

CAPÍTULO 8

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE DE *BACILLUS SUBTILIS* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA¹

Natália Bittencourt Melani
Caio Eduardo Soria Roque
Gabrielle Laporte Santos
Edgar Silveira
Elias Basile Tambourgi

RESUMO

O mercado de enzimas tem crescido a cada ano, especialmente as proteases (E.C. 3.4.), que são enzimas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Os microrganismos representam uma fonte atraente de proteases, e entre eles, as cepas microbianas mais importantes utilizadas na produção de proteases são as espécies do gênero *Bacillus*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo de incubação de *Bacillus subtilis* na produção de protease. Nesta metodologia, a fermentação foi monitorada 72h quanto ao crescimento celular e atividade proteolítica no meio. Os resultados indicaram a melhor produção de protease às 60 horas, corroborando com a literatura. Assim, *Bacillus subtilis* foi capaz de produzir proteases e novas investigações dos parâmetros do meio de cultura são necessárias para aumentar a produção de enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: Protease. Fermentação. Biotecnologia. Microbiologia. Bacillus.

1. INTRODUÇÃO

O cenário atual para o mercado de enzimas não é suficiente para atender a todas as necessidades industriais e de biotecnologia. Nesse contexto, os microrganismos são uma das maiores e mais úteis fontes de enzimas (ADRIO; DEMAIN, 2014). Atualmente, cerca de 4000 enzimas são conhecidas e, aproximadamente, 200 tipos microbianos são utilizados comercialmente (KUMAR *et al.*, 2014).

Proteases (E. C. 3. 4.) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, participando da maioria dos aspectos da nutrição, fisiologia e regulação das células, além da patogênese microbiana. Dependendo do seu local de ação, as proteases são categorizadas em dois grandes grupos, ou seja, exoproteases e endoproteases, e uma classificação adicional pode ser inserida dependendo do arranjo distinto de grupos funcionais presentes no sítio ativo da enzima (WARD *et al.*, 2009).

Estima-se que as proteases representem 1-5% do genoma de organismos infecciosos e 2% do genoma humano (PUENTE *et al.*, 2003). Segundo os pesquisadores, as proteases

¹ Órgão Fomentador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

controlam a ativação, síntese e rotatividade de proteínas para regular processos fisiológicos, como formação, envelhecimento e até morte. Desde o advento da enzimologia, as proteolíticas microbianas têm sido a enzima mais estudada. Essas enzimas têm ganhado interesse não apenas por seu papel vital nas atividades metabólicas, mas também por sua imensa utilização nas indústrias (RAZZAQ *et al.*, 2019).

Em comparação com plantas e animais, os microrganismos representam uma fonte de protease atraente. Portanto, eles podem ser cultivados em grandes quantidades em um curto período de tempo por processos fermentativos. Esta operação resulta na produção abundante e regular do produto de interesse. Além disso, as enzimas secretadas por eles têm uma vida útil mais longa e podem ser armazenadas por semanas sem perda significativa de atividade (SHARMA *et al.*, 2017).

O uso de proteases de origem microbiana no setor industrial é limitado por sua qualidade e custo. O crescente interesse em usar proteases para a produção de vários bens ecológicos no mercado é de imensa importância e, para tornar os produtos econômicos, os cientistas estão em busca de um substrato barato para a produção de enzimas. Quase dois quartos do custo de produção devem-se ao substrato de crescimento microbiano, onde tanto o substrato sólido quanto a fermentação submersa são explorados para a produção econômica de proteases microbianas (RAZZAQ *et al.*, 2019).

O desempenho da protease é influenciado por diversos fatores, como pH do processo industrial, resistência iônica, temperatura e manuseio mecânico. Enzimas recentes descobertas com novas propriedades que podem melhorar ainda mais o processo industrial estão sempre em demanda (SHARMA *et al.*, 2017). Todas as proteases microbianas industriais predominantes são enzimas extracelulares secretadas no meio de cultura (WARD; RAO; KULKARNI, 2011).

A soja é um dos alimentos mais nutritivos que pode ser obtido a um preço acessível. Quanto à sua composição, estima-se que 100 g de soja cozida contenha cerca de 16,6 g de proteína, 6,0 g de fibra, 9,9 g de carboidrato, 9,0 g de gordura, e 3,0 g de açúcar (ARNARSON, 2019). Além disso, o uso potencial da soja como fonte economicamente viável de nutrientes para meios alternativos de crescimento é atrativo. A soja contém nove aminoácidos essenciais, como valina, metionina, triptofano, treonina, fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina e histidina (MONTE SINGER *et al.*, 2020).

