



Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha

Helena Soraia Fernandes Vieira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Carla Maria Feio Pires

Coorientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Carla Maria Feio Pires, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

2013

Agradecimentos

Ao concluir este trabalho não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a sua realização:

À minha orientadora Eng^a Carla Pires, pela amizade, pela motivação transmitida, pela disponibilidade que sempre demonstrou, pela orientação extraordinária e ainda pela revisão cuidadosa do trabalho.

Ao Eng.^o Irineu, pela orientação científica deste trabalho, pelos ensinamentos desde as bases até aos conceitos mais complexos, por toda a confiança depositada em mim, pela sua incondicional persistência com o trabalho e comigo e também pela revisão cuidadosa do trabalho.

À Doutora Sónia, por me ter transmitido o conhecimento suficiente para evoluir e ultrapassar as barreiras na microbiologia e pela sua orientação.

À Doutora Luísa Louro, do Instituto Superior de Agronomia, pelo apoio disponibilizado e pela revisão atenciosa do presente trabalho.

À Bolseira Patrícia, que me acolheu muito bem no laboratório de microbiologia transmitindo-me os conhecimentos necessários, com quem partilhei muitos bons momentos, bem como um pouco de stress e desespero ocasional, tendo sempre uma palavra amiga.

Aos meus colegas estagiários e bolseiros em especial à Barbara, Gabriel, Irina, Marta, Soraia pela ajuda, ensinamentos e pelos momentos que partilhámos.

A todos os meus amigos e colegas da Licenciatura e do Mestrado em especial à Carina, Flávio, Helena, Isabel, Judite, Neusa, Pedro, Susana, Tiago, Vítor que me acompanharam durante o meu percurso académico, por todos os momentos de aventura, descontração, diversão ou pura parvoíce que me proporcionaram ao longo dos anos.

Aos meus amigos em especial à Cátia e Joel Maia, Edgar Santos, Elvis, Patrícia Carinhas, Tânia Sousa, Zeca Costa e a todos os outros, pelos momentos de descontração, pelo apoio e amizade sempre presentes.

Por último, agradeço à minha Família os esforços que fizeram ao educar-me, na tentativa de que eu conseguisse alcançar os meus muitos objetivos de vida, pelo apoio incondicional em tudo. Sem eles não teria sido possível a realização desta dissertação.

Um Muito Obrigado a Todos!

Resumo

As proteases microbianas têm sido muito estudadas devido às vantagens em relação a enzimas de outras fontes. Este trabalho teve como principal objetivo caracterizar uma protease produzida por uma bactéria de origem marinha. Esta bactéria foi cultivada num meio de cultura contendo peptona bacteriológica (1,2 e 4%), extrato de levedura (0,5%) e açúcar (0,5% de sacarose ou glucose). Monitorizou-se o crescimento bacteriano e a atividade enzimática durante 50h, sendo as condições mais favoráveis obtidas com sacarose, extrato de levedura e peptona 2%.

A enzima apresentava uma temperatura ótima a 60°C e pH ótimo a 6,5, contudo parecia existir outro máximo de atividade a pH 7,6. A enzima era muito estável a 40°C durante aproximadamente 15h, bem como quando pré-incubada durante 1h a temperaturas entre 6 e 50°C. No entanto, a enzima desnaturava rapidamente após 30 minutos a 60°C. A estabilidade da protease a pH ácido era baixa, apresentando estabilidade na gama de pH 6,5 a 10,6. Esta protease era inibida pelo EDTA e fenantrolina, indicando tratar-se de uma metaloprotease. A adição de iões, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , levou a um aumento significativo da atividade enzimática.

As características desta protease indicam que esta enzima pode ter diferentes aplicações na indústria.

Palavras chave: *Bacillus* sp., enzimas extracelulares, proteases, neutrase, metaloprotease

Abstract

Proteases from marine microorganisms have received increased attention due to their advantages compared to other sources. The objective of this work was the characterization of an extracellular protease produced by a marine strain.

The bacterial growth was performed in a liquid culture media, containing bacteriological peptone (1, 2 and 4%), yeast extract (0.5%) and sugar (0.5% saccharose or glucose). Bacterial growth and enzymatic activity were followed for 50 h. Best results were obtained with saccharose, yeast extract and 2% of peptone.

The optimum temperature and pH were 60°C and 6.5, respectively. However, another proteolytic activity maximum was recorded at pH 7.6.

The protease was stable at 40°C for approximately 15h, as well as when pre-incubated for 1h at temperatures between 6 and 50 °C. However, this protease was quickly denaturated at 60°C. The incubation of the protease at different pH showed that it was stable at pH 6.5-10.6. This protease was inhibited by EDTA and phenantroline indicating that this protease is a metalloprotease. The addition of ions like Ca²⁺ and Mg²⁺ led to an significantly increase of enzyme activity.

The characteristics of this protease indicate that this enzyme may be further exploited for various industrial applications.

Keywords: *Bacillus* sp., extracellulares enzymes, proteases, neutrase, metalloprotease

Abstract

Microbial proteases constitute one of the most important groups of industrial enzymes due to the wide spectrum of applications in different industries such as detergent, food, bioremediation, pharmaceutical, leather, etc. A number of bacteria, fungi and yeast have been reported for protease production. Additionally, proteases from marine microorganisms have received increased attention due to their inherent stability at different pH values, temperature and salinity.

The objective of this present work was the production and the preliminary characterization of an extracellular protease presumptively *Bacillus* sp. isolated from estuarine bivalves, presenting proteolytic activity in casein.

The bacterial growth was performed in a liquid culture media, containing three levels of bacteriological peptone (1, 2 and 4 %), yeast extract (0.5 %) and sugar (0.5 % saccharose or glucose), with continuous shaking at 30°C and followed for 50 h. Bacterial growth was followed by measurement of the absorbance and bacterial counts. Broth was centrifuged at 10000 g for 5 min and the supernatant was filtrated using filters with 0.45 µm diameter pore. The filtrate was used for the characterization of protease produced.

Azocasein was used as substrate for the measurement of proteolytic activity and pH and temperature of maximum activity were determined. The thermal and pH stability was also evaluated. The effect of several inhibitors and cations was tested.

The higher enzymatic activity was achieved with a culture medium containing 2 % bacteriological peptone, 0.5 % saccharose and 0.5 % yeast extract.

The optimum temperature was recorded at 60 °C and the energy of activation calculated from Arrhenius representation was 105 cal/mol. The maximum activity was observed at pH 6.5. However, at pH 7.6 there was an inflection in the activity curve suggesting a second activity maximum. These values lead to admit the presence of neutrases.

At both pH the protease was stable at 40 °C for approximately 15 h but at 50 °C the protease was stable only for 1.5 h. Moreover, this protease was quickly denaturated at 60 °C.

The incubation of the protease at different pH at room temperature for 24 h showed that it was unstable at pH below 6.0 and stable until pH 11. However, the activity was only 25 % of its initial value.

The enzyme activity was inhibited by EDTA (pH 6.5 and 7.6) and phenantroline (pH 7.6) indicating that this protease is a metalloprotease. On the other hand, the enzyme was activated by the presence of ions Ca^{2+} and Mg^{2+} .

The results obtained in thermal and pH stability and with inhibitors lead to admit that the strain used in this study produce only an extracellular protease. These results also suggest that this protease may be further exploited for various industrial applications.

Índice

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Enzimas	2
2.2 Proteases	4
2.2.1 Classificação das proteases	6
2.2.2 Funções fisiológicas das proteases	9
2.2.3 Fontes de obtenção de enzimas proteolíticas	10
2.3 Proteases bacterianas	10
2.4 Fatores que influenciam a atividade enzimática	14
2.4.1 Temperatura	14
2.4.2 pH	14
2.4.3 Inibição enzimática	15
2.4.4 Estabilidade enzimática	16
2.5 Aplicações das proteases	16
2.5.1 Proteases na indústria de alimentos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material	19
3.2 Métodos	19
3.2.1 Preparação da estirpe N	19
3.2.2 Meios de cultura	20
3.2.3 Crescimento e caracterização preliminar da estirpe bacteriana	20
3.2.3.1 Ensaio microbiológico em tubos de ensaio	20
3.2.3.2 Ensaio microbiológico em frascos de Erlenmeyer	20
3.2.3.3 Determinação do número de células viáveis	20
3.2.3.4 Preparação do extrato enzimático	20
3.2.3.5 Preparação do isotiocianato de caseína	21
3.2.3.6 Determinação da atividade enzimática nos extratos obtidos nas culturas em tubo de ensaio	21
3.2.3.7 Determinação da atividade Enzimática do extrato obtido na cultura em frasco de Erlenmeyer	22
3.2.4 Caracterização das enzimas produzidas	23
3.2.4.1 Determinação da temperatura ótima	23
3.2.4.2 Determinação do pH ótimo	23

3.2.4.3 Estabilidade em função da temperatura.....	23
3.2.4.4 Estabilidade em função do pH	24
3.2.4.5 Ensaio de inibição.....	24
3.2.4.6 Efeito dos cátions	25
3.2.5 Tratamento estatístico	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Crescimento e caracterização preliminar da estirpe	26
4.1.1 Crescimento da estirpe.....	26
4.1.2 Atividade enzimática do extrato	26
4.1.3 Efeito do tipo de açúcar e da concentração de peptona bacteriológica na produção de protease.....	27
4.1.3.1 Efeito do tipo de açúcar.....	27
4.1.3.2 Efeito da concentração de peptona bacteriológica (BB) no crescimento microbiano	28
4.1.4 Efeito da concentração de BB na atividade enzimática	28
4.2 Caracterização das enzimas produzidas	29
4.2.1 Determinação da temperatura ótima.....	29
4.2.2 Determinação do pH ótimo.....	31
4.2.3 Estabilidade em função da temperatura.....	32
4.2.4 Estabilidade em função do pH	34
4.2.5 Ensaio de inibição.....	35
4.2.6 Efeito dos cátions	36
5. CONCLUSÕES	38
6. TRABALHO FUTURO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Representação esquemática da reação geral das proteases: hidrólise catalítica de uma ligação peptídica.....	4
Figura 2.2 - Representação da estrutura cristalográfica de uma tioesterase prevista a partir de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (referência do Protein Data Bank: 1YJB).....	5
Figura 2.3 - Esquema de classificação das proteases.....	6
Figura 2.4 - Curva de crescimento duma população microbiana. (Prescott, Harley & Klein, Microbiology, th edition, Mc GrawHill, 2002).....	13
Figura 3.1 - Fotografia da colónia de 24 horas.	19
Figura 4.1 – Crescimento celular da estirpe durante 50 h de incubação.....	26
(A – Contagens; B – densidade ótica)	26
Figura 4.2 – Atividade enzimática do extrato durante 50 h de incubação	27
Figura 4.3 – Crescimento celular da estirpe em função da concentração de substrato. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	28
(A - contagens; B – densidade ótica).....	28
Figura 4.4 - Atividade enzimática do extrato em função da concentração de peptona bacteriológica após 50 h de incubação. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).	29
Figura 4.5 – Efeito da temperatura na atividade proteolítica presente no extrato.....	29
A atividade máxima foi considerada 100 %.....	29
Figura 4.6 – Representação de Arrhenius para a enzima em estudo.	30
Figura 4.7 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da enzima.	31
A atividade máxima foi considerada 100 %.....	31
Figura 4.8 – Estabilidade térmica da enzima a pH 6,5.....	32
Figura 4.9 - Estabilidade térmica da enzima a pH 7,6.	32
Figura 4.10 – Estabilidade térmica da enzima, após 60 min de pré-incubação a diferentes temperaturas. A atividade máxima foi considerada 100 %.....	33
Figura 4.11 – Estabilidade da enzima em função do pH.....	34
Figura 4.12 – Efeito dos inibidores na atividade proteolítica. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	35
Figura 4.13 - Efeito dos catiões na atividade proteolítica. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).	36

Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Classificação das enzimas.....	4
Tabela 2.2 – Classificação das peptidases com base no tipo de reação catalisada ^a	7
Tabela 2.3 – Família das enzimas proteolíticas	7
Tabela 2.4 – Alguns microrganismos produtores de proteases e suas temperaturas ótimas de produção máxima.....	11
Tabela 3.1 – Inibidores e respectivas concentrações utilizadas nos ensaios de inibição.....	24
Tabela 4.1 – Efeito do tipo de açúcar no crescimento bacteriano e na atividade enzimática.	27

Lista de abreviaturas

Abs – absorvância

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BB – peptona bacteriológica

BHI – brain heart infusion

DFP – diisopropilofosfluridato

DTT - ditioneitol

EC - Comissão para Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FTC – tiocarbamoilo de fluoresceína

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

OD – densidade óptica

PMCB - p-cloromercurilbenzoato

PMSF - fluoreto de fenilmetanosulfonil

RNA – ácido ribonucleico

RPM – rotações por minuto

TCA – ácido tricloroacético

TSA - trypticase soy agar

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUÇÃO GERAL

As enzimas são utilizadas na indústria alimentar como agentes modificadores desde há muitos anos. Inicialmente, as suas aplicações eram restritas aos alimentos como queijos e bebidas alcólicas, os quais eram preparados sob condições que favoreciam o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela produção das enzimas atuantes. Na verdade, as alterações que verificamos nos alimentos são consequência por um lado do desenvolvimento microbiano e por outro da atividade enzimática.

