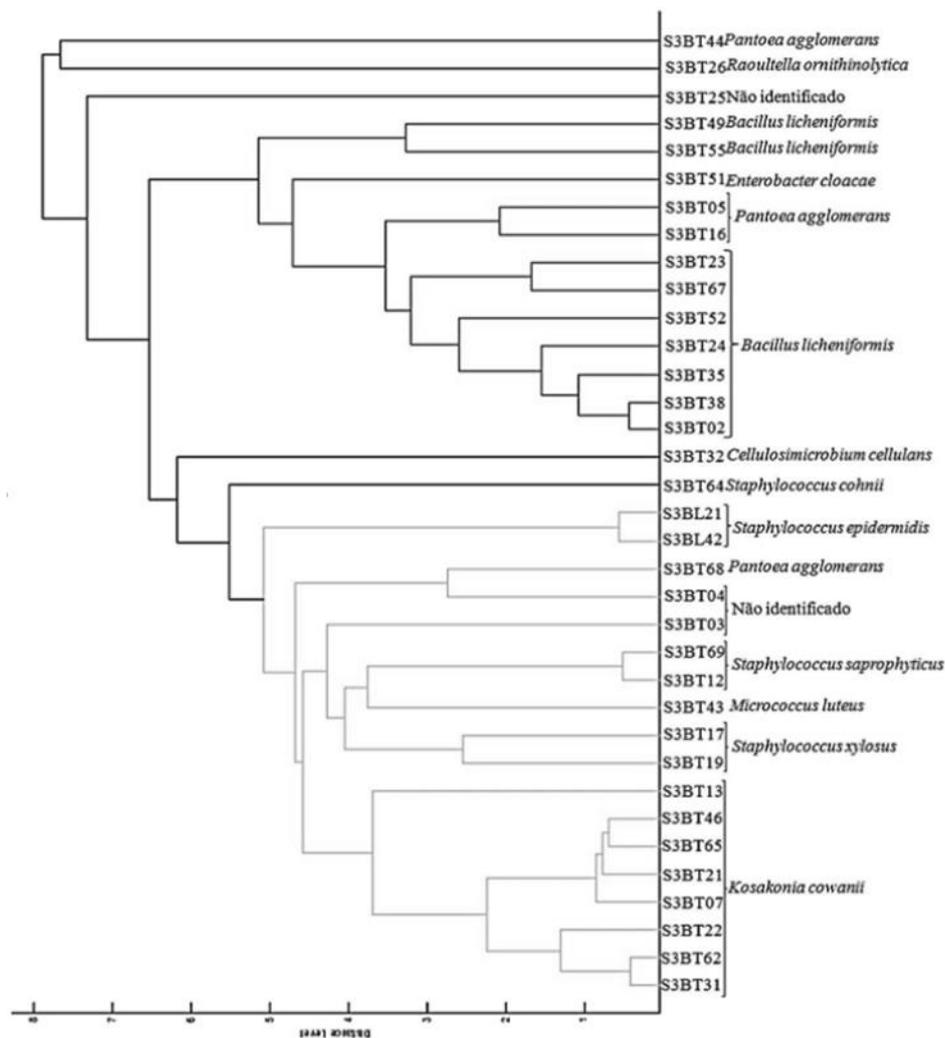


Figura 1: Dendrograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado. Fonte: Pereira, 2018.

2.2. Microrganismo e as condições de manutenção

A cultura utilizada no presente estudo encontra-se armazenada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, Alegre, ES. Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, Alegre, ES.

Bacillus licheniformis CCMA 1674 foi semeado em placas de Petri contendo meio TSY, composto por (g.L⁻¹ de água destilada): triptona – 20; NaCl – 10; extrato de levedura – 10; ágar – 20, incubado a 37 °C por 24 horas e depois mantido sob refrigeração de 4 °C, até sua utilização e ativação.

2.3. Meios de cultivo

Com base em testes preliminares, o seguinte meio de cultura foi preparado:

Tabela 1

Composição do meio cultivo

Composição (g.L ⁻¹)	Meio
KCl	0,30
K ₂ HPO ₄	0,87
CaCl ₂	0,29
MgSO ₄ ,	0,50
Peptona	0,10
Soluções traços de metais (mL)	1,00
Farinha de resíduo de pescado	5,00

*Solução de traços de metais (g.L⁻¹): CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴; H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³.

2.4. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado semeando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período, 10 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células, que foram posteriormente sugadas com auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento e incubadas por mais 24 horas em *shaker* rotatório marca CIENLAB (modelo CE – 720) a 37 °C sob agitação de 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular os meios de cultivo.

2.5. Medidas do crescimento do microrganismo e atividade da protease

O meio de cultivo foi inoculado com 10 % (v/v) do pré-inóculo preparado e incubado a 37 °C em *shaker* rotatório operando a 150 rpm. Foram retiradas amostras para determinação do crescimento microbiano, baseada na metodologia descrita Janssen et al., 1994.

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica a 600 nm com utilização de um espectrofotômetro (THERMO FISHER SCIENTIFIC, modelo: EVO300 PC, Estados Unidos). A retirada das amostras foi realizada nos meios de cultivo de 2 frascos, e seguida da medida da leitura da absorvância, em triplicata de cada frasco.

Foi utilizada a medida do pH do meio (pHmetro digital, TEKNA, modelo: T-1000), de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, para acompanhar o crescimento celular (IAL, 2008), de 2 frascos, em triplicata de cada e realizado a medida.