Em uma outra aplicação para soja como substrato para crescimento de *Bacillus subtilis*, Malik, Simarani e Aziz (2022) demonstraram a utilização de um meio sólido para crescimento

de colônias empregando soja em sua composição. O ágar soja teve desempenho comparável ao ágar nutriente, uma vez que as características morfológicas das colônias de *B. subtilis* formadas em ambos os foram comparáveis em termos de textura, margem, propriedades ópticas, cor, elevação e forma.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a investigação da influência do tempo de incubação na densidade celular e na produção de proteases de *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 utilizando farinha de soja como material de baixo custo para a produção de enzimas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de Cultivo

O pré-inóculo da fermentação submersa com *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 foi preparado em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL do meio de cultura previamente esterilizado composto por glicose (4%) e peptona (1%) e agitado a 200 rpm durante 6 horas à temperatura ambiente. Em seguida, 10 mL foram transferidos para um novo frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultivo e agitado durante 12 horas nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, a densidade óptica foi medida usando um espectrofotômetro a 625 nm (comprimento de onda) para o crescimento celular e as concentrações foram ajustadas para 0,08-0,1 O.D.

Para o processo de fermentação, 10% do volume de inóculo foi transferido para 250 mL de frascos esterilizados contendo 100 mL de meio de cultura com glicose (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,5%) e farinha de soja (5%). O meio foi agitado a 200 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL de amostra de alíquota foi coletado em intervalos de 12 horas para monitorar a atividade proteolítica e a densidade óptica.

2.2 Atividade Proteolítica

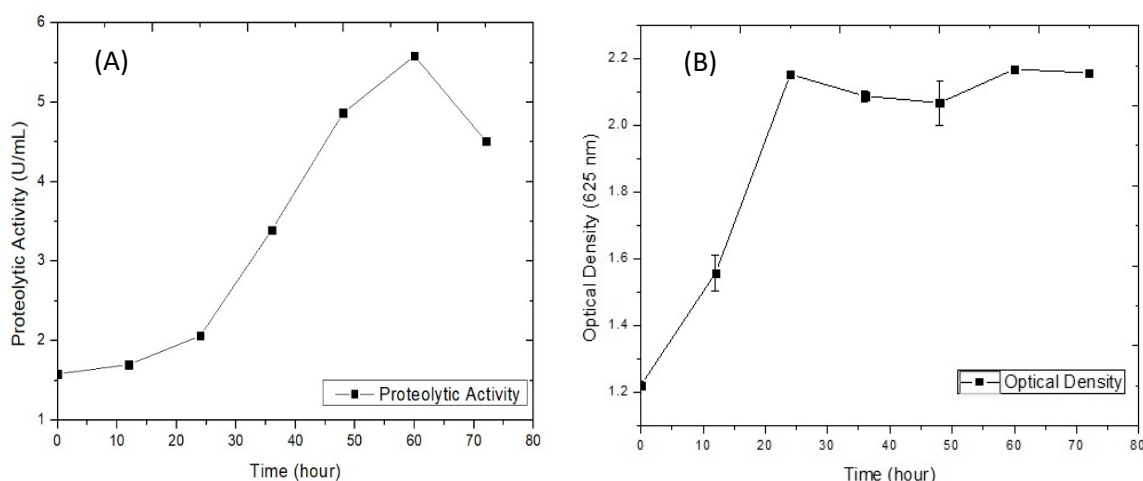
A atividade proteolítica foi realizada utilizando azocaseína como substrato. De acordo com a metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947), 125 µL de extrato enzimático foram incubados com solução de 125 µL contendo azocaseína a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0 por 15 min a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% e posteriormente centrifugada a 6.000 g por 5 min a 25°C. Em seguida, 1 mL de hidróxido de sódio 0,5 M (NaOH) foi adicionado ao sobrenadante. As atividades proteolíticas foram quantificadas por espectrofotômetro a 440 nm, e o branco foi dado pela substituição do extrato enzimático por água destilada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese de protease por espécies de *Bacillus* é controlada por mecanismos operacionais durante o estado de transição entre as fases de crescimento exponencial e estacionário. Esse acontecimento ocorre enquanto a cultura estava metabolicamente ativa (ASHA; PALANISWAMY, 2018). O tempo de incubação desempenha um papel importante na produção máxima de enzima durante o processo de fermentação. No presente estudo, a produção de protease foi gradualmente aumentada de 12 horas para 60 horas e atingiu a atividade máxima de 5,6 U/mL (Figura 1A). Nessas condições, a produção de protease por *Bacillus subtilis* CBMAI-1302 foi menor do que outras espécies de *Bacillus*, de acordo com relatos da literatura (REKIK *et al.*, 2019; KHURSO, 2016; SANTHI, 2014). Portanto, sugere-se fortemente a realização de novos estudos de otimização de meios para aumentar a síntese dessa biomolécula.