O aparecimento e desenvolvimento das áreas da microbiologia e bioquímica, permitiu o avanço da indústria e do conhecimento dos mecanismos responsáveis por estas alterações, permitindo o aperfeiçoamento de processos já conhecidos, mas também levou à utilização de enzimas, isoladas ou não, em áreas em que ainda não eram aplicadas.

Na tecnologia de alimentos as proteases assumem um papel de grande importância. A sua ação provoca a degradação de proteínas pela hidrólise das ligações peptídicas e esta reação é importante na preparação de uma grande variedade de produtos alimentares processados como, por exemplo, queijos, cervejas e panificação. Estas proteases podem estar presentes no alimento, mas também podem ser produzidas por microrganismos ou adicionadas como preparações enzimáticas isoladas.

Sabendo a importância que as proteases têm nas diferentes indústrias, torna-se importante e interessante conhecer as suas características. Assim, neste trabalho, serão apresentadas as características de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos sem se alterarem. Na larga maioria dos casos são proteínas apesar de já existirem exemplos importantes de RNAs catalíticos ou ribozimas com atividade catalítica (Weil J., 2000).

A descoberta das enzimas é algo difícil de determinar historicamente. Atualmente a sua descoberta é atribuída aos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz, que em 1833 trataram um extrato aquoso do malte com etanol do qual precipitou uma substância que se decompunha com o aquecimento e que promovia a hidrólise do amido. Esta substância que denominaram de diastase (do grego “separar”) foi mais tarde renomeada de amilase (Weil J., 2000).

As enzimas, como catalisadores biológicos, apresentam diversas vantagens. Como qualquer outro catalisador, uma enzima acelera uma reação sem se consumir, não alterando o equilíbrio químico característico dessa reação. Efetivamente, as enzimas aceleram uma reação reversível em ambos os sentidos (Cabral *et al.*, 2003).

Outros estudos demonstraram que as enzimas podem ser usadas como catalisadores fora de células vivas e vários processos enzimáticos foram patenteados (Buchholz *et al.*, 2005). A sua atividade depende da integridade da sua conformação proteica nativa. A atividade enzimática perde-se geralmente caso uma enzima seja desnaturada ou dissociada em subunidades.

As estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essências para a função da sua atividade enzimática. Para serem ativadas, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além dos seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem componentes químicos adicionais chamados de cofactores. Um cofactor pode ser um ou mais íons inorgânicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica complexa chamada de coenzima.

Uma coenzima que está covalentemente ligada à parte proteica da enzima é chamada de grupo prostético. Uma enzima completa, catalicamente ativa, unida à sua coenzima e/ou íons metálicos, é chamada de holoenzima.

A ligação peptídica é a ligação covalente mais importante que une os aminoácidos para formar péptidos e proteínas. A hidrólise das ligações peptídicas é, portanto, um passo necessário na determinação da composição em aminoácidos das proteínas. As ligações

peptídicas podem também ser hidrolisadas por enzimas designadas por proteases (Lehninger, 1995).

A capacidade de uma enzima catalisar uma reação específica é talvez a sua propriedade mais significativa. A atividade catalítica de uma enzima proporciona um meio sensível e específico para a sua própria mensuração. Sob condições apropriadas, a velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações de enzima e de substrato (Said & Pietro, 2002). A velocidade de uma reação corresponde à conversão de um certo número de moles de substrato, por unidade de tempo. Pode admitir-se que, em certas condições, uma molécula de enzima possui uma atividade característica. A medição dessa atividade é um aspeto essencial na caracterização de um sistema de reação enzimática (Cabral *et al.*, 2003).

A reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação:



Onde: E = enzima, S = substrato e P = produto.

A atividade enzimática depende de uma complexa variedade de fatores, nomeadamente:

- 1) Natureza do substrato: cada substrato pode ser substituído por outros similares, e a velocidade da reação catalisada será diferente em cada caso. A especificidade da enzima será maior ou menor conforme, respetivamente, reconhece um maior ou menor número de substratos;
- 2) Presença de certos cofatores: iões metálicos, compostos orgânicos chamados co-enzimas. As enzimas podem requerer a presença de certos compostos, assim como podem ser afetados pela presença de inibidores;
- 3) Natureza do solvente: teor e tipo de compostos orgânicos, eletrólitos, co-solventes, etc;
- 4) pH do meio, o qual é um fator particularmente importante e cada enzima tem um pH ótimo característico que, nalguns casos, pode cobrir várias unidades de pH;
- 5) Temperatura que condiciona a velocidade da reação tal como em qualquer outro processo químico, mas no caso das enzimas temperaturas elevadas provocam a sua desativação por efeito da desnaturação da proteína (Cabral *et al.*, 2003).

As enzimas estão presentes na natureza, no nosso organismo, no ambiente e em todos os seres vivos, desempenhando um papel fundamental na conversão da luz ou da energia das ligações químicas em ATP na transformação de nutrientes contendo carbono e azoto em metabolitos utilizáveis pelas células, na replicação e expressão da informação genética e na deteção e transdução de sinais químicos externos à célula (Deutch, 2007).

A Comissão para Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (EC), estabeleceu uma classificação e nomenclatura para as enzimas.

A EC dividiu as enzimas em 6 classes (tabela 2.1), de acordo com o tipo de reação catalisada, e atribuiu um número único de quatro dígitos a cada tipo de enzima. Cada número pode englobar enzimas de origem e sequência de aminoácidos variável, mas a funcionalidade da enzima é idêntica.

Tabela 2.1 – Classificação das enzimas

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
1. Oxidoreduases	Reações de oxidação-redução
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4. Liasas	Remoção de grupos para formar ligações duplas (sem ser por hidrólise)
5. Isomerases	Reações de isomerização
6. Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

2.2 Proteases

As peptidases, peptídeo hidrolases ou proteases, são enzimas hidrolíticas que quebram ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas levando à formação de grupos amina e carboxilo, originando pequenos péptidos mais pequenos e/ou aminoácidos livres (Barrett, 1994; Barrett *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002). Na Figura 2.1 encontra-se esquematizada a reação global da hidrólise de uma ligação peptídica por adição de uma molécula de água, a qual, apesar de ser termodinamicamente favorável, apresenta uma cinética muito lenta na ausência de um catalisador (Berg *et al.*, 2002).



Figura 2.1 - Representação esquemática da reação geral das proteases: hidrólise catalítica de uma ligação peptídica.

A maioria das proteases são específicas, ou seja, não hidrolisam moléculas de proteína em qualquer ligação peptídica, mas apenas em ligações entre certos aminoácidos específicos. Se tais ligações existirem abundantemente na proteína, pode-se esperar uma considerável hidrólise proteica. Por outro lado, existem proteases que não são específicas quanto à sua composição dos aminoácidos e podem, portanto, hidrolisar a proteína em vários fragmentos menores.

As proteases encontram-se em todos os seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, estando envolvidas em vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Além disso, muitos microrganismos secretam peptidases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise são fontes de carbono e azoto para o seu crescimento.

Como as peptidases industriais, extraídas de plantas (papaína, bromelina, ficina) e de animais (peptidases digestivas) não dão resposta à procura comercial, as proteases microbianas passaram a ter grande relevância industrial. A produção industrial de proteases por microrganismos é favorecida pela facilidade de manipulação genética, diversidade genética e curto tempo de geração (Rao *et al.*, 1998). Estas enzimas constituem mais de 60% do mercado de enzimas utilizadas no segmento industrial (Johnvesly e Naik, 2001). Na indústria alimentar o , são reconhecidamente, o grupo de enzimas com maior número de aplicações (Rao *et al.*, 1998).

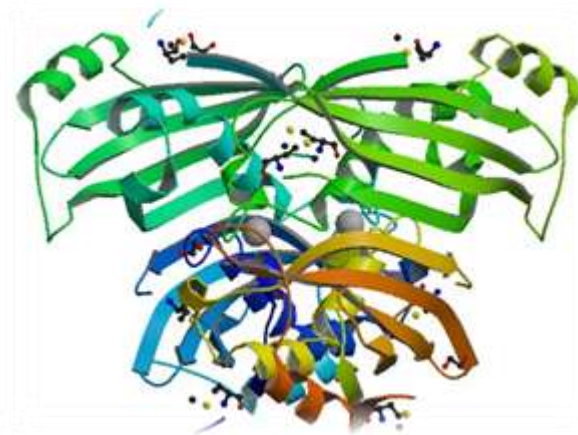


Figura 2.2 - Representação da estrutura cristalográfica de uma tioesterase prevista a partir de *Bacillus stearothermophilus* (referência do Protein Data Bank: 1YJB).

2.2.1 Classificação das proteases

A comissão de enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular recomenda a utilização do termo peptidase para o subconjunto das hidrolases de ligações peptídicas (Subclasse EC 3.4.), sendo o termo protease utilizado como sinónimo (Choplin, 2001).

As proteases compreendem dois grupos de enzimas: as endopeptidases (ou proteinases), que quebram ligações peptídicas no interior da cadeia proteica, e as exopeptidases cuja ação está dirigida aos aminoácidos terminais da cadeia polipeptídica. O esquema de nomenclatura está então assim definido:

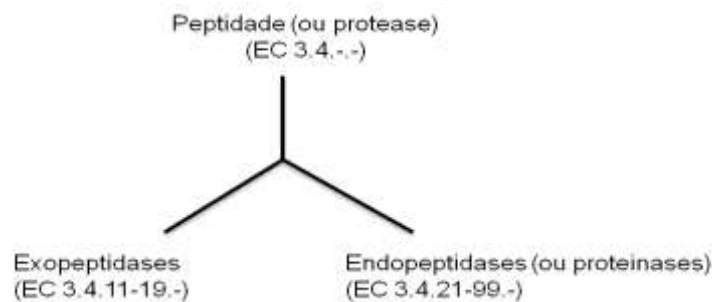


Figura 2.3 - Esquema de classificação das proteases.
Adaptado de Choplin, 2001.

Os números representam a classe (3, hidrolase), subclasse (3.4, actua sobre ligações peptídicas) e seu número de série dentro da sub-subclasse. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases (EC 3.4. 21-99.-) e exopeptidases (EC 3.4.11-19.-) de acordo com a posição da ligação peptídica a ser catalisada na cadeia peptídica. A sigla "EC" é a abreviatura de *Enzyme Commission*.

No passado, as proteases eram classificadas de acordo com o seu peso molecular, carga ou especificidade do substrato. O sistema de classificação é baseado na comparação de centros ativos, mecanismo de ação e estrutura tridimensional (Neurath, 1990).

São exopeptidases (EC 3.4.11-19.-), quando catalisam reações de hidrólise das proteínas nas extremidades das cadeias protéicas. As endopeptidases catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas internas das moléculas de proteínas.

As endopeptidases são classificadas em quatro grupos principais, de acordo com os seus mecanismos catalíticos: endopeptidases serínicas, cisteínicas, aspárticas e metálicas. (tabela 2.2) Nestes grupos são reconhecidas seis famílias (tabela 2.3) que possuem um conjunto característico de resíduos de aminoácidos funcionais, agrupados numa configuração particular para formar o centro ativo (Neurath, 1990). As metaloproteases têm, tal como o nome indica, na sua estrutura um local de ligação a um ião metálico (Jiang e Bond, 1992).

Tabela 2.2 – Classificação das peptidases com base no tipo de reação catalisada^a

Grupo	Subsecção EC
Exopeptidases	
Aminopectidases	3.4.11
Ácido acilamino-hidrolases	3.4.12
Dipeptidil-peptidases, Tripeptidil-peptidases	3.4.14
Carboxipeptidases	3.4.16-18
Peptidil-dipeptidases	3.4.15
Dipeptidases	3.4.13
Omega peptidases	3.4.19
Endopeptidases	
Endopeptidases serínicas	3.4.21
Endopeptidases cisteínicas	3.4.22
Endopeptidases aspárticas	3.4.23
Endopeptidases metálicas	3.4.24
Endopeptidases treoninas	3.4.25
Endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

^aComité de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, "Enzyme Nomenclature 1992", Academic Press, Orlando, Florida, 1992.

Adaptado de Barrett (1994) e Brenda – The Enzyme Database (2014).

Tabela 2.3 – Família das enzimas proteolíticas

Família	Protease(s) representativa	Resíduo carcterístico do centro activo^a
Proteases serínicas I	Quimotripsina	
	Tripsina	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
	Elastase	
Proteases serínicas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Proteases cisteínicas	Papaína	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Proteases aspárticas	Penicilopepsina	Asp ³³ , Asp ²¹³
	Renina	
	Quimosina	
Metaloproteases I	Carboxipeptidase A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
Metaloproteases II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

^a O número de resíduos correspondente à sequência de aminoácidos das enzimas listadas a negrito. Adaptado de Neurath, 1990

Proteases serínicas

Esta classe inclui duas famílias distintas: as proteases serínicas provenientes de mamíferos (por exemplo: quimotripsina (EC 3.4.21.1), tripsina (EC 3.4.21.4), elastase (EC 3.4.21.11) e as provenientes de bactérias (por exemplo: subtilisina (EC 3.4.21.14). Estas duas famílias diferem uma da outra na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, mas a geometria do seu centro ativo e o seu mecanismo catalítico é semelhante (Neurath, 1990). Estas proteases caracterizam-se pela presença de um resíduo de serina no centro ativo.