O extrato bruto enzimático ou o sobrenadante, livre de células, foi obtido durante 120 h de fermentação, por centrifugação do caldo fermentado em centrífuga refrigerada (HERMLE, modelo: Z326K) a 1020 g durante 15 minutos a 4 °C, baseado nos trabalhos de Janssen et al., (1994).

A atividade proteolítica do extrato bruto enzimático foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (m/v) preparada em tampão Tris-HCL 100 mM (pH 8,5). Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada à 1 mL do substrato e, após a incubação em banho-maria a 70 °C por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA. A amostra foi centrifugada a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH (1 M). Uma amostra controle foi preparada em um tubo de ensaio contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o TCA, que foi adicionado antes do extrato enzimático. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen et al., 1994).

Uma curva de calibração foi construída usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão de acordo com o método de Lowry modificado por Peterson (1977).

2.6. Otimização das condições da fermentação para a produção da protease

A otimização das condições do meio de cultivo foi elaborada seguindo a técnica de planejamento fatorial em dois níveis (2²), em relação às variáveis independentes, ao pH inicial do meio de cultura e à concentração de farinha de resíduo de pescado, com três repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos (Neto et al., 2001), durante 96 horas de fermentação à temperatura de 37 °C e 150 rpm.

Os níveis das variáveis independentes em estudo foram definidos em testes preliminares e seguem na Tabela 2, juntamente com as condições experimentais. A análise estatística dos dados obtidos das condições do meio de cultivo seguiu a metodologia de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 10. As respostas avaliadas de foram crescimento celular (DO 600 nm), pH final e na produção da protease (U/mL).

Tabela 2

Representação do planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: pH inicial do meio de cultura e concentração da farinha de resíduo de pescado.

Ensaio	Variáveis independentes			
	Valores codificados		Valores reais	
	Concentração de farinha de resíduo de pescado	pH inicial do meio de Cultivo	Concentração de farinha de resíduo de pescado (%)	pH inicial do meio de Cultivo
1	-1	-1	0,37	6,79
2	-1	1	0,37	8,21
3	1	-1	1,72	6,79
4	1	1	1,72	8,21
5	-1,41	0	0,10	7,50
6	1,41	0	2,00	7,50
7	0	-1,41	1,05	6,50
8	0	1,41	1,05	8,50
9	0	0	1,05	7,50
10	0	0	1,05	7,50
11	0	0	1,05	7,50

2.7 Estudo da hidrólise da protease em fontes proteicas

Para avaliar o efeito da hidrólise enzimática em fontes proteicas, foi preparado um meio de cultivo contendo 0,5% da farinha do resíduo do processamento de pescado, inoculado com *Bacillus licheniformis* CCMA-1674 e incubado em *shaker* a 37 °C e 150 rpm de agitação durante 72 horas de cultivo. Após este tempo, o meio foi centrifugado, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a aplicação nos substratos em estudo: caseína e farinha do resíduo do processamento de pescado, variando nas concentrações em 0,1%, 0,5%, 1%, 5% e 10%.

A atividade da enzima foi medida pela pré-incubação de 15 mL do sobrenadante (extrato bruto enzimático) em cada concentração de substrato, conforme descrito anteriormente, durante 10 minutos em temperatura ambiente e a 70 °C. Após este tempo, a

atividade enzimática foi medida como descrito no item 2.5.

3. Resultados e discussão

3.1. Meio de cultivo contendo resíduo

O potencial de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 para produzir protease em meio contendo resíduos de pescado, um subproduto da indústria de processamento de pescado, foi avaliado cultivando a bactéria em culturas líquidas contendo 0,5% (m/v) deste substrato.

O crescimento de *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 iniciou de imediato após a incubação do microrganismo no meio de cultivo (Figura 2). Durante as primeiras 24 horas de incubação, foi observada uma fase exponencial, e após este tempo, foi observado que a velocidade de crescimento alcançou fase estacionária até 120 horas. No perfil de pH (Figura 1), observa-se que o meio apresentou aumento no valor de pH de 7,0 a 7,8 nas primeiras 72 horas e queda para 7,4 nos tempos 96 e 120 horas de incubação.