Para o crescimento celular, a fase exponencial pode ser observada nas primeiras 24 horas de cultivo, onde os tempos subsequentes indicaram uma fase estacionária da curva de crescimento (Figura 1B). De acordo com Khusro (2016), o declínio da protease atividade na fase posterior do crescimento pode estar associada à depleção de nutrientes no meio de fermentação, no qual causa estresse na cultura e, conseqüentemente, condições não ideais para as bactérias. Esses fatores podem ser resultado na redução da atividade enzimática.

Figura 1: Influência do tempo de incubação para a produção de protease (A) e densidade celular (B).



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

O aumento da produção de protease de espécies de *Bacillus* pode ser observado entre 48-72 horas de incubação. Singh e Bajaj (2015) analisaram o crescimento e o ensaio de protease em diferentes intervalos de tempo durante a fermentação. Eles obtiveram produção máxima de

enzimas por *Bacillus subtilis* K-1 após 72 h, enquanto o crescimento máximo foi alcançado em 48 h, que então permaneceu constante.

Por outro lado, Santhi (2014) relatou que a produção de protease foi gradualmente aumentada a partir de 12 horas e atingiu a atividade máxima em 48 horas durante o processo de fermentação usando *Bacillus cereus*. Além disso, Asha e Palaniswamy (2018) também estudaram a produção de protease de *Bacillus cereus* e o melhor resultado foi encontrado às 48 h de incubação. No entanto, 89% e 82% da atividade da protease foram mantidos às 60 h e 72 h de incubação, respectivamente. Portanto, os resultados expostos na Figura 1(A) e na Figura 1(B) estão de acordo com os relatos da literatura.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As proteases CBMAI-1302 de *Bacillus subtilis* foram produzidas por fermentação submersa e a atividade máxima foi registrada em 60 horas. Além disso, a densidade celular indicou um aumento do crescimento nas primeiras 24 horas de fermentação e manteve-se constante. Esses resultados estão de acordo com a literatura, demonstrando que a utilização de materiais de baixo custo, como a farinha de soja, na produção de moléculas de interesse comercial, tem o potencial de contribuir para a redução de custos do processo, podendo contribuir para aplicação industrial e competição com agentes químicos que estão atualmente no mercado. Vale ressaltar que novos estudos explorando diferentes fontes de nitrogênio carbono, pH e temperatura são importantes para encontrar as condições ótimas de produção de proteases secretadas por *B. subtilis* CBMAI-1302.

REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/4/1/117>. Acessado em: Abr. 2023.

ASHA, B.; PALANISWAMY, M. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 2, p. 119-127, 2018. Disponível em: http://japsonline.com/abstract.php?article_id=2563. Acessado em: Abr. 2023.

ARNARSON, A. Soybeans 101: Nutrition Facts and Health Effects. **Healthline**. 2019. Disponível em: <https://www.healthline.com/nutrition/soybeans#nutrition>. Acessado em: Abr. 2023.

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

1947. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19481400116>. Acessado em: Abr. 2023.

KHUSRO, A. One Factor at A Time based optimization of protease from poultry associated *Bacillus licheniformis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 3, p. 088-095, 2016. Disponível em: https://japsonline.com/abstract.php?article_id=1808. Acessado em: Abr. 2023.

KUMAR, V. *et al.* Global market scenario of industrial enzymes. Industrial enzymes: Trends, scope and relevance. **Nova Science Publishers**, New York, p. 173-196, 2014. Disponível em: <https://novapublishers.com/shop/industrial-enzymes-trends-scope-and-relevance/>. Acessado em: Abr. 2023.

MALIK, N. H. A.; SIMARANI, K.; AZIZ, M. A. Soybean as an alternative nutrient medium for *Bacillus subtilis* growth. **Malaysian Applied Biology**, v. 51, n. 4, p. 67-74, 2022.

PUENTE, X. S. *et al.* Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 544-558, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg1111>. Acessado em: Abr. 2023.

RAZZAQ, A. *et al.* Microbial proteases applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 110, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00110/full>. Acessado em: Abr. 2023.

REKIK, H. *et al.* Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 1227-1239, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018349419>. Acessado em: Abr. 2023.

SANTHI, R. Microbial production of protease by *Bacillus cereus* using cassava waste water. **European Journal of Experimental Biology**. v. 4, p. 19-24, 2014. Disponível em: <https://www.primescholars.com/articles/microbial-production-of-protease-by-bacillus-cereus-using-cassavawaste-water.pdf>. Acessado em: Abr. 2023.

SHARMA, K. M. *et al.* Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X17300094>. Acessado em: Abr. 2023.

SINGER, W. M. *et al.* Soybean amino acids in health, genetics, and evaluation. **Soybean for human consumption and animal feed**, 2019, p.7- 14. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/69396>. Acessado em: Abr. 2023.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* K-1. **Chemical Engineering Communications**, v. 202, n. 8, p. 1051-1060, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00986445.2014.900052>. Acessado em: Abr. 2023.

WARD, O. P. 3.49 - Proteases. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p. 571–582. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151786/>. Acessado em: Abr. 2023.

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