A atividade máxima deste tipo de proteases verifica-se, geralmente, para valores de pH ligeiramente alcalinos (Adler-Nissen, 1993) e apresentam pesos moleculares próximos de 25 kDa, podendo, no entanto, estes valores variar consideravelmente. Não há um só inibidor que reaja especificamente com todas as proteases serínicas. Todavia, pode ser conseguida uma inativação considerável por modificação irreversível do único resíduo de serina, usando diisopropilofosforidato (DFP), fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) ou ácido burónico e inativação irreversível utilizando clorometilacetonas que reagem com a histidina da tríade catalítica (Storey e Wagner, 1986). A 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI) apresenta também uma boa reatividade com uma série destas proteases. Este inibidor é relativamente não tóxico e reage mais rapidamente do que o DFP ou PMSF (Neurath, 1990).

Proteases cisteínicas

As proteases cisteínicas incluem as proteases vegetais como a papaína, actinidina ou bromelína, várias catépsinas lisossomais de mamíferos, proteases citosólicas ativadas pelo cálcio (calpaínas) e várias proteases de parasitas (Neurath, 1990). Estas enzimas caracterizam-se pela presença de um resíduo de cisteína ou histidina no centro ativo.

Geralmente, estas enzimas são ativadas somente na presença de condições redutoras. As proteases cisteínicas são ativadas na sua maioria a pH neutro, mas algumas que são encontradas em lisossomas têm pH ótimo na zona ácida. Outra característica é a inibição por agentes sulfidrílo como p-cloromercurilbenzoato-PMCB e iodoacetamida (Barrett, 1994).

Proteases aspárticas

As proteases aspárticas estão amplamente distribuídas nos seres vivos. Encontram-se nos vertebrados, fungos, plantas e mais recentemente foram detetadas em retrovírus (Davies 1990). Podem ser tanto como proteases digestivas, como a pepsina dos mamíferos, a ciprosina das plantas e a endotiapepsina dos fungos, como proteases lisossomais de que são exemplos as catépsinas D e E (Guruprasad *et al.*, 1995). A maioria apresenta atividade máxima a valores baixos de pH. O resíduo do ácido aspártico no centro ativo faz parte, em

qual, da tríada Asp-X-Gly em que X pode ser serina ou treonina e são inibidas por pepstatina (Barret, 1995, Rao *et al.*, 1998).

Metaloproteases

Este tipo de enzimas pode ser encontrado em bactérias, fungos e animais superiores. Estas proteases diferem muito nas sequências de aminoácidos e nas suas estruturas, mas a grande maioria possui um átomo de zinco que é cataliticamente ativo. Em alguns casos, este metal pode ser substituído por cobalto ou por níquel, sem que a enzima perca atividade proteolítica (Choplin, 2001).

Este tipo de enzimas apresenta um máximo de atividade próximo de pH 7,0. Os inibidores das metaloproteases, incluem, obviamente, agentes quelantes de metais e, em particular, os que apresentam elevada afinidade para o zinco. A 1,10-fenantrolina é, em geral, mais eficaz do que o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ditioneitol (DTT) parece tratar-se também de um inibidor potente (Barrett, 1986).

Atualmente podemos pesquisar facilmente uma enzima através da internet, permitindo descobrir várias bases de dados sobre enzimas das quais se salienta a Brenda – The Enzyme Database - a maior base de dados pública sobre enzimas que continha, em 2013, cerca de 6130 entradas sobre as seis principais classes de enzimas e 560 entradas sobre proteases.

2.2.2 Funções fisiológicas das proteases

As proteases têm uma variedade enorme de funções fisiológicas de grande complexidade. São importantes na manutenção e regulação de várias vias metabólicas e, por isso estão presentes em todos os seres vivos. As proteases, principalmente intracelulares, apresentam-se como ponto chave nos processos de coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, organização de tecidos, morfogénese e desenvolvimento, inflamação, crescimento tumoral e metástase, ativação de zimogénios, libertação de hormonas e precursores proteicos, morte celular programada e transporte de proteínas através da membrana. A função das peptidases extracelulares, está quase sempre associada ao catabolismo, pois catalisam a hidrólise e despolimerização de grandes proteínas a peptídeos menores e aminoácidos, facilitando assim a absorção celular (Rao *et al.*, 1998).

2.2.3 Fontes de obtenção de enzimas proteolíticas

As plantas, os animais e os microrganismos são as principais fontes de obtenção de enzimas proteolíticas. As proteases originárias de plantas são dependentes de alguns fatores, como a disponibilidade de uma grande área para o cultivo e das condições climáticas para o crescimento ótimo. Além disso, o processo de obtenção de proteases a partir de plantas é bastante moroso, devido ao período de espera para o total desenvolvimento de uma planta saudável. Exemplos de proteases originárias de plantas são a papaína, bromelína, queratinases e ficinas (Rao *et al.*, 1998).

As proteases originárias de animais são preparadas em grandes quantidades. A sua produção depende geralmente da disponibilidade do animal para o abate, no que se torna num processo bastante dispendioso. As principais proteases de origem animal são tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e quimosina (Rao *et al.*, 1998).

Devido à sua ampla diversidade bioquímica a principal fonte de proteases é de origem microbiana constituindo 40% do total das proteases comercializadas. De uma maneira geral, os microrganismos são preferidos em relação a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço para o seu cultivo (Rao *et al.*, 1998) e à grande variedade de atividades catalíticas de que dispõem. Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1991).

2.3 Proteases bacterianas

A maioria das proteases comerciais são produzidas por organismos que pertencem ao género *Bacillus*. Para as espécies de *Bacillus*, a produção de proteases é bastante influenciada por fatores específicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de iões metálicos (Nehete *et al.*, 1985, Johnvesly e Naik, 2001). O meio de cultura de cultura utilizado para o cultivo das proteases deve conter uma fonte de carbono, uma fonte de azoto e alguns fatores necessários ao melhor desenvolvimento da estirpe.

As proteases alcalinas de origem bacteriana são as mais comercializadas, devido à sua elevada atividade catalítica. São caracterizadas por terem uma atividade ótima a um pH de 10 e a cerca de 60 °C e elevada especificidade pelo substrato. As propriedades destas proteases permitem a sua utilização preferencial na indústria de detergentes (Rao *et al.*, 1998; Joo e Chang, 2006). As proteases neutras de origem bacteriana são ativadas numa faixa de pH de 5 a 8 com uma termotolerância limitada e são caracterizadas por apresentarem uma elevada afinidade para aminoácidos hidrofóbicos

Frankena *et al.* (1985) mostrou que existe uma ligação entre a síntese da enzima e o metabolismo energético nos *Bacillus*, quando houve o controle da temperatura e do oxigênio. As temperaturas ótimas para produção de proteases por alguns microrganismos estão mencionadas na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Alguns microrganismos produtores de proteases e suas temperaturas ótimas de produção máxima.

Temperatura ótima (°C)	microrganismo	Referência
30	<i>Bacillus</i> sp. B21-2	Fujiwara, N. e Yamamoto, K., 1987
	<i>Streptomyces diastaticus</i>	Chaphalkar S. e Dey, S., 1994.
32	<i>Aspergillus flavus</i>	Malathi, S. e Chakraborty, R., 1991
35	<i>Bacillus</i> sp. Y	Shimogaki, H. <i>et al.</i> , 1991
	<i>Bacillus</i> sp. MK5-6	Kumar, CG. <i>et al.</i> , 1997
36	<i>Bacillus licheniformis</i>	Mao, W. <i>et al.</i> , 1992
	<i>Bacillus</i> sp. strain GX6638	Durham, DR. <i>et al.</i> , 1987
	<i>Bacillus</i> sp. no. AH-101	Takami, H. <i>et al.</i> , 1989
37	<i>Bacillus alcalophilus</i> subsp. halodurans KP1239	Takii, Y. <i>et al.</i> , 1990
	<i>Bacillus firmus</i>	Moon, SH. e Parulekar, SJ, 1991.
39,5	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hübner, U. <i>et al.</i> , 1993
40	<i>Bacillus</i> sp. strain B189	Fujiwara, N. <i>et al.</i> , 1993
45	<i>Bacillus thermoruber</i> BT2T	Manachini, PL. <i>et al.</i> , 1988
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sen, S. e Satyanarayana, T., 1993
52	<i>Thermoactinomyces</i> sp. HS682	Tsuchiya, K. <i>et al.</i> , 1992
55	<i>Bacillus stearothermophilus</i> AP-4	Dhandapani, R. e Vijayaragavan, R., 1994
60	<i>Bacillus stearothermophilus</i> F1	Rahman, RNZA. <i>et al.</i> , 1994

Fonte: Kumar e Takagi (1999)

2.3.1 Microrganismos

A utilização de microrganismos para produção de enzimas apresenta várias vantagens nos processos biotecnológicos, nomeadamente (Smith, 2004):

- não existem variações sazonais devido a condições climáticas adversas;
- existe uma elevada produção de enzimas com características muito diferentes;
- fácil manipulação fisiológica;
- otimização de seleção de mutantes.

Por sua vez, os microrganismos marinhos têm despertado especial atenção (Baharum *et al.*, 2010) em virtude das suas propriedades únicas, uma vez que, estão adaptados a ambientes muito diversificados que incluem condições extremas de temperatura, salinidade, pressão, pH e disponibilidade de nutrientes. As enzimas produzidas por microrganismos marinhos podem proporcionar inúmeras vantagens em relação às enzimas tradicionais. Apesar destas vantagens, sabe-se que um único microrganismo pode produzir várias enzimas e, assim a presença de enzimas contaminantes pode produzir reações indesejáveis, requerendo métodos de purificação ou inativação diferencial para separá-las (Said e Pietro, 2002).

Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é definido como o aumento coordenado de todos os constituintes celulares (por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos). Este aumento está normalmente associado ao aumento do número de células em consequência da multiplicação celular. É definido como o crescimento dum população de células dum microrganismo, ou seja, o aumento do número de células do microrganismo ao longo do tempo. É normalmente quantificado em termos do aumento no tempo de:

(i) nº de células; (ii) densidade ótica da cultura; ou, (iii) massa celular (biomassa).

Considerando um meio adequado em termos de fonte de energia, nutrientes, condições físicas e químicas favoráveis, o crescimento dos microrganismos é dado pela representação gráfica do Log (ufc/ml) em função do tempo, e este é geralmente caracterizado por 4 fases distintas (Figura 2.4).

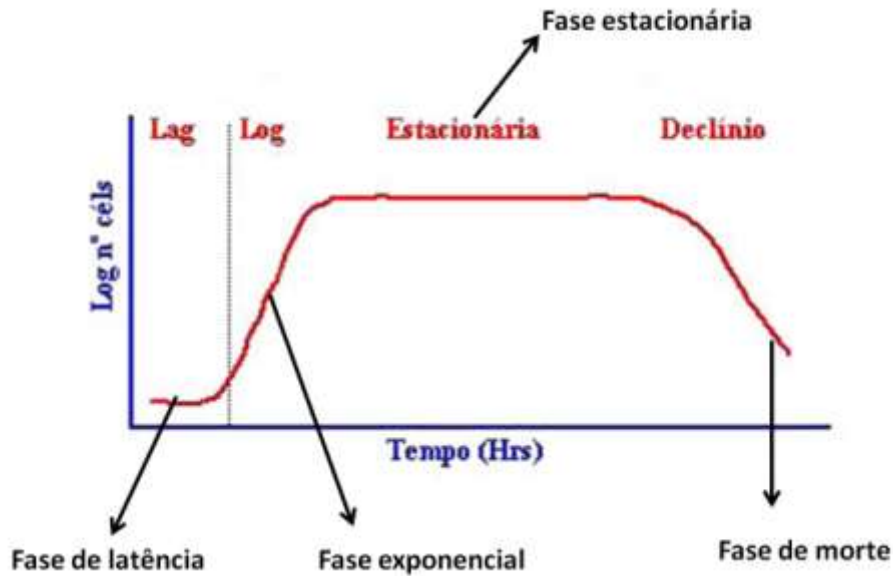


Figura 2.4 - Curva de crescimento duma população microbiana. (Prescott, Harley & Klein, Microbiology, th edition, Mc GrawHill, 2002).

Fase de latência (ou “lag”): Durante o período de tempo que se segue à inoculação do meio de cultura, as células do microrganismo têm normalmente que se adaptar ao novo meio. Durante este período verifica-se, por exemplo, a síntese de novas enzimas. Estas podem ser necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento e que não se encontrem presentes no meio de cultura ou para a hidrólise ou metabolização dos compostos presentes e que são as únicas fontes de carbono, azoto, etc, a que o organismo não se encontra adaptado.