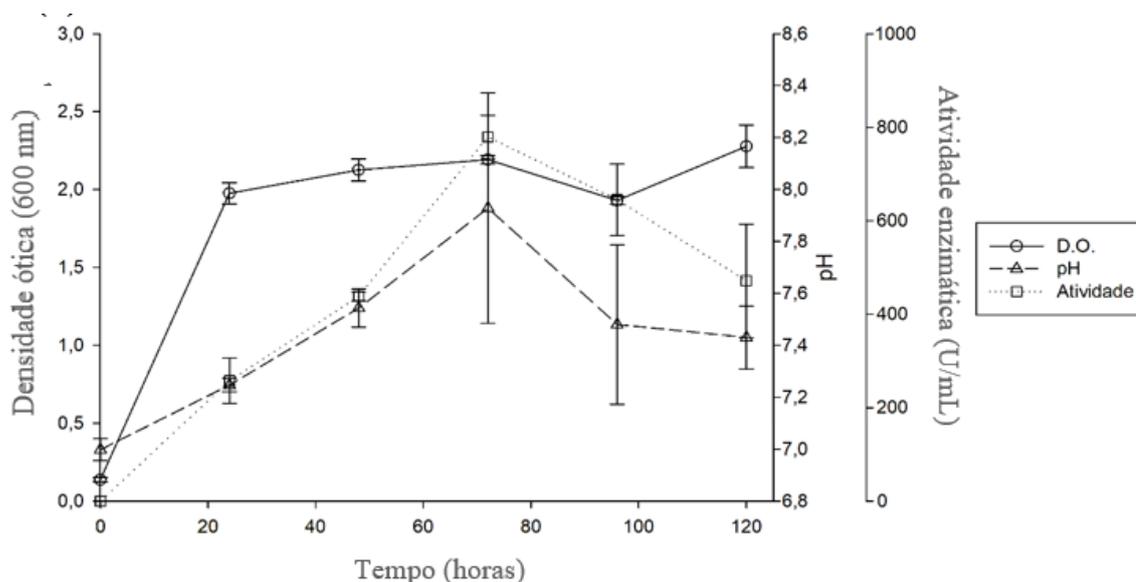


Figura 2. Curva de crescimento, pH e atividade de protease de *Bacillus licheniformis* CCMA1674, em função do tempo de fermentação em meio contendo 0,5% da farinha do resíduo de pescado, incubado a 37 °C e 150 rpm.

Verificou-se que *B. licheniformis* CCMA 1674 obteve resultado satisfatório na produção de protease no meio utilizado, contendo 0,5% da farinha do resíduo do processamento de pescado em 72 h de fermentação, apresentando atividade proteásica de 779,27 U/mL,

conforme mostrado na Fig.2. Rathod e Pathak (2014) utilizando *Bacillus alcalophilus* LW8 mostraram que o crescimento máximo e produção de protease alcalina (510 U/mL) foi em pH 10 a 30 °C após 48 h de incubação com agitação a 100 rpm utilizando melão de cana de açúcar.

Shaikh et al., (2023) apresentaram em seus trabalhos a variação no crescimento de *Bacillus nakamurai* PLA e produção de protease. Em 72 horas de incubação, observaram que o crescimento celular foi alto (densidade ótica de 0,7612) e houve uma alta atividade de protease (0,92 U/mL). Esses resultados mostraram uma relação direta entre crescimento celular e síntese de protease, a razão pode ser que à medida que há o consumo de fontes de carbono, os microrganismos podem produzir protease em grande quantidade, indicando que o substrato é um indutor na síntese de protease.

3.2. Otimização das condições da fermentação para a produção de protease

Bacillus licheniformis CCMA 1674 foi cultivado em meio submerso contendo farinha de resíduo de pescado, em concentrações que variaram de 0,3 a 2% e pH variando de 6,5 a 8,2, para produção de protease extracelular (Tabela 2). Os maiores valores encontrados para a atividade de protease ocorreram nos ensaios 9 (420,313 U/mL), 10 (416,218 U/mL) e 11 (428,025 U/mL), durante 96 horas de cultivo conforme apresentados na Tabela 3. Verifica-se que nesses ensaios os meios continham concentração de 1,05% de farinha de resíduo do processamento de pescado e pH inicial de 7,5.

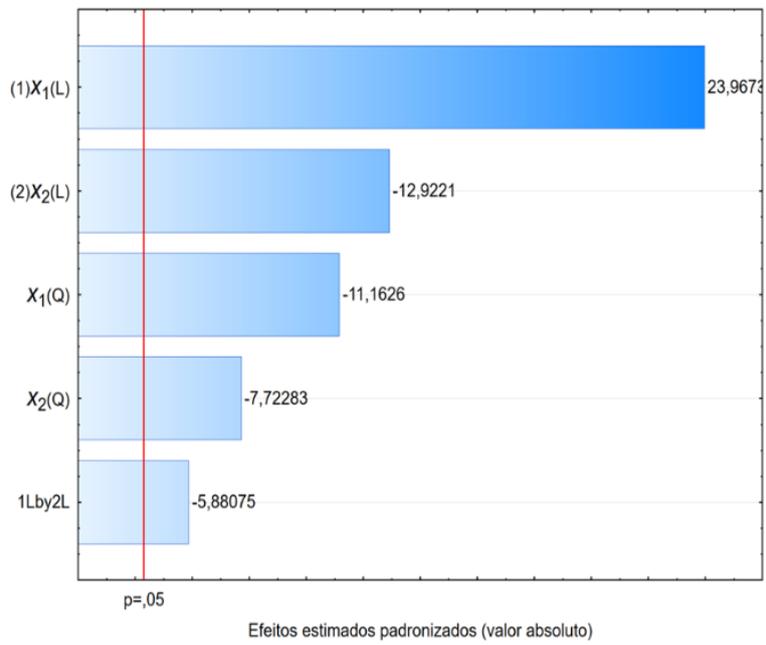
Tabela 3

Crescimento microbiano, pH final e atividade de protease nas condições de fermentação após 96 horas a 37 °C e 150 rpm.

