

Produção, Caracterização, e Aplicação de Proteases Líticas de *Bacillus* sp. para Clarificação de Meio de Cultivo Fermentado

Júlio Cesar J. Sprocati, Prof Dra. Hélia Harumi Sato
Pibic/Sae

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Bioquímica de Alimentos



Introdução

As proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas das proteínas formando peptídeos e aminoácidos. As proteases são aplicadas nas indústrias de detergentes, de alimentos, de couro, têxtil, e farmacêutica.

Muitos micro-organismos secretam proteases para o meio extracelular com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para a multiplicação celular. As enzimas produzidas por micro-organismos em processos fermentativos possuem vantagens com relação àquelas obtidas a partir de outras fontes como plantas e animais, tais como maior produtividade, rendimento relativamente alto, possibilidade de aumento da escala de produção, eficiência de custos e susceptibilidade a manipulação genética.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção, caracterização de proteases de linhagens de *Bacillus* sp nº 8 e nº27 visando à aplicação da enzima na clarificação de caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* para a obtenção de goma xantana sem a necessidade de centrifugação do caldo fermentado para a separação da massa celular.

Material e Métodos

Produção da protease de *Bacillus* sp em frascos agitados

Foi estudada a produção de protease em meios de cultura nº1 composto de 0,65% de glicose; 0,3% de extrato de levedura; 0,15% de K_2HPO_4 ; 0,5% de Mg_4SO_4 e 0,45% de $(NH_4)_2HPO_4$ e em meio de cultura nº2 composto de melaço de cana; água de maceração de milho e extrato de levedura.

A cultura de 24h das linhagens *Bacillus* sp nº 8 e nº27 em tubos de Agar Nutriente foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50 mL dos meios de cultura nº1 e nº 2. Os frascos foram incubados em agitador rotatório New Brunswick modelo Series 25, a 30°C, 200 rpm durante 72 horas. Após a incubação os meios de cultura foram centrifugados a 10.000xg por 20 minutos, a 5°C para a separação da massa celular e os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto de protease. Os testes foram feitos em duplicata.

Determinação da atividade enzimática

Alíquotas de 0,5mL de solução 0,5% (m/v) de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5, em tubos eppendorf, foram pré-incubadas em banho a 60°C por 10 minutos. Adicionou-se 0,5mL do extrato enzimático em cada tubo, incubando-se as misturas por 40 minutos a 60°C. Foi adicionado 0,5 mL de solução 10% de TCA aos tubos para paralisar a reação. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 15.000 x g a 5°C. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para tubo eppendorf e foi adicionado 1mL de solução de KOH 5M. A absorbância foi medida a 428nm em espectrofotômetro.

No tubo branco adicionou-se 0,5 mL de solução 10% de TCA antes da adição de 0,5mL do extrato enzimático. O tubo branco foi incubado nas mesmas condições descritas acima. Uma unidade de atividade de protease foi expressa como aumento de 0,01 na absorbância por minuto por mL de enzima.

Aplicação da protease de *Bacillus* sp nº 8 e nº 27 na clarificação de caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951

Para o estudo da aplicação dos extratos enzimáticos brutos de protease de *Bacillus* sp nº 8 e nº 27, foi utilizado meio fermentado de *Xanthomonas campestris* como substrato. Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 25 mL de caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 e 0,5 mL dos extratos enzimáticos brutos de *Bacillus* sp nº8 e nº27. A mistura foi incubada a 50°C com agitação. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas no tempo zero e após 210 minutos avaliando-se a capacidade de lisar células de *Xanthomonas campestris*. As amostras do meio reacional foram diluídas em água e a transmitância foi determinada a 640nm e a capacidade de lise foi expressa pela diferença nos valores de transmitância no tempo zero e após 210 minutos. Também foi realizado um ensaio controle utilizando-se 0,5 mL de água destilada em lugar da enzima.

Resultados e Discussão

Foi obtida maior produção de protease na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº8 (73U/mL) em meio de cultura nº2 adicionado de 1% de caseína após 56 horas de fermentação a 30°C. Na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº8 em meio cultura nº1 adicionado de 1% de caseína foi obtido 35U/mL de protease, após 56 horas de fermentação a 30°C (Figura 1 A e 1B).

Na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº27 em meios de cultivo nº1 e nº 2 foram obtidos respectivamente 31,2U/mL e 60,7U/mL de protease após 56 horas de fermentação a 30°C (Figura 1 C e 1D).

As proteases de *Bacillus* sp nº8 e nº27 apresentaram maior atividade a 60°C e pH 8,5, indicando que são proteases alcalinas.

As proteases de *Bacillus* sp nº 8 e *Bacillus* sp nº 27 foram capazes de lisar e clarificar o caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.

Resultados

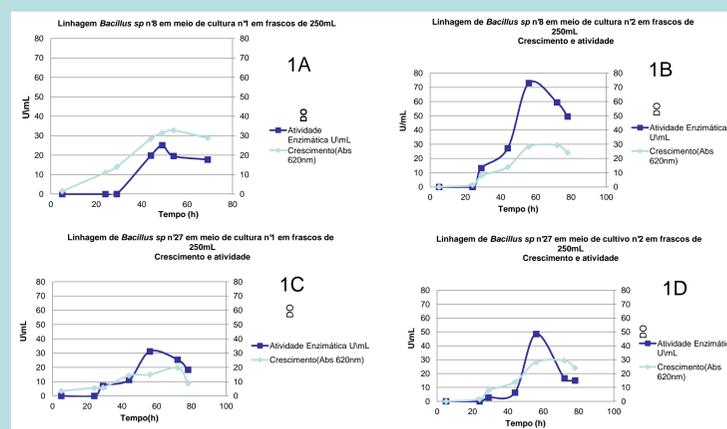


Figura 1 – Cinética de produção de proteases pelas linhagens de *Bacillus* sp nº 8 em meios de cultivo nº 1 (Fig. 1A), nº 2 (Fig. 1B) e *Bacillus* sp nº 27 em meios de cultivo nº 1 (Fig. 1C), nº 2 (Fig. 1D).

Conclusão

A linhagem de *Bacillus* sp nº8 apresentou maior produção de protease que a linhagem nº27. Foi obtida maior produção de protease na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº8 (73U/mL) em meio de cultura nº2 adicionado de 1% de caseína após 56 horas de fermentação a 30°C. Na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº8 em meio cultura nº1 adicionado de 1% de caseína foi obtido 35U/mL de protease, após 56 horas de fermentação a 30°C.

Na fermentação da linhagem de *Bacillus* sp nº27 em meios de cultivo nº1 e nº 2 foram obtidos respectivamente 31,2U/mL e 60,7U/mL de protease após 56 horas de fermentação a 30°C.

É necessário a adição do indutor caseína no meio de cultivo para a produção de protease pela linhagem de *Bacillus* sp nº8. A linhagem de *Bacillus* sp nº 27 não necessita do indutor caseína para a produção de protease.

As proteases de *Bacillus* sp nº8 e nº27 apresentaram maior atividade a 60°C e pH 8,5, indicando que são proteases alcalinas.

As proteases de *Bacillus* sp nº 8 e *Bacillus* sp nº 27 foram capazes de lisar e clarificar o caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.

Agradecimentos ao PIBIC – UNICAMP pela bolsa de iniciação científica.