Fase exponencial (ou “log”): Após um curto período de aceleração, a taxa de crescimento da população microbiana torna-se constante, isto é, as células sofrem divisão e o seu número duplica após um determinado intervalo de tempo. Durante esta fase, em que todos os nutrientes estão presentes em excesso, os microrganismos dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento máxima que depende do potencial genético do microrganismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.).

Fase estacionária: Na fase estacionária o esgotamento de um nutriente essencial e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva a que divisão da população pare. No entanto, em carência de nutrientes, as células podem manter-se viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos, à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção. Contudo, mais cedo ou mais tarde, verifica-se um declínio da concentração de células viáveis durante a fase de morte celular.

Fase de morte: Durante a fase de morte ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular (morte celular). Tal origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana ao longo do tempo.

O crescimento bacteriano é afetado por vários fatores como a temperatura, quantidade de água, disponibilidade ou não de oxigênio, pH do meio e disponibilidade de nutrientes. As bactérias precisam de nutrientes para o seu crescimento, muitas vezes utilizando compostos orgânicos como fontes de carbono e de energia. Estes compostos devem ser solúveis em água e de baixo peso molecular, para serem capazes de passar através da membrana celular (Estevinho, 2007).

2.4 Fatores que influenciam a atividade enzimática

2.4.1 Temperatura

A produção de enzimas depende da temperatura, mas nem sempre a temperatura ótima de síntese de uma determinada enzima coincide com a temperatura ótima de crescimento do microrganismo. É preciso considerar ainda que a temperatura ótima de atividade enzimática pode diferir da temperatura ótima de crescimento do microrganismo e daquela síntese enzimática (Said e Pietro, 2002).

As reações químicas são afetadas pela temperatura. Alterações de temperatura afetam as reações enzimáticas de várias formas, por exemplo, alterando a estabilidade da enzima, o pH da solução tampão, a afinidade da enzima para inibidores, a taxa de ocorrência de reações competitivas, a afinidade enzima-substrato, a velocidade de quebra do complexo enzima-substrato, entre outras. As enzimas apresentam uma temperatura ótima de atuação, em que a sua atividade é máxima, sendo reduzida quando a temperatura se afasta desse valor. A temperaturas muito superiores ao ótimo, as enzimas sofrem desnaturação porque as ligações intramoleculares são afetadas, corrompendo a sua conformação espacial (Weil J., 2000).

2.4.2 pH

As enzimas contém grupos ionizáveis, e portanto, o pH do meio de cultura afeta a sua estrutura e função. O crescimento de células microbianas também é influenciado pelo pH, uma vez que, a síntese dos constituintes básicos do desenvolvimento celular depende de iões. Assim como para a temperatura, o pH ótimo de crescimento celular e de produção podem diferir (Said e Pietro, 2002).

O pH pode-se considerar um dos grandes fatores que afetam a atividade enzimática uma vez que as enzimas, sendo proteínas, são constituídas por sequências específicas de aminoácidos, unidos entre si por ligações peptídicas, em que alguns dos monómeros possuem grupos laterais básicos ou ácidos. Assim, as enzimas contêm, sob qualquer microambiente, grupos carregados negativamente e outros positivamente para um dado pH. Alguns destes grupos ionizáveis afetam a capacidade catalítica da enzima, ou porque fazem parte do seu sítio ativo, ou porque interferem com a arquitetura tridimensional deste, pelo que cada enzima apresenta um pH ótimo de funcionamento. À medida que o pH se afasta desse valor, a atividade da enzima diminui, podendo, em condições extremas, ocorrer desnaturação da enzima, ou seja, destruição da sua estrutura secundária, terciária e/ou quaternária (Weil J., 2000).

2.4.3 Inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos são compostos que podem diminuir a atividade de uma enzima, atuando como reguladores das vias metabólicas.

Os processos enzimáticos são influenciados por inibidores (qualquer agente químico cuja presença reduza a atividade de uma enzima), pelo pH e pela temperatura. Os inibidores podem atuar de várias formas, durante o processo enzimático, e são muitos os inibidores enzimáticos conhecidos, pelo que, sempre que possível, devem ser criadas condições para que a sua presença seja evitada, de forma a maximizar a prestação catalítica das enzimas (Macedo *et al.*, 2003).

A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível. Existem dois tipos de inibição enzimática reversível:

Inibição reversível competitiva

Quando o inibidor se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação do substrato, o efeito é revertido aumentando-se a concentração de substrato. Este tipo de inibição depende das concentrações de substrato e inibidor.

Inibição reversível não competitiva

Quando o inibidor se liga reversivelmente à enzima num sítio próprio de ligação, podendo estar ligado à mesma ao mesmo tempo que o substrato. Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor. Na inibição irreversível há modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou no sítio catalítico da enzima.

Inibição Irreversível

Quando o inibidor e o substrato se ligam a locais distintos da enzima. A ligação do inibidor não impede a ligação de substrato e vice-versa. A ligação do inibidor provoca alterações na conformação do centro ativo.

Os inibidores de proteases estão presentes em tecidos vegetais e animais. O interesse em estudar suas funções fisiológicas é devido à sua importância na regulação de diferentes processos nas quais as proteases estão envolvidas, desde a lise de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, apoptose, entre outras (Salvesen e Nagase, 1989; Fumagalli *et al.*, 1996; Kato, 1999).

2.4.4 Estabilidade enzimática

As enzimas geralmente perdem atividade ao longo do tempo, à medida que as moléculas proteicas que as constituem vão sofrendo alterações que gradualmente diminuem o teor de enzima ativa. Assim, uma dada preparação enzimática pode ter uma atividade num dado momento e mantida nas mesmas condições, vai perdendo esta atividade. Quanto mais lenta essa perda de atividade mais estável é a enzima.

A perda de atividade enzimática depende das condições de incubação da preparação enzimática.

Os mecanismos que levam à perda de atividade podem ser vários (Barros, 2012):

- Desnaturação térmica das proteínas;
- Oxidação;
- Proteólise;
- Outras reações com compostos do meio.

2.5 Aplicações das proteases

As proteases possuem uma enorme variedade de aplicações, principalmente nas indústrias farmacêutica, de detergentes, alimentar e no desenvolvimento de tecnologias menos agressivas para o ambiente. As proteases são um dos ingredientes padrão adicionado a todos os detergentes, principalmente por causa da especificidade para alguns substratos constituintes do material a ser removido. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. Outra aplicação que vem despertando bastante interesse é a substituição de compostos químicos na indústria e a utilização em processos de tratamentos de resíduos industriais, além da grande utilização de proteases na pesquisa científica (Rao *et al.*, 1998).

2.5.1 Proteases na indústria de alimentos

Panificação

A farinha de trigo é o principal componente dos processos de panificação e contém uma proteína insolúvel, o glúten, que determina as propriedades das massas. Endo e exopeptidases de *Aspergillus oryzae* têm sido usadas para modificar o glúten através de proteólise limitada. O tratamento enzimático da massa facilita o seu manuseio e permite a produção de uma ampla variedade de produtos. A adição de proteases reduz o tempo de mistura e resulta em pães com volumes maiores (Rao *et al.*, 1998).

De acordo com Schmidell *et al.* (2001), especificamente para *crackers*, utiliza-se proteases de origem fúngica e bacteriana. Essas proteases conferem à massa força e extensibilidade adequadas, permitindo uma laminação sem fraturas, e com espessura conveniente para a correta tostagem do material durante o forneamento.

Carnes

As enzimas que assumem um papel fundamental no amaciamento da carne são proteases de origem vegetal ou de microrganismos (*Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae*) (Cabra e Sánchez, 1997).

O processo de amaciamento dá-se através do polvilhamento de uma preparação enzimática ou da imersão do produto numa solução enzimática e/ou injetando a preparação concentrada de proteases na própria carne do animal antes do abate (Kumar e Takagi, 1999).

Laticínios

Na área dos laticínios, as proteases são aplicadas na coagulação do leite na produção e na maturação do queijo. Diversas são as proteases que induzem essa coagulação, podendo estas ter origem animal, microbiana ou vegetal (o caso das cardosinas, usadas no fabrico do queijo da Serra, em Portugal). O aumento do número de vegetarianos é uma das causas para o interesse dos produtores na utilização de proteases microbianas (Cabral *et al.*, 2003)

No leite, a utilização de enzimas proteolíticas pode originar a quebra de ligações peptídicas e alterações na conformação molecular das proteínas, resultando péptidos com propriedades funcionais e tecnológicas que permitem a criação de muitos segmentos de produtos (Nakai e Li-Chan, 1989). O grande problema na utilização da proteólise em algumas proteínas (incluindo as caseínas) para o desenvolvimento e melhoramento dos produtos lácteos, é a alteração das características organolépticas dos mesmos, como por exemplo a formação de péptidos com um sabor mais amargo, particularmente durante o

processo de cura dos queijos (Nakai e Li-Chan, 1989; Medeiros *et al.*, 2009). Um extrato enzimático com poder coagulante do leite já produzido industrialmente é o proveniente do fungo *Aspergillus niger* var. *awamori* (Neves-Souza, 2005).

Outras aplicações

Podem estar presentes também no fabrico de cervejas através da hidrólise da proteína do malte (complementação e/ou substituição do malte de cevada), solubilização das proteínas para o lêvedo e na prevenção da turbidez da cerveja. Também são aplicadas na produção de hidrolisados funcionais, no fabrico de adoçantes artificiais, como aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (Rao *et al.*, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As bactérias foram isoladas no laboratório de microbiologia do Instituto Português do Mar e da Atmosfera – IPMA, de bivalves anteriormente capturados e armazenadas em missangas e mantidas congeladas a -30°C até à sua utilização.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação da estirpe N

A missanga foi retirada do congelador e colocada no meio líquido chamado *brain heart infusion* (BHI) de utilização geral para cultura de várias estirpes de bactérias, durante 24 h a 30°C , numa incubadora orbital AGITORB 200 IC (ARALAB - Portugal).

O BHI é um meio de cultura nutritivo, tamponado, que contém infusões de tecido cerebral e cardíaco e peptonas para fornecer proteínas e outros nutrientes necessários para sustentar o crescimento de microrganismos exigentes e não exigentes.

Após 24 h, plaqueou-se a cultura com uma ansa para placas contendo meio trypticase soy agar (TSA), com o objetivo de se obter uma cultura fresca e com colónias isoladas (Fig. 3.1) colocando-se numa estufa de incubação MEMMERT B 60 (Alemanha) a 30°C , durante 24 h.



Figura 3.1 - Fotografia da colónia de 24 horas.

3.2.2 Meios de cultura

Foram utilizados vários meios de cultura constituídos por peptona bacteriológica (1 % BB, 2 % BB e 4 % BB), açúcar (0,5 % sacarose e 0,5 % glucose) e extrato de levedura (0,5 % YE). Os meios de cultura, após a sua preparação, foram autoclavados numa autoclave MLS – 3020 (Japão) a 121 °C, durante 15 min.

3.2.3 Crescimento e caracterização preliminar da estirpe bacteriana

3.2.3.1 Ensaio microbiológico em tubos de ensaio

Numa câmara de segurança biológica “EHRET” BIOSAFE 2, procedeu-se à transferência do inóculo para um tubo com soro fisiológico usando uma ansa. A turbidez da solução foi avaliada com o colorímetro Vitek DR100 (Hach Company, Loveland, Colorado, USA), procurando obter um valor de 1,0 na escala de McFarland. Seguidamente, inoculou-se 10 µl para tubos de ensaio, contendo 10 ml do meio de cultura. Os tubos foram incubados a cerca de 30 °C, colocando-os numa incubadora orbital.

3.2.3.2 Ensaio microbiológico em frascos de Erlenmeyer

Nos ensaios em frascos de Erlenmeyer procedeu-se tal como anteriormente descrito, mas inoculando 250 µl em 250 ml do meio de cultura.

3.2.3.3 Determinação do número de células viáveis

A contagem do número de unidades formadoras de colónias por ml (ufc/ml) foi realizada segundo modificação do método de Milles e Misra (1983). Ao fim de cada tempo de amostragem (0, 6, 22, 26, 30, 46 e 50 h), efetuou-se uma suspensão bacterina na qual foi diluída em séries de 3 ou 9 vezes com solução de soro fisiológico em tubos de ensaio sucessivamente até 10^3 ou 10^7 . As amostras foram homogeneizadas em vórtex e aplicados 0,1 ml em placas de plate count ágar (PCA). As placas foram à estufa de incubação Memmert B 60 (Alemanha) a 30 °C, durante 48 h. A contagem foi efetuada e os resultados foram expressos em log ufc/ml.

3.2.3.4 Preparação do extrato enzimático

Após cada tempo de amostragem efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro de Absorção UV/Vix de Duplo Feixo Unican (Portugal). De seguida, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm, durante 5 min, numa centrifugadora KUBOTA 6800 (Japão). Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e filtrou-se por um filtro Millipore de diâmetro 0,45 µm.