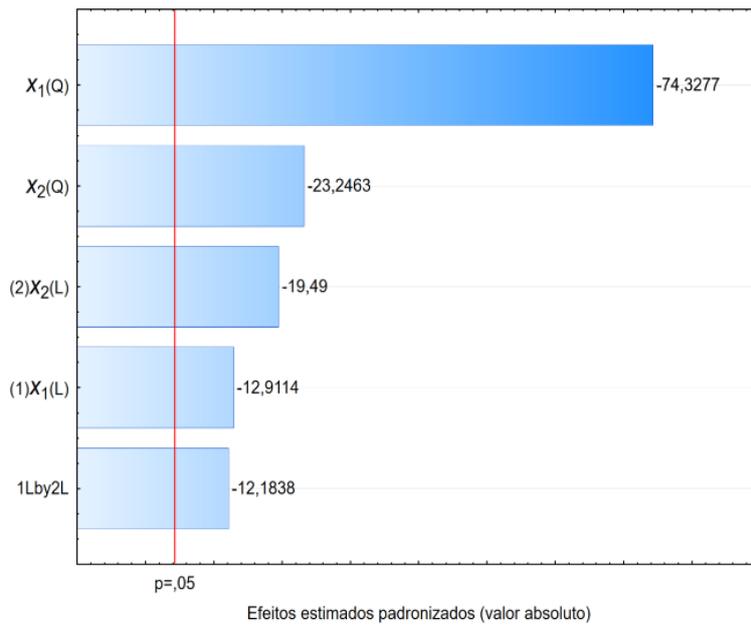
Ensaio	Condições de fermentação		DO (600 nm)	pH final	Atividade (U/mL)
	Concentração	pH inicial			
1	-1	-1	1,08	7,19	224,14
2	-1	1	0,59	8,11	241,88
3	1	-1	2,36	7,52	167,79
4	1	1	1,23	7,60	39,44
5	-1,41	0	1,06	7,97	39,44
6	1,41	0	2,28	7,68	67,62
7	0	-1,41	1,95	8,09	389,00
8	0	1,41	1,70	7,73	233,53
9	0	0	1,99	7,99	420,31
10	0	0	1,99	7,89	416,22
11	0	0	1,89	7,91	428,02

Para identificar a melhor condição para produção de protease, todos os resultados obtidos foram submetidos a uma análise estatística usando gráfico de Pareto (Figura 3). Neste gráfico, o comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável ou interação relacionada, e as barras que se estendem além da linha vertical correspondem aos efeitos estatisticamente significativos em um nível de confiança de 95%. O gráfico de Pareto revelou um efeito de primeira ordem (concentração de resíduo) afetando positivamente a atividade enzimática. Os resultados do estudo indicaram que houve interação entre a concentração de resíduo de pescado e a produção de protease, porém em relação ao pH inicial (efeito de 2ª ordem) verificou-se efeito negativo para produção da enzima.

(A)



(B)



(C)

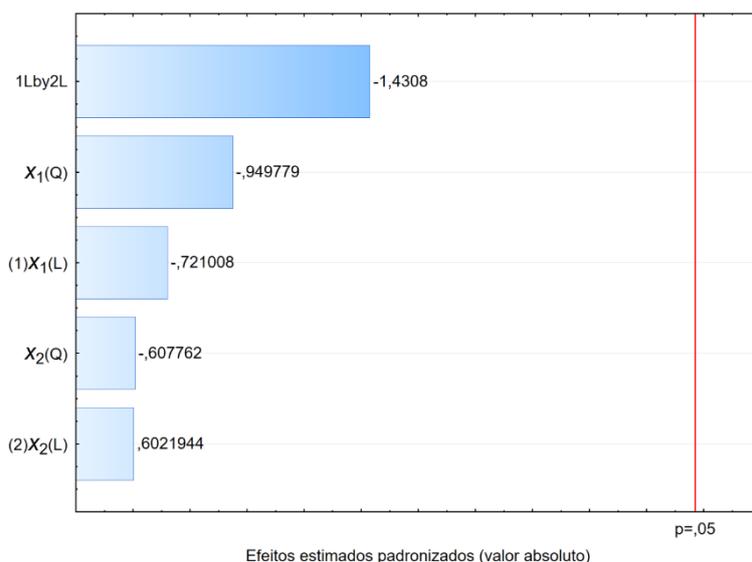


Figura 3: Diagrama de Pareto para a atividade enzimática da protease (a), crescimento celular (b) e pH final (c) em função da concentração da farinha do resíduo do processamento de pescado e pH inicial dos meios após 96 h de cultivo de *B. licheniformis* CCMA-1674. Termo linear (L) e termo quadrático (Q) das variáveis independentes (concentração e pH).

Uma equação para a resposta do crescimento celular (DO) (1) e atividade de protease (2) no tempo de 96 horas de fermentação foi desenvolvida baseada na análise dos coeficientes de regressão dos dados experimentais. Onde x_1 é a concentração de resíduo de pescado e x_2 representa o pH inicial dos meios de cultivo.

$$\hat{y} = -19,0051 + 4,3128 x_1 + 5,2417 x_2 - 0,5609 x_1^2 - 0,3497 x_2^2 - 0,3279 x_1 x_2$$
$$r^2 = 0,8210$$

(1)

$$\hat{y} = 6684,22 + 1398,87 x_1 + 1763,39 x_2 - 413,61 x_1^2 - 116,11 x_2^2 - 76,42 x_1 x_2$$
$$r^2 = 0,9446$$