O extrato obtido das culturas bacterianas em tubo de ensaio foi utilizado na determinação da atividade enzimática com isotiocianato de caseína.

O extrato resultante da cultura bacteriana nos frascos de Erlenmeyer foi distribuído por diferentes tubos com cerca de 10 ml, os quais foram armazenados a -20 °C para posterior caracterização da enzima.

3.2.3.5 Preparação do isotiocianato de caseína

Dissolveu-se 1g de caseína em 100 ml de tampão carbonato 50 mM, pH 9,5, contendo NaCl 150 mM. Em seguida, adicionaram-se 40 mg de FITC, obtendo-se uma solução de cor alaranjada que foi mantida durante 3 h sob agitação, à temperatura ambiente.

Os grupos de FITC que não reagiram e permaneceram livres foram removidos através de quatro diálises: duas contra uma suspensão de carvão ativado, seguida de uma contra tampão Tris 50 mM, pH 8,5 e, por último contra tampão Tris 50 mM, pH 7,2. Todas as diálises foram realizadas a 4 °C, sob agitação durante a noite. A concentração de proteína foi ajustada a 0,5 % pela adição de tampão Tris 50 mM, pH 7,2, até um volume final de 200 ml.

A solução foi depois distribuída por tubos de Eppendorf e armazenados a -20 °C, até posterior utilização.

3.2.3.6 Determinação da atividade enzimática nos extratos obtidos nas culturas em tubo de ensaio

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método de Twining (1984), utilizando como substrato a caseína derivatizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1 %.

O FITC é considerado um bom marcador para as proteínas, porque é altamente fluorescente e porque reage facilmente com grupos amina da maioria das proteínas, através de uma reação simples, para se obter o tiocarbamoilo de fluoresceína (FTC).

Com a caseína forma o complexo FTC – caseína que é um bom substrato para muitas proteases, porque é uma proteína solúvel, muito semelhante a substratos fisiológicos, de fácil preparo, estável durante o armazenamento e barato. (Twining, 1984).

Num tubo de Eppendorf de 1,5 ml adicionaram-se 30 µl de tampão tris 100 mM, pH 7,8, 10 µl de substrato e 10 µl de extrato enzimático. Após agitação, a mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min.

Após os 30 min, de modo a parar a reação e a precipitar a caseína que não reagiu, adicionaram-se 120 µl de ácido tricloroacético (TCA) 5 % (p/v) e a mistura foi centrifugada a 10000 rpm, durante 5 min, numa centrífuga de bancada SIGMA 2K 15 (Portugal).

Retiraram-se 100 µl do sobrenadante aos quais se adicionaram 2,9 ml de Tris –HCL 500 mM, pH 8,5 em tubos de ensaio.

Em paralelo foram preparados dois brancos nos quais o extrato enzimático foi substituído por igual volume de tampão citrato 0,2 M, pH 5,1:

B⁻ : Branco 0 % que corresponde à fluorescência relativa aos grupos FITC livres que não foram removidos por diálise

B⁺ : branco 100 % que corresponde a 100 % de fluorescência relativa. Neste branco, adicionou-se igual volume de Tris 500 mM, pH 8.5 em vez de TCA.

Após agitação, realizou-se a leitura da fluorescência num espectrofluorímetro PERKIN ELMER LS 50B (UK), utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 495 nm e um comprimento de onda de emissão de 525 nm.

Neste caso a atividade enzimática (%) é definida como sendo o aumento de fluorescência relativa e é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Act. = \frac{fA - fB^-}{fB^+ - fB^-} \times 100$$

em que:

F_A – fluorescência da amostra

F_{B⁻} - fluorescência dos FITC livres que não se ligaram na preparação do substrato

F_{B⁺} - fluorescência dos FITC

Os ensaios foram realizados em quadruplicado.

3.2.3.7 Determinação da atividade Enzimática do extrato obtido na cultura em frasco de Erlenmeyer

A atividade proteolítica foi determinada de acordo com Whooley *et al.* (1983), com algumas modificações. A mistura da reação foi composta por 350 µl de azocaseína (Sigma) 0,5 % (p/v) em água destilada como substrato; 175 µl de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,5 e 175 µl de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 40°C e após 3 horas a reação foi interrompida pela adição de 700 µl de TCA 10 % e foi mantida durante 30 minutos em gelo. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, durante 5 min, numa centrífuga de bancada. Em simultâneo foi preparado um controlo em que o extrato enzimático e o TCA foram adicionados após o tempo de incubação. Retirou-se 1ml de sobrenadante, adicionou-se 1ml de NaOH 1M e fez-se a leitura da absorvância a 440 nm. Uma unidade de densidade ótica a 440 nm equivale a 320 µg/ml de azopéptidos solúveis em TCA.

$$\text{Atividade enzimática} = 320 \times \Delta A \text{ U}$$

3.2.4 Caracterização das enzimas produzidas

3.2.4.1 Determinação da temperatura ótima

Para a determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica, o extrato foi incubado a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65,70 e 75 °C durante 3 horas e a atividade medida tal como referido em 3.2.3.7.

Os valores da atividade a cada temperatura foram expressos como percentagem do máximo de atividade obtido.

A energia de actvção foi determinada pela representação gráfica do logaritmo da atividade enzimática em função de 1/T (representação de Arrhenius).

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T}$$

Em que:

K – atividade enzimática (µg/ml)

A – fator de frequência

Ea - energia de ativação (cal/mol)

R - constante dos gases ideais (1,987 cal/ mol)

T - temperatura (K)

3.2.4.2 Determinação do pH ótimo

Na determinação do pH ótimo, o extrato foi incubado a diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampão 0,1M: acetato (pH 4,6 a 5,6); fosfato de sódio (pH 5,7 a 7,7); tris-HCl (pH 7,2 a 9) e glicina (pH 8,6 a 10,6). A atividade foi medida tal como descrito em 3.2.3.7.

Os valores da atividade a cada valor de pH foram expressos como percentagem do máximo de atividade obtido.

3.2.4.3 Estabilidade em função da temperatura

A estabilidade térmica da enzima foi determinada, procedendo-se à pré-incubação do extrato a diferentes temperaturas: 40, 50 e 60 °C. Em cada ensaio, recolheram-se alíquotas ao fim de 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 720, 900, 1080 e 1260 min, determinando-se, em seguida, a atividade proteolítica como descrito em 3.2.3.7. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Os resultados foram expressos como percentagem da atividade inicial da enzima.

3.2.4.4 Estabilidade em função do pH

Para a determinação da estabilidade da enzima em função do pH, o extrato foi misturado na proporção de 0,3:1,5 às seguintes soluções tampão com a concentração 0,1M: acetato (pH 3,6 a 5,6); fosfato de sódio (pH 6 a 8); tris-HCl (pH 8,6 e 9) e glicina (pH 9,6 a 10,6). As diferentes misturas foram mantidas à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, procedeu-se à medição da atividade enzimática como descrito em 3.2.3.7, nas condições ótimas de pH.

Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Os resultados foram expressos como percentagem da atividade inicial da enzima.

3.2.4.5 Ensaio de inibição

Na tentativa de identificar o tipo de protease em estudo, foram realizados ensaios com vários inibidores de proteases.

Os inibidores e as concentrações utilizadas (tabela 3.1) foram selecionados de acordo com Beynon e Salvesen (1994).

Tabela 3.1 – Inibidores e respetivas concentrações utilizadas nos ensaios de inibição.

Inibidor	Classe	Concentração (mM)	Solvente
EDTA	Metalo	10	Água
Fenantrolina	Metalo	10	Metanol
Iodoacetamida	Cisteína	10	Água
Pepstatina	Aspártica	10	Metanol
Inibidor da Tripsina	Serínica	10	Água

As misturas contendo 175 µl de extrato, 175 µl de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5 ou tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 e 100 µl de inibidor foram incubadas durante 10 min a 40 °C. Após este período, adicionou-se o substrato e procedeu-se à determinação da atividade enzimática como descrito em 3.2.3.7.

Foi realizado um ensaio controlo em que a solução do inibidor foi substituída pelo respetivo solvente.

Cada ensaio foi realizado em triplicado. A inibição da atividade proteolítica foi expressa em percentagem da atividade da amostra incubada sem inibidor.

3.2.4.6 Efeito dos catiões

Para estudar o efeito de vários catiões na atividade da protease, foram testados os seguintes sais: CaCl_2 , NaCl , KCl , MgCl_2 , BaCl_2 , LiCl . Estes sais foram solubilizados no tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5 e Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 numa concentração de 10 mM e a atividade enzimática foi determinada tal como descrito em 3.2.3.7.

O efeito dos catiões na atividade enzimática foi expressa em percentagem da atividade da enzima na ausência de catião.

3.2.5 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado no software Statistica, vers. 7.0, Stat Soft. Os resultados foram tratados através da análise de variância – ANOVA e a verificação dos pressupostos deste teste, normalidade e homogeneidade de variância, foi efetuada através da aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene. Na comparação múltipla aplicaram-se os testes de Dunnett e de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento e caracterização preliminar da estirpe

4.1.1 Crescimento da estirpe

A figura 4.1 apresenta o crescimento bacteriano ao longo do tempo de incubação.

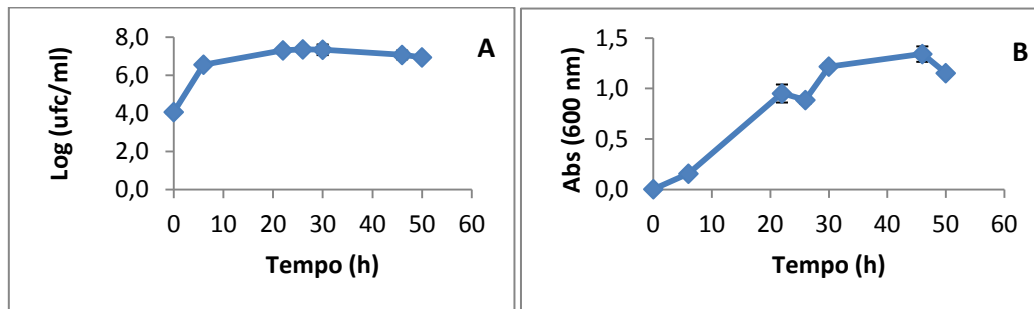


Figura 4.1 – Crescimento celular da estirpe durante 50 h de incubação (A – Contagens; B – densidade ótica)

Na figura 4.1A está representada a curva de crescimento obtida a partir das contagens das colônias, verificando-se um aumento do seu número de três unidades logarítmicas até às 26 h. Até ao final do crescimento o número manteve-se praticamente constante.

A evolução do crescimento seguida pela medição da densidade ótica (Fig. 4.1B) apresenta uma evolução diferente com um máximo após 46 h de crescimento. Embora esta evolução se aproxime mais da forma típica do crescimento bacteriano, a apresentada na figura 4.1A é mais fiável dado que representa efetivamente o número de bactérias viáveis presentes no meio. A curva apresentada na figura 4.1B, pode apresentar erros de leitura da absorvância, visto os tubos de ensaio conterem material em suspensão ou depositado no fundo, a quando da medição.

4.1.2 Atividade enzimática do extrato

A figura 4.2 representa a evolução da atividade enzimática no extrato, ao longo das 50 horas de incubação.

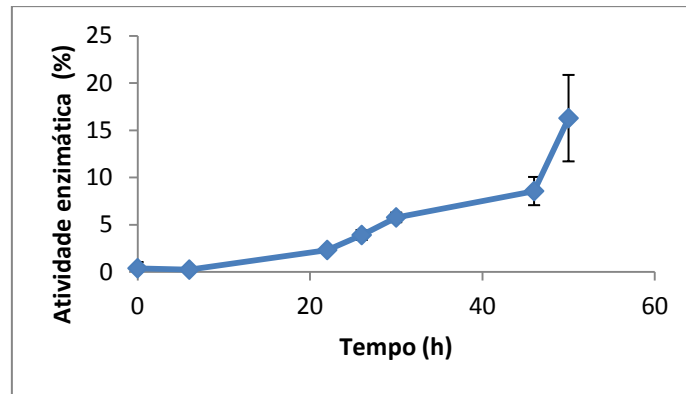


Figura 4.2 – Atividade enzimática do extrato durante 50 h de incubação

A estirpe apresenta um aumento contínuo da atividade enzimática durante as 50 h de incubação. O máximo da atividade enzimática do extrato, foi atingido às 50 h e apresenta um valor de aproximadamente 16 %.

4.1.3 Efeito do tipo de açúcar e da concentração de peptona bacteriológica na produção de protease

4.1.3.1 Efeito do tipo de açúcar

Nos ensaios realizados avaliou-se o efeito de glucose e de sacarose no crescimento e na atividade enzimática da estirpe bacteriana em estudo, apresentando-se os resultados na Tabela 4.3. Conforme se pode verificar, o crescimento bacteriano foi significativamente mais baixo ($p < 0,05$) no meio de cultura em que se utilizou glucose. Lee *et al.* (2010) obtiveram também maiores crescimentos de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53, uma bactéria isolada de água do mar, em meios de cultura com sacarose em comparação com meios com glucose.

No meio de cultura com sacarose registou-se também um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade enzimática (Tabela 4.3).

Tabela 4.1 – Efeito do tipo de açúcar no crescimento bacteriano e na atividade enzimática. Valores na mesma coluna com letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

	Sacarose	Glucose
Absorvância (600 nm)	0,914 ± 0,14 ^a	0,804 ± 0,01 ^b
Contagens (Med Log ufc/ml)	6,95 ± 0,58 ^a	6,49 ± 0,0 ^b
Atividade enzimática (%)	12,58 ± 2,44 ^a	1,20 ± 0,49 ^b

4.1.3.2 Efeito da concentração de peptona bacteriológica (BB) no crescimento microbiano

O efeito da concentração de peptona bacteriológica pode observar-se na figura 4.3.

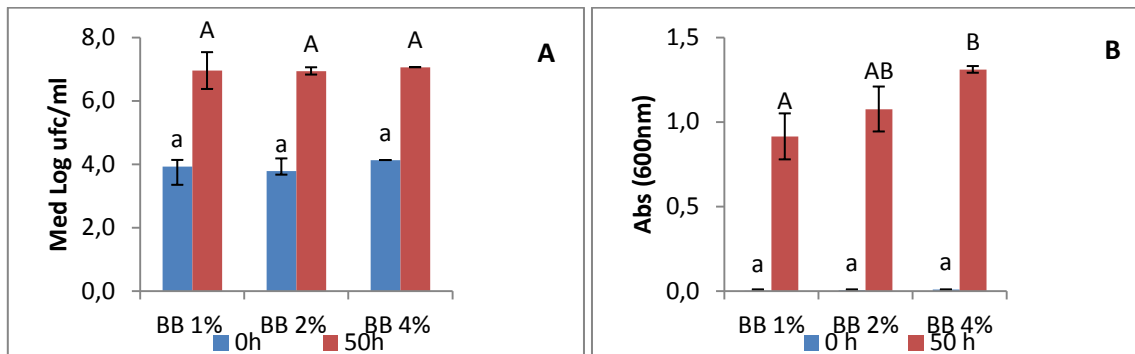


Figura 4.3 – Crescimento celular da estirpe em função da concentração de substrato. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

(A - contagens; B – densidade ótica)

Em todos os ensaios houve um crescimento bacteriano após 50 h de incubação, sendo os valores iniciais iguais entre eles (cerca de 10^4 ufc/ml). Após 50 h, os resultados do crescimento bacteriano obtidos por espectrofotometria indicavam um crescimento significativamente ($p < 0,05$) mais elevado no meio de cultura com 4 % de peptona bacteriológica do que no meio com 1 %. Porém, não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas contagens bacterianas nos meios de cultura com as diferentes concentrações de peptona bacteriológica.

4.1.4 Efeito da concentração de BB na atividade enzimática

Considerando um tempo de incubação de 50 h, estudou-se o efeito de três concentrações de peptona bacteriológica na produção de enzimas. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4.4.

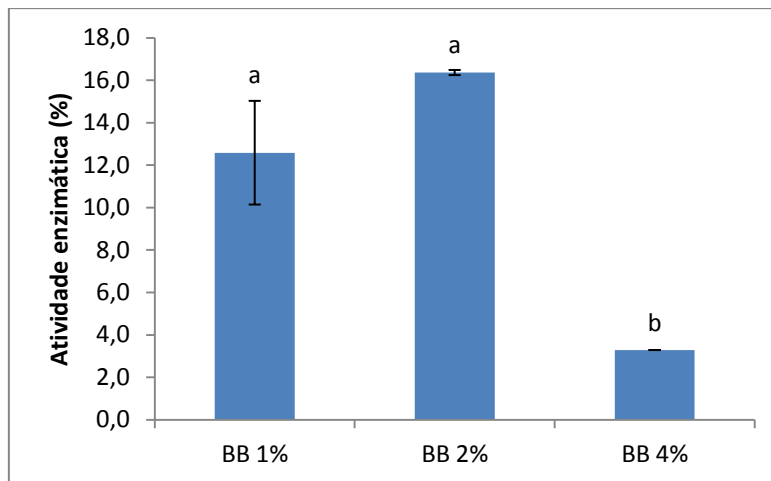


Figura 4.4 - Atividade enzimática do extrato em função da concentração de peptona bacteriológica após 50 h de incubação. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A atividade enzimática aumentou mas não de uma forma significativa no meio de cultura com 2 % de peptona bacteriológica em relação ao meio de cultura com menos peptona. No entanto, a atividade enzimática medida no meio com 4 % foi significativamente mais baixa ($p < 0,05$). Deste modo, torna-se notório que não é vantajoso utilizar concentrações desta peptona acima de 2 %.

4.2 Caracterização das enzimas produzidas

4.2.1 Determinação da temperatura ótima

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi realizado incubando, a diferentes temperaturas, o extrato enzimático (Fig. 4.5).

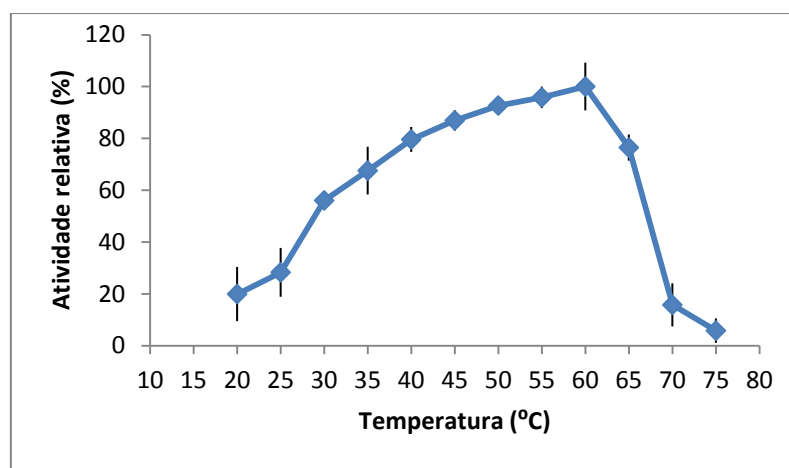


Figura 4.5 – Efeito da temperatura na atividade proteolítica presente no extrato.

A atividade máxima foi considerada 100 %.

A atividade proteolítica da enzima apresentou um máximo em torno de 60 °C. A 30 °C a enzima possuía mais de 50 % da atividade máxima. Por outro lado, quando o extrato era incubado a 65 °C apresentava ainda cerca de 76 % do valor da atividade máxima, mas sofria uma desnaturação acentuada quando era incubado a 70 °C, diminuindo a atividade para cerca de 16 % do valor máximo.

A subtilisina Calsberg, produzida por *Bacillus licheniformis*, e a subtilisina Novo ou “Bacterial Protease Nagase” (BPN), produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, são duas importantes proteases alcalinas utilizadas na indústria de detergentes, apresentando ambas temperaturas ótimas de 60 °C (Sehallmey *et al.*; Horikoshi, 1990). Por outro lado, Rahman *et al.* (1994) e Razak *et al.* (1997) verificaram que *Bacillus stearothermophilus* produzia proteases termoestáveis mas com um máximo de atividade a 85 °C. Jasvir *et al.* (1998) caracterizou também uma protease alcalina, com um ótimo a 60 °C, produzida por *Bacillus* sp. NG312 isolado do solo. No trabalho de Zhu *et al.* (2006), refere-se o estudo de protease produzida por *Geobacillus* sp. YMTC 1049, isolada do solo, que apresentava uma temperatura ótima a 85 °C. Também Vidyasagar *et al.* (2006) verificaram que uma protease extracelular produzida pela estirpe *Halogeometricum borinquense* TSS101 apresentava um máximo de atividade a 60 °C. Mais recentemente, Almas *et al.* (2009) verificaram que a estirpe *Bacillus* SAL1, isolada a partir de resíduos de curtumes, produzia uma protease com uma temperatura ótima a 60 °C. Emri *et al.* (2009) referiram também que uma protease fúngica extracelular produzida por *Aspergillus nidulans* apresentava uma temperatura ótima de 65 °C. Por sua vez, Silva *et al.* (2009) estudaram uma protease obtida pelo fungo *Gliocladium verticilloides*, produzido por fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais e verificaram que esta apresentava uma temperatura ótima em torno de 60-65°C.

A partir dos valores da atividade em função da temperatura calculou-se a energia de ativação que foi de 105 cal/mol (Figura 4.6).

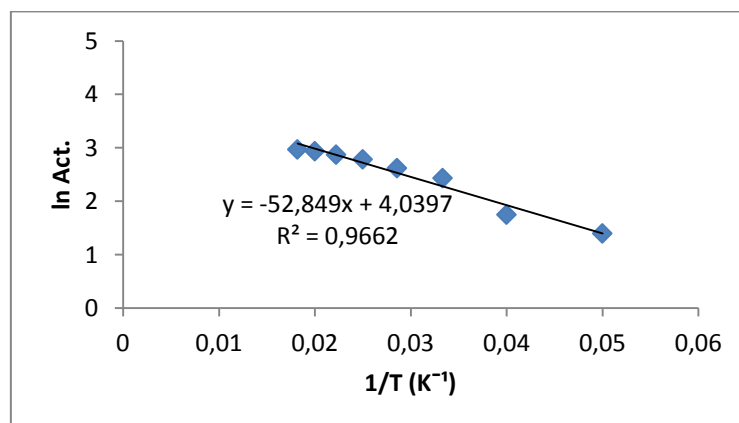


Figura 4.6 – Representação de Arrhenius para a enzima em estudo.

Secades e Guijarro (1999) referiram que a energia de ativação para a protease extracelular produzida por *Yersinia ruckeri* foi superior ($15,53 \pm 0,22$ kcal/ mol) relativamente à obtida no presente estudo. O mesmo se verificou com outra protease produzida por *Flavobacterium psychrophilum* ($5,58 \pm 0,09$ kcal/mol; Secades *et al.*, 2011).

4.2.2 Determinação do pH ótimo

O efeito do pH na atividade proteolítica das enzimas produzidas foi estudado tendo-se realizado ensaios com um tampão universal que contém citrato e fosfato entre outros constituintes. Os resultados obtidos foram inconclusivos parecendo mostrar que os tampões citrato e o fosfato interferem na reação enzimática.

A atividade da enzima em função do pH apresenta uma forma semelhante à de um sino (figura 4.7).

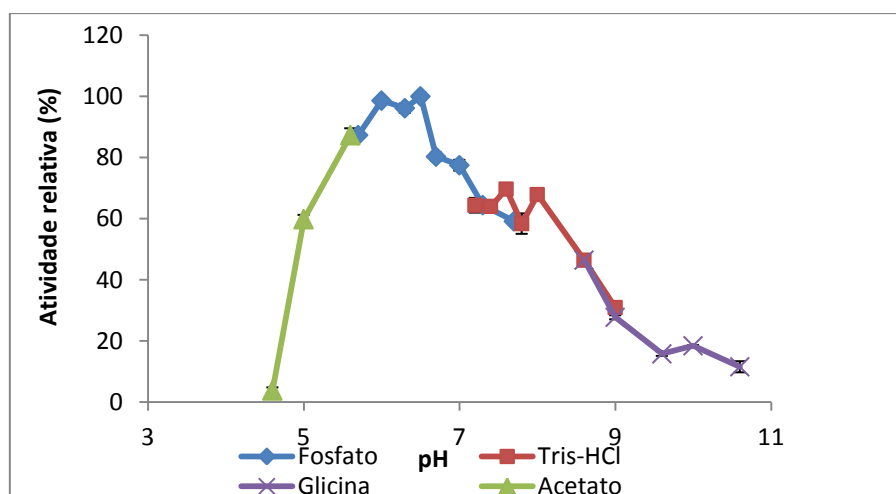


Figura 4.7 - Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da enzima.

A atividade máxima foi considerada 100 %.

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado na faixa de pH entre 4,6 e 10,6. A enzima apresenta um pH ótimo a 6,5, contudo após o decréscimo de atividade, parece ocorrer novamente um aumento de atividade a pH 7,6, levando a suspeitar que possa existir outro ótimo para a enzima.

A atividade diminui apreciavelmente nas gamas de pH abaixo de 5 e acima de 8, ao que este resultado permite classificar a protease como uma neutrase. As proteases neutras normalmente possuem uma gama de atividade de pH 6 a 8 (Rao *et al.*, 1998).

Resultados semelhantes foram verificados por Secades *et al.* (2001) com uma protease extracelular produzida por *Flavobacterium psychrophilum*, patogéneo que normalmente afeta os salmonídeos, que apresentava uma atividade proteolítica ótima a pH 6,5. Já Sousa *et al.* (2006) referem uma metaloprotease obtida a partir de *Bacillus cereus* que apresenta um pH ótimo a 7. Por outro lado, Zhu *et al.* (2006), indicam que uma protease produzida por *GeoBacillus* sp. YMTC 1049 isolada do solo, têm um pH ótimo a 7,5 e Emri *et al.* (2009), observaram que uma protease fúngica extracelular produzida por *Aspergillus nidulans* tinha um pH ótimo a 5,5. Também Silva *et al.* (2009) registaram um pH ótimo de 6,5 para uma protease obtida por *Gliocladium verticilloides*.