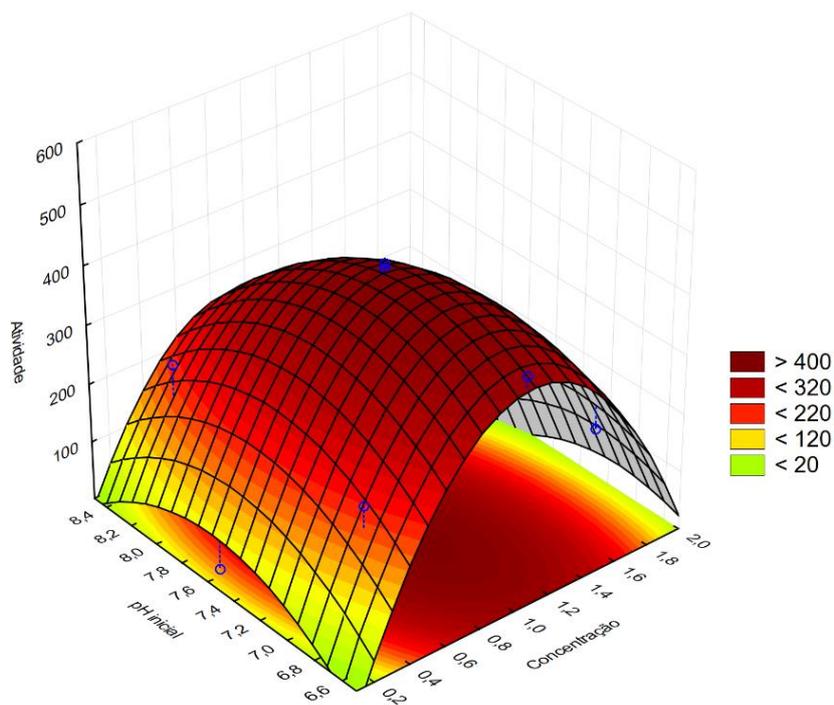
(2)

O coeficiente de determinação, R^2 , é utilizado para a avaliação do grau de variação nos valores de resposta observados que podem ser explicados pelos parâmetros experimentais e suas interações (Xiao et al., 2015). Um valor de R^2 próximo de 1 implica uma forte correlação entre os valores observados e previstos e uma melhor confiabilidade do modelo (Kandasamy

et al., 2016). O valor de R-quadrado (0,9446) da equação polinomial sugere que o modelo pode explicar 94,46% da produção de protease.

Os efeitos de interação e os valores ótimos de uma combinação dos dois parâmetros independentes para a produção máxima de protease, por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, são representados pelo gráfico de superfície de resposta em 3D (Figura 4). Uma superfície de resposta tridimensional foi plotada usando o modelo para estudar a interação entre variáveis e determinar a concentração ótima para cada fator no meio para máxima produção de protease.

(A)



(B)

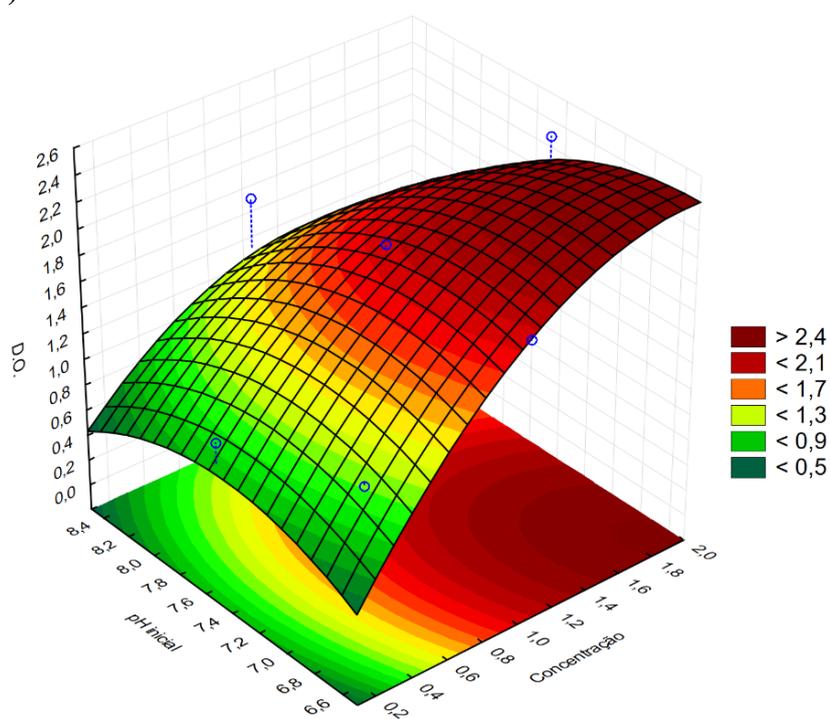


Figura 4. Gráficos de superfície de resposta para a atividade da protease (A) e para o crescimento celular (densidade ótica) (B) por *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, em função da concentração da farinha de resíduo de peixe e o pH inicial do meio de cultivo.

A maior produção de proteases (428,025 U/mL) foi obtida quando se utilizou a concentração de 1,05% da farinha do resíduo do peixe no meio de cultivo, apresentando crescimento celular (DO) em 1,89 e pH final 7,9. Apesar de não ser o maior registro de crescimento celular, em todo o experimento, verificou-se maior atividade enzimática.

Barbosa (2015) utilizando *Bacillus sp.* SMIA-2, afirmou com 95% de confiança que quanto maior a concentração de farinha de maracujá (0,5%) no meio de cultura, menor foi a produção de protease. Asitok et al., (2022), variando fontes de carbono, apresentaram maior atividade de protease (447,379 U/mL) no experimento com 49,3% do resíduo do processamento da mandioca. Lario et al., (2020) estudaram o efeito de vários substratos de resíduos na produção de protease por *Bacillus halodurans*. Dentre os substratos utilizados, a

quantidade máxima de rendimento enzimático (397,09 U/mL) foi registrado em meio suplementado com farelo de trigo e pó de serra em 48 h de incubação. Assim, a concentração ideal de resíduo, pode variar em função do microrganismo estudado, das características do meio de cultivo, como sua composição, tipo, origem e fonte do resíduo, da enzima a ser produzida, entre outros.

Shaikh et al., (2023) em seus estudos, testaram diferentes valores de pH que mostraram um efeito diferente no rendimento da protease e crescimento da linhagem PL4 de *B. nakamurai*, onde o isolado obteve alto rendimento de protease (0,8105 U/mL) em pH 8. Suberu et al., (2019) observaram que houve um aumento na produção de protease alcalina de *Bacillus subtilis* RD7 com o aumento dos valores de pH até pH 8,5. E este estudo, descreveu como melhor resultado obtido produção de protease, usando um delineamento experimental, foi maltose (concentração 1,5%), extrato bovino em pó (concentração 1,25%) e pH 8,5 (141,28 U/mL).

O pH do meio é um parâmetro importante, considerado em qualquer processo de otimização de produção, pois qualquer enzima produzida por microrganismos pode ser estável em uma faixa de valores de pH ótimos. As enzimas são sensíveis à concentração de H⁺ do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre, pois, as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula, de forma que as alternâncias de pH podem mudar a conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. (Sandhya et al., 2005). As proteases alcalinas bacterianas são caracterizadas pela sua alta atividade em pH alcalino. O presente estudo mostrou que a maior atividade enzimática foi em pH 8,5, confirmando a alcalinidade da protease.

3.3 Aplicação da protease em fontes complexas de proteínas

Testes foram realizados para avaliar o efeito da enzima quando aplicada nas fontes, caseína e farinha do resíduo do processamento de pescado.

De acordo com os resultados encontrados, quando utilizado a caseína em temperatura ambiente, pode-se observar que a atividade de protease diminui conforme aumentava-se a concentração de caseína (Figura 5), com atividade máxima na concentração de 0,1% (458,23 U/mL). Analisando o perfil de atividade de protease na mesma fonte, porém em temperatura à 70 °C (Figura 5), observa-se que houve aumento da atividade de protease até a concentração 0,5%, onde foi registrado atividade máxima (431,44 U/mL), e declínio de acordo com o aumento da concentração da caseína. Comparando as duas temperaturas avaliadas, pode-se

encontrar perfil semelhante, onde quanto maior foi a concentração da fonte, ou seja, o substrato, menor a atividade de protease. A enzima mostrou maior eficiência quando utilizada na temperatura ambiente em 0,1% de caseína

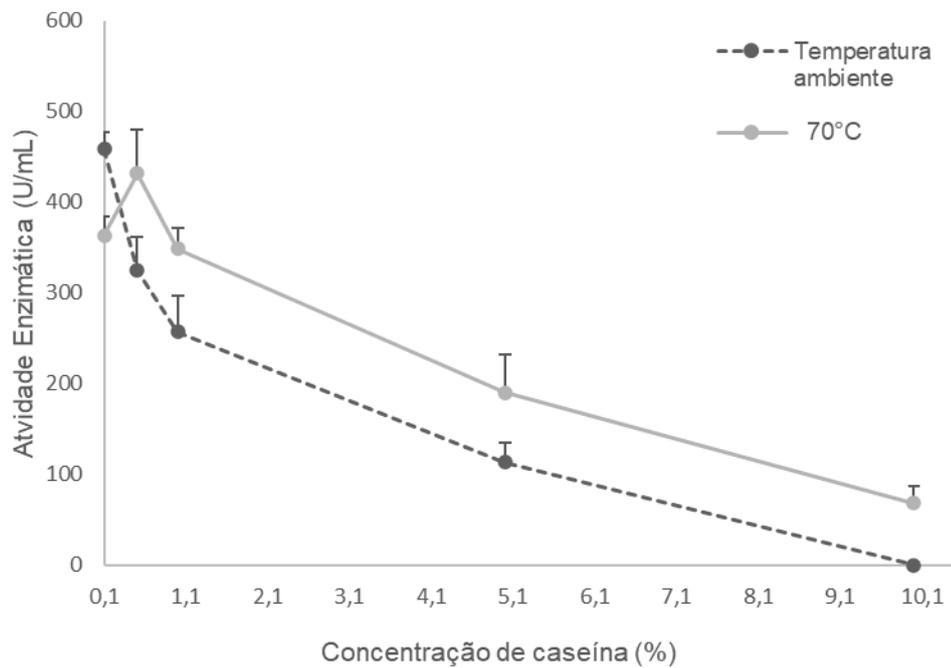


Figura 5. Aplicação da protease em caseína como fonte de substrato em temperatura ambiente e à 70 °C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

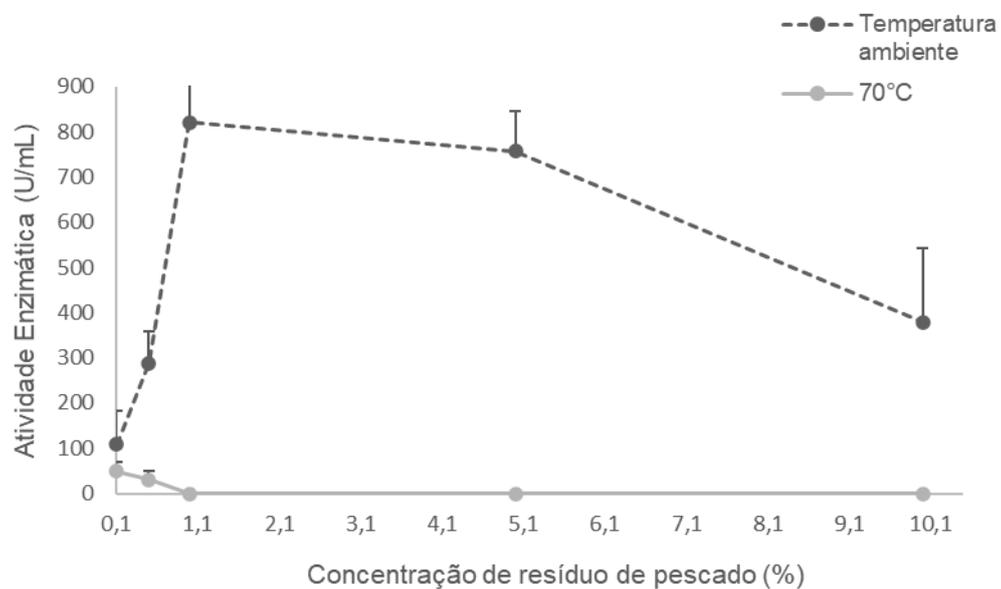


Figura 6. Aplicação da protease em farinha de resíduo de pescado como fonte de substrato em temperatura ambiente e à 70 °C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Quando o extrato bruto enzimático foi utilizado nas diferentes concentrações de farinha do resíduo de pescado em temperatura ambiente, pode-se observar que a atividade de protease aumentou até a concentração de 1%, onde foi registrado atividade máxima de 821,01 U/mL, mantendo-se estável até a concentração 5% e queda na concentração 10%. Nota-se que, conforme aumentava a concentração do resíduo de pescado (Figura 6), a atividade de protease manteve resultado satisfatório.

Analisando o perfil de atividade de protease na hidrólise do resíduo de pescado em temperatura à 70 °C (Figura 6), observa-se que houve aumento da atividade de protease na concentração 0,1%, onde foi registrado atividade máxima (49,53 U/mL). A partir da concentração 1% não houve mais atividade da enzima. Comparando as duas temperaturas avaliadas, pode-se verificar um perfil distinto entre as fontes testadas. O efeito da enzima aplicada na farinha do resíduo de pescado mostrou maior eficiência quando utilizada em temperatura ambiente, apresentando valores superiores aos encontrados para a caseína.

4. Conclusão

O microrganismo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 isolado durante a fermentação natural de café Conilon, foi capaz de crescer e sintetizar proteases em um meio contendo uma farinha do resíduo do processamento de pescado, um resíduo agroindustrial. O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² foi usado para otimizar as condições para a produção de protease, e os resultados demonstraram que a maior produção da enzima foi observada usando 1,05% de farinha do resíduo de pescado e pH inicial do meio de cultivo de 7,5 durante 96 h de cultivo, encontrando valores de 428,025 U/mL de atividade proteolítica.

O planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta são ferramentas estatísticas que possibilitam análises de interações entre variáveis que influenciam diferentes tipos de processos, sendo atualmente, muito utilizadas na produção de enzimas. Assim, a otimização desses processos demonstra a empregabilidade das condições ótimas de fermentação para produção de protease e as possíveis aplicações industriais.

Pode-se observar que a protease obtida, a partir dos meios otimizados, quando aplicada diretamente em fontes proteicas, demonstrou uma alta atividade em 1% da farinha do processamento do resíduo de pescado, em temperatura ambiente, indicando sua capacidade de hidrólise nesse substrato.

Declaração de Conflito de interesse

A autora declara não ter conflito de interesse na publicação deste artigo.

Agradecimentos

Este estudo teve apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES). E contribuição da Professora DSc Raquel Vieira de Carvalho

Referências

Asitok, A., Ekpenyong, M., Takon, I., Antai, S., Ogarekpe, N., Antigha, R., Edet, P., Ben, U., Akpan, A., Antai, A., & Essien, J. (2022). Overproduction of a thermo-stable halo-alkaline protease on agro-waste-based optimized medium through alternate combinatorial random mutagenesis of *Stenotrophomonas acidaminiphila*. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 35(e00746), e00746. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00746>

Balachandran, C., Vishali, A., Nagendran, N. A., Baskar, K., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2021). Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4263–4269. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.069>

Barrett, A. J., & McDonald, J. K. (1986). Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *The Biochemical Journal*, 237(3), 935. <https://doi.org/10.1042/bj2370935>

Barbosa, J.B. (2015). Utilização da Farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis Sims*) Para a produção de enzimas por *Bacillus sp.* SMIA-2. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos do Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF, 96f.

Berini, F., Casciello, C., Marcone, G. L., & Marinelli, F. (2017). Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS microbiology letters*, 364(21). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx211>

Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., & Randhawa, M. A. (2018). Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from

Bacillus licheniformis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 944–951. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.009>

Brooks MS, R. V. V. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: A critical review. *Journal of microbial & biochemical technology*, 05(04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>

Cahyaningtyas, H. A. A., Suyotha, W., Cheirsilp, B., & Yano, S. (2021). Statistical optimization of halophilic chitosanase and protease production by *Bacillus cereus* HMRSC30 isolated from Terasi simultaneous with chitin extraction from shrimp shell waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31(101918), 101918. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101918>.

Chandramohan, M., Yee, C. Y., Kei Beatrice, P. H., Ponnaiah, P., Narendrakumar, G., & Samrot, A. V. (2019). Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycooides* strain MA02 isolated from poultry slaughter house soils. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22(101371), 101371. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101371>.

Chaud, L. C. S., Lario, L. D., Bonugli-Santos, R. C., Sette, L. D., Pessoa Junior, A., & Felipe, M. das G. de A. (2016). Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, 33(6), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.016>
doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5.

Delatorre, A. B. (2008). UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO MICRORGANISMO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Eswari, J. S., Anand, M., & Venkateswarlu, C. (2016). Optimum culture medium composition for lipopeptide production by *Bacillus subtilis* using response surface model-based ant colony optimization. *Sadhana*, 41(1), 55–65. <https://doi.org/10.1007/s12046-015-0451-x>

FAOSTAT, 2019. Crops production data [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 10.13.22)

Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>

Gao, R., Shen, Y., Shu, W., Bai, F., Jin, W., Wang, J., & Yuan, L. (2020). Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti-inflammatory potential. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/9698134>

Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J., & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>

Hui, C., Wei, R., Jiang, H., Zhao, Y., & Xu, L. (2019). Characterization of the ammonification, the relevant protease production and activity in a high-efficiency ammonifier *Bacillus*

amyloliquefaciens DT. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.04.009>

Kandasamy, S., Muthusamy, G., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Thangasamy, S., Seralathan, K.-K., & Chinnappan, S. (2016). Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. *3 Biotech*, 6(2), 167. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0481-z>.

Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Durães Sette, L., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., & Pessoa, A. (2020). Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports* (Amsterdam, Netherlands), 28(e00546), e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>.

Mazhar, H., Ullah, I., Ali, U., Abbas, N., Hussain, Z., Ali, S. S., & Zhu, H. (2023). Optimization of low-cost solid-state fermentation media for the production of thermostable lipases using agro-industrial residues as substrate in culture of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47(102559), 102559. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102559>

Prajapati, J., Dudhagara, P., & Patel, K. (2021). Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35(102063), 102063. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102063>

Pedro, S., & Nunes, M. L. (2019). Reducing salt levels in seafood products. *Em Reducing Salt in Foods* (p. 185–211). Elsevier.

Rejisha, R. P., & Murugan, M. (2021). Alkaline protease production by halophilic *Bacillus* sp. strain SP II-4 and characterization with special reference to contact lens cleansing. *Materials Today: Proceedings*, 45, 1757–1760. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.624>

Rathod, M.G., & Pthak, A.P. (2014). Wealth from waste: Optimized alkaline protease production from agro-industrial residues by *Bacillus alcalophilus* LW8 and its biotechnological applications. *Journal of Taibah University for Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.002>

Reddy, N., Deekonda, V., Seshagiri, S., Reddy, R., & Gangula, A. K. (2022). Production, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as the substrate. *Industrial Crops and Products*, 187(115403), 115403. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115403>

Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 40(8), 2689–2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>

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. (2023). Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its Applications. *Journal of King Saud University. Science*, 35(1), 102429. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>.

Suberu, Y., Akande, I., Samuel, T., Lawal, A., & Olaniran, A. (2019). Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18(101011), 101011. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.049>

Sedyama, G. C.; Junior, J. C. F. M.; Santos, A. R.; Ribeiro, A.; Costa, M.H.; Hamakawa, P. J.; Costa, J. M. N.; Costa, L. C. Zoneamento agroclimático do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, v. 9, n. 3, p. 501-509, 2001.

Xiao, Y.-Z., Wu, D.-K., Zhao, S.-Y., Lin, W.-M., Gao, X.-Y., 2015. Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45, 447–462. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923450>.

Yadav, D., Tanveer, A., & Yadav, S. (2019). Metagenomics for Novel Enzymes: A Current Perspective. Em *Microorganisms for Sustainability* (p. 137–162). Springer Singapore.

5. CONCLUSÃO GERAL

O microrganismo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 foi capaz de crescer e secretar a enzima protease quando cultivado em meio contendo 0,5% de farinha de resíduo de pescado como fonte de carbono. A fermentação foi realizada a 37 °C e 150 rpm, durante 120 horas de cultivo, onde a atividade máxima da enzima alcançada foi de 779,27 U/mL em 72 horas, com um valor de densidade ótica (DO) de 2,38 e pH de 7,9. O efeito do pH, temperatura, íons metálicos e inibidores foi avaliado encontrando os valores ótimos de pH em 8,5 (1110,74 U/mL), temperatura em 70 °C (943,09 U/mL), Mg²⁺ como íon estimulador, apresentando 122% de atividade relativa e EDTA e 1-10 fenantrolina como inibidores.

O processo de fermentação foi realizado sob diferentes condições no intuito de otimizar os parâmetros que influenciam a produção da enzima, tendo como variáveis independentes a concentração de resíduo do processamento de pescado e pH inicial do meio de cultivo. O ensaio que obteve melhor produção de protease, durante 96 horas de cultivo, foi onde havia a concentração de 1,05% de farinha de resíduo de pescado e pH inicial de 7,5 (atividade de 428,025 U/mL). O estudo sobre a aplicação da enzima utilizando caseína e farinha de resíduo de pescado, quando testados em temperatura ambiente e a 70 °C, demonstrou que a atividade de protease, na concentração de resíduo a 1%, foi a maior atividade (821,01 U/mL) em temperatura ambiente.

Os resultados desse estudo demonstraram que a protease produzida é de natureza alcalina, sendo possível utilizá-la em processos biotecnológicos em condições de alcalinidade. O resíduo proveniente da indústria do processamento de pescado se mostrou como uma alternativa viável que favoreceu a produção da protease com menor custo além de reduzir o impacto ambiental negativo, que tais resíduos possam causar sendo descartados em locais indevidos. Recomenda-se o uso de tais resíduos em meios de cultura para produção da enzima.