Os estudos seguintes foram realizados a pH 6,5 e 7,6, uma vez que os resultados obtidos na determinação do pH ótimo, parecem indicar a existência de dois ótimos de atividade.

4.2.3 Estabilidade em função da temperatura

A estabilidade térmica da enzima foi estudada, medindo a atividade residual após a pré-incubação da enzima durante diferentes períodos de tempo, a 40, 50 e 60 °C. Os resultados apresentam-se na figura 4.8 e 4.9

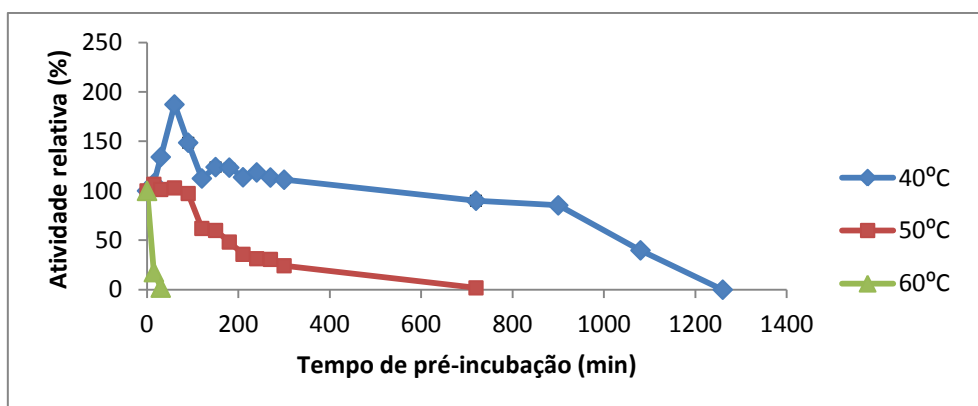


Figura 4.8 – Estabilidade térmica da enzima a pH 6,5.

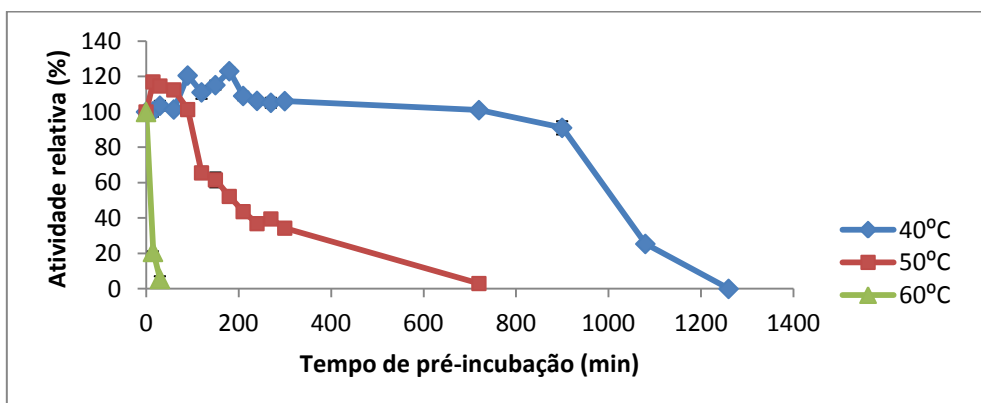


Figura 4.9 - Estabilidade térmica da enzima a pH 7,6.

A pH 6,5, a enzima é muito estável a 40 °C, mantendo valores de atividade perto de 100 % até cerca de 15 h. É ativada após 60 min de pré incubação.

A pH 7,6, a enzima apresenta-se também muito estável a 40 °C (aproximadamente 15 h), sendo ativada após 90 min de pré incubação.

Aquando da pré-incubação do extrato a 50 °C durante 180 min em ambos os valores de pH, a atividade desta enzima foi apenas reduzida para cerca de 50 % da atividade inicial. No entanto, não era estável a 60°C (temperatura ótima) a ambos os valores de pH, sendo rapidamente desnaturada, após 45 min de pré-incubação.

Gildberg (1988) refere que a estabilidade térmica das proteases está muito relacionada com a sua temperatura ótima a qual é, em geral, ligeiramente inferior à temperatura de desnaturação.

Em comparação à enzima em estudo, Jasvir *et al.* (1998) observaram uma protease alcalina com uma estabilidade térmica de 24 h a 50 °C e 40 min a 60 °C a pH 7 produzida por *Bacillus* sp. NG312 extraído do solo e Zhu *et al.* (2006) demonstraram que *GeoBacillus* sp. YMTC 1049 produz uma protease estável a 65 °C durante 10 h a pH 7,5.

A figura 4.10 apresenta a estabilidade térmica da enzima após pré-incubação durante 60 min, a diferentes temperaturas.

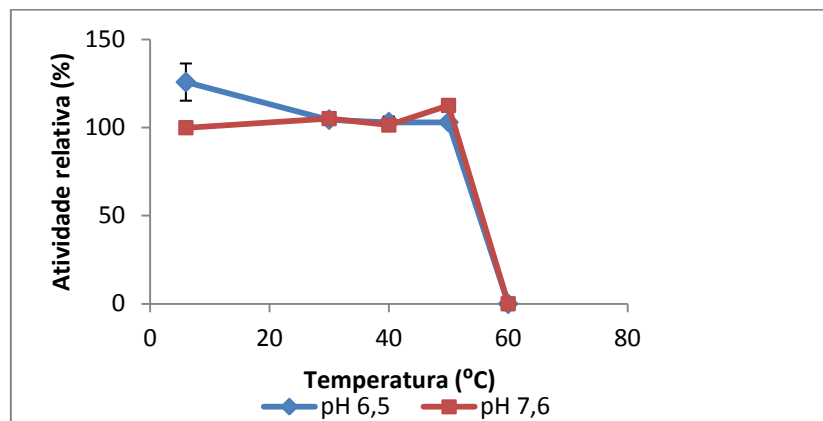


Figura 4.10 – Estabilidade térmica da enzima, após 60 min de pré-incubação a diferentes temperaturas. A atividade máxima foi considerada 100 %.

A elevada estabilidade térmica desta enzima a altas temperaturas está bem patente pois: após 60 min a 50 °C, a atividade proteolítica ainda se mantinha praticamente constante. A enzima apresenta-se muito estável quando pré-incubada durante 1 h a temperaturas compreendidas entre 6 e 50 °C. Só quando a enzima foi pré-incubada a 60 °C houve um decréscimo acentuado na atividade enzimática. Após 60 min a 40 °C, ocorreu uma ativação da enzima, em que se verifica um aumento acentuado da atividade.

Alguns autores como, Sousa *et al.* (2006) referem uma metaloprotease obtida por *Bacillus cereus* que apresenta 55 % da sua atividade quando incubada a 50 °C, durante 2 h. Por sua vez Almas *et al.* (2009) demonstraram que uma protease produzida por *Bacillus* strain SAL1 mantinha 88 % da sua atividade proteolítica quando exposto a 55 °C, durante 1 h. Também Mehrnouch *et al.* (2011), reportaram uma protease serínica produzida por uma planta Kesinai *Streblus asper* com mais de 85 % de retenção da atividade entre 10-70 °C, durante 1h.

4.2.4 Estabilidade em função do pH

A estabilidade da enzima foi estudada, medindo a atividade residual depois da pré-incubação da enzima durante 24 h, aos seguintes valores de pH (3,6, 4, 4,6, 5, 5,6, 6, 6,5, 7,7, 8, 9, 9,6, 10, 10,6). Os resultados apresentam-se na figura 4.11.

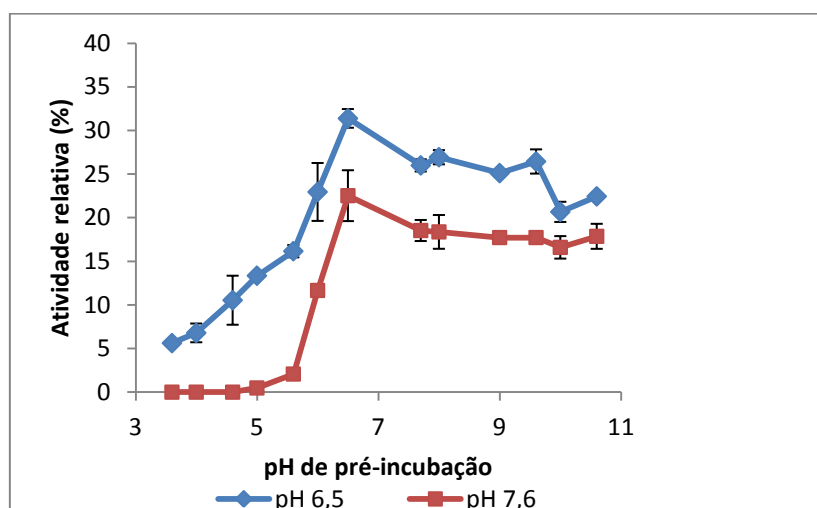


Figura 4.11 – Estabilidade da enzima em função do pH.

A enzima apresenta-se muito instável a pH ácido, sendo este comportamento mais evidente no caso do pH 7.6. No entanto, em ambos os pH estudados, a enzima manteve-se estável ao longo de uma ampla gama de pH (6,5 a 10,6). Após 24 h de pré-incubação a pH 11, a enzima mantinha ainda cerca de 20 % e 25 % da atividade inicial a pH 7,6 e 6,5, respetivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Vidyasagar *et al.* (2006) que referiram uma protease extracelular produzida por *Halogeometricum borinquense* TSS 101 que se apresentava estável numa gama de pH entre 6 e 10. No trabalho de Sousa *et al.* (2006) observaram também uma protease obtida por *Bacillus cereus* estável entre uma gama de pH entre 6 e 9, depois de 1h de pré-incubação a 37 °C, apresentando uma estabilidade muito idêntica à protease obtida neste estudo. Por sua vez, Emri *et al.* (2009) indicam que *Aspergillus nidulans* produzia uma protease fúngica extracelular com uma estabilidade significativa entre os valores de pH 3,5 e 10,5 depois de 24 h de pré incubação a 37 °C. Já

Almas *et al.* (2009), demonstraram que *Bacillus* SAL1 produzia uma protease estável na gama de pH de 7 e 10, depois de 1 h de pré-incubação a 25 °C.

4.2.5 Ensaio de inibição

Os inibidores específicos das proteases podem ser utilizados para identificar o grupo catalítico que constitui o centro ativo de uma protease (Storey e Wagner, 1986). Deste modo, a enzima foi sujeita a ensaios de inibição, utilizando inibidores específicos do grupo cisteína (iodoacetamida), metalo (EDTA e fenantrolina), ácido aspártico (pepstatina) e serínica (inibidor da tripsina). O tipo de enzimas foi determinado através da hidrólise do substrato azocaseína na presença dos inibidores específicos, sendo os resultados apresentados na figura 4.12.

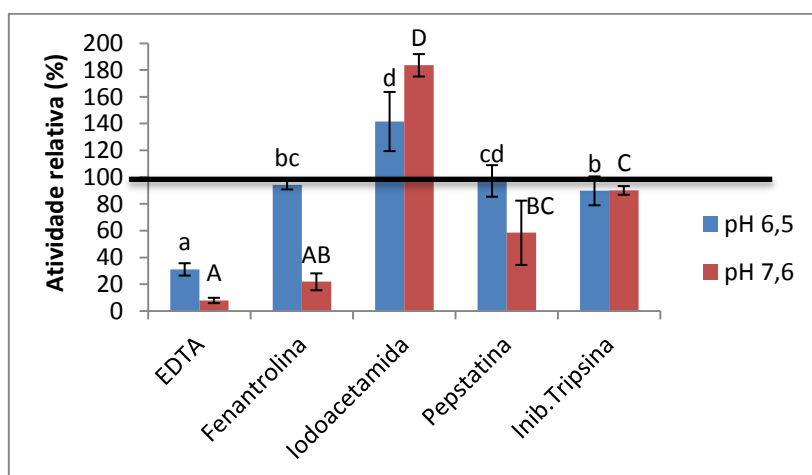


Figura 4.12 – Efeito dos inibidores na atividade proteolítica. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Para ambos os valores de pH, a enzima foi significativamente ($p < 0,05$) inibida pelo agente EDTA (69% de inibição para pH 6,5 e 92% de inibição para pH 7,6), pelo que sugere que se trata de uma metaloprotease. Houve também uma ativação da atividade enzimática quando se utilizou iodoacetamida.

A pH 6,5 a enzima foi parcialmente inibida pela fenantrolina (6% de inibição) e pelo inibidor da tripsina (10% de inibição), por outro lado a pH 7,6, a enzima foi parcialmente inibida pela pepstatina (42% de inibição) e pelo inibidor da tripsina (10% de inibição).

A pH 7,6, a enzima também foi significativamente ($p < 0,05$) inibida pela fenantrolina (78%).

O inibidor de cisteína protease, iodoacetamida, não suprimiu a atividade proteolítica da enzima em ambos os valores de pH, tendo o mesmo efeito, para as enzimas no extrato a pH 6,5, a pepstatina (inibidor de aspárticas proteases).

Sousa et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes por uma protease produzida por *Bacillus cereus*, onde apresentava 100 % de inibição com EDTA e fenantrolina.

Também Secades et al. (2001) observaram que a protease extracelular produzida por *Flavobacterium psychrophilum* era inibida pelo EDTA e fenantrolina numa concentração 1 mM.

A inibição por EDTA geralmente é observada em proteases produzidas por bactérias como *Bacillus polymyxa* B-17 (Matta e Punj, 1998), *Bacillus stearotherophilus* TLS33 (Sookkheo et al., 2000), *Serratia marcescens* (Romero et al., 2001) *Aeromonas caviae* (Nakasone et al., 2004) e *Salinivibrio* sp. AF-2004 (Amoozegar et al., 2006).

4.2.6 Efeito dos catiões

Com o objetivo de avaliar o efeito dos catiões metálicos sobre a atividade proteolítica das enzimas, as amostras foram incubadas com vários catiões. Os resultados encontram-se na figura 4.13.

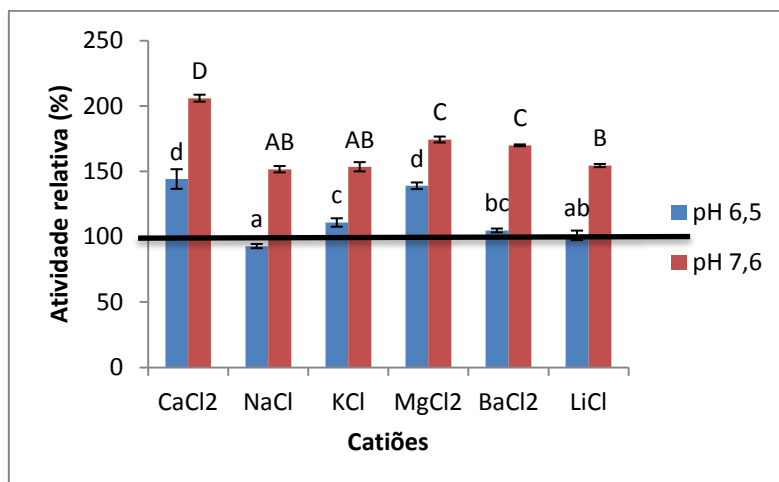


Figura 4.13 - Efeito dos catiões na atividade proteolítica. Letras diferentes significam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A pH 6,5, a atividade proteolítica da enzima manteve-se estável na presença dos iões Na^+ , K^+ , Ba^{2+} e Li^+ . Na presença dos catiões Ca^{2+} e Mg^{2+} a atividade proteolítica da enzima aumentou significativamente ($p < 0,05$), ou seja aumentou 44 % e 39 % respetivamente. No entanto quando estava presente o ião Na^+ as enzimas tiveram a sua atividade proteolítica reduzida aproximadamente em 7 %.

A pH 7,6, a atividade proteolítica da enzima também manteve-se estável na presença de todos os iões estudados Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Li^+ . O catião Ca^{2+} aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade proteolítica, para mais do dobro, enquanto o ião Mg^{2+} fez aumentar a atividade proteolítica da enzima em 74 % e o ião Ba^{2+} aumentou 70 %.

Estes resultados parecem indicar que a enzima requer Ca^{2+} ou Mg^{2+} para a sua atividade ótima, porque em ambos os valores de pH, os cátions cálcio e magnésio eram os que faziam aumentar mais a atividade proteolítica. Geralmente íons de Ca^{2+} ligam-se aos grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e essas ligações aumentam a termoestabilidade das cadeias polipeptídicas por redução de sua flexibilidade (Ward e Young, 1998).

As proteases alcalinas requerem um cátion bivalente como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} ou uma combinação desses cátions, para uma atividade máxima. Estes cátions também aumentavam a estabilidade térmica de uma protease alcalina produzida por *Bacillus* sp. (Paliwal *et al.*, 1994). Admite-se que estes cátions protegem a enzima contra a desnaturação térmica.

Sousa *et al.* (2006), identificaram uma metaloprotease produzida por *Bacillus cereus*, onde os íons de cálcio aumentavam também a atividade proteolítica, e referem que estes íons são conhecidos por serem estabilizadores de muitas enzimas, protegendo-as de mudanças conformacionais no sítio ativo a elevadas temperaturas. Resultados semelhantes também foram observados por Vidyasagar *et al.* (2006) pela protease serínica extracelular produzida por *Halogeometricum borinquense* que apenas é estimulada pela adição de Ca^{2+} , enquanto Zhu *et al.* (2006), demonstraram que a protease produzida por *GeoBacillus* sp. YMTC 1049 aumentava a atividade proteolítica em 55 % e 40 % na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} , enquanto que os íons Na^+ , K^+ e Li^+ não tiveram efeito na atividade.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho procedeu-se à produção de proteases extracelulares por uma bactéria de origem marinha e à sua caracterização preliminar.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- A maior atividade enzimática foi obtida com um meio de cultura constituído por 2 % de peptona bacteriológica, 0,5 % de sacarose e 0,5 % de extrato de levedura, à temperatura de 30 °C com agitação após uma incubação de 50 h.
- O máximo de atividade da protease foi registado a 60 °C e o valor da energia de ativação calculado foi 105 cal/mol.
- O máximo de atividade da protease foi registado a pH 6,5. Porém, a pH 7,6 parecia ocorrer uma inflexão na curva de evolução da atividade em função do pH, sugerindo a existência de um segundo máximo de atividade. Estes valores de pH levam a admitir que se está na presença de neutrases.
- A ambos os valores de pH (6,5 e 7,6) registou-se uma grande estabilidade a 40 °C, apresentando uma atividade constante até 15 h de pré-incubação, enquanto a 50 °C mantinha a estabilidade apenas durante 1,5 h. Porém, era rapidamente desnaturada a 60 °C.
- A protease era desnaturada na gama de pH ácida, mas a atividade medida, tanto a a pH 6,5 como a 7,6, era muito estável entre pH 6,5 e 10,6, após incubação à temperatura ambiente durante 24 h.
- A atividade proteolítica foi estimulada pela presença dos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} em ambos os valores de pH.
- A enzima em estudo foi inibida pelo EDTA (pH 6,5 e 7,6) e pela fenantrolina (pH 7,6), sugerindo tratar-se de uma metaloprotease.
- Os resultados obtidos no estudo da estabilidade em função do pH e térmica, bem como o efeito dos inibidores levam a admitir que se trata de uma única protease.

6. TRABALHO FUTURO

O aprofundamento dos conhecimentos obtidos neste trabalho apresenta um grande interesse, na medida que olhando para a profundidade da diversidade microbiana, há sempre uma hipótese de encontrar microrganismos que produzam enzimas novas, com melhores propriedades e adequados para exploração comercial. Poderiam ser feitos trabalhos futuros como:

- Caracterizar a estirpe em estudo;
- Otimizar as condições de produção das proteases extracelulares por esta estirpe;
- Purificar a protease;
- Estudar a produção da protease recorrendo a culturas imobilizadas;
- Estudar o tipo de inibição da protease;
- Aumentar a escala de produção da protease.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen, J., 1993. Proteases. *in*: Enzymes in Food Processing, 3rd edition. Academic Press, Inc., New York, pp. 159-203.
- Almas, S.; Hameed, A.; Shelly, D.; Mohan, P. 2009. Purification and characterization of a novel protease from *Bacillus* strain SAL1. *African Journal of Biotechnology*, 8 (15): 3603-3609.
- Baharum, S.N.; Beng, E.K.; Mokhtar, M.A.A. 2010. Marine microorganisms: potential application and challenges. *Journal of Biological Sciences*, 10: 555-564.
- Barrett, A. J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. *in*: Dalling M. J. (ed), *Plant proteolytic enzymes*, CRS Press Inc., Florida, pp. 1-16.
- Barrett, A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:1-15.
- Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; O'Brien, E. A. 2001. The merops database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology*, 134: 95-102.
- Barros, J. R. 2012. Apresentação das Aplicações de Enzimas e Biocatálise. Estabilidade Enzimática. Disponível em URL: <http://w3.ualg.pt/~rbarros/documentos/biobio/12-13/AEB%20-%20estabilidade%20enzimatica.pdf>
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. 5th edition, W. H. Freeman and company, London.
- Bergmeyer, H.U. 1984. *Methods of enzymatic analysis: Enzymes 3: Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors*, 3rd edition, volume v, Wiley, John & Sons, Incorporated, USA.
- Bernardi, D.L.S.; Pilosof, A.M.R.; Bartholomai, G.B. 1990. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of American Oil Chemical Society*, 68(2): 102-105.
- Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U.T. 2005. *Biocatalysts and enzyme technology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Cabra J.; Sánchez, M. 1997. Biotecnología para el desarrollo en Colombia: Innovación y ciencia. *Mercado y consumo*, VI(3): 44-52.
- Cabral, J.M.S.; Barros, M.R.A.; Gama, M. 2003. *Engenharia enzimática*, Lidel Edições Técnicas-Ltda, Lisboa.
- Davies, D.R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 19: 189-215.
- Deutch, C. 2007. Degradative Enzymes from the Pharmacy or Health Food Store: Interesting Examples for Introductory Biology Laboratories. *American Biology Teacher*, 69(6): 64-70.

- Emri, T.; Szilágyi, M.; László, K.; M-Hamvas, M., Pócsi, I. 2009. PepJ Is a New Extracellular Proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 54 (2): 105-109.
- Estevinho, M. 2007. *Microbiologia – Sebenta teórica*, Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Apontamentos editados pela Associação de Estudantes.
- Fernandes, P.; Aires-Barros, M.; Cabral, J. 2003. *Biotechnology dos Alimentos*. in: Lima, N. and Mota, M. (eds.). *Biotechnology – Fundamentos e Aplicações*. Lidel Edições Técnicas-Ltda, Lisboa, pp. 219-246.
- Frankena, J.; Van, V.; Stouthamer, A.H. 1985. A continuous culture study of the extracellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22:169-176.
- Gey, M. and Unger, K. 1995. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. *Journal of Chromatography B*, 666: 188–193.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. *Industrial Enzymology*. 2nd Ed., MacMillan Press, London
- Gottschalk, G. 1985. *Bacterial metabolism*. 2nd edition, Springer, New York, pp.144.
- Guruprasad, K.; Dhanaraj, V.; Gorves, M.; Blundell, T. L. 1995. Aspartic proteinases: The structures and functions of a versatile superfamily of enzymes. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 2: 329-341.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 735-750.
- Jasvir S.; Gill, N.; Devasahayam, G.; Sahoo, D. K. 1998. Studies on Alkaline Protease Produced by *Bacillus* sp. NG312. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76:57-63.
- Jiang, W. and Bond, J.S. 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *Febs*, 312(2,3): 110-114.
- Joo, H.S.; and Chang, S. 2006. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:176-183.
- Johnvesly, B. and Naik, G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. jb-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37: 139-144.
- Kumar, C. G.; Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17: 561-594.
- Lehninger, A. L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1995. *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo, pp.839.

Lee, B-H.; Kim, B-K.; Lee, Y-J.; Chung, C-H.; Lee, J-W. 2010. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1,7): 38-42.

Macedo, A.; Venâncio, A.; Malcata, F. 2003. Biotecnologia dos Alimentos. *in* Lima, N. e Mota, M. (Eds.). *Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações*, Lidel Edições Técnicas-Ltda, Lisboa. pp. 429-472.

Madala, P.K.; Tyndall, J.D.A.; Nall, T.; Fairlie, D.P. 2010. Update 1 of: Proteases Universally Recognize Beta Strands In Their Active Sites. *Chemical Reviews*, 110: 1-31.

Malashetty V.; Prakash S.; Litchfield C.; Sreeramulu R. 2006. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea*, 2: 51–7.

Marangoni, A. G. 2003. *Enzyme kinetics*, John Wiley Sons, New Jersey.

Medeiros V.; Paiva, L.; Lima, E.; Baptista, J. 2009. Milk protein modification by proteolytic enzymes. Effect on the milk digestibility. *in*: Abstracts of the 9^o Encontro de Química dos Alimentos, Terceira, Açores.

Mehnouch, A.; Mustafa, S.; Yazid, A.M.M. 2011. Heat-Treatment Aqueous Two Phase System, for Purification of Serine Protease from Kesinai (*Streblus asper*) Leaves, *Molecules*, 16: 10202-10213.

Nakai S.; Li-C., E. 1989. Chemical and Enzymatic Modifications of Milk Proteins *in*: *Developments in Dairy Chemistry 4 Functional milk proteins*, Fox, P. F., New York. pp. 347-376.

Nehete, P.N.; Shan, V.D; Kothari, R.M. 1985. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the scant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, 7: 413-418.

Neurath, H., 1990. The diversity of proteolytic enzymes. *In*: *Proteolytic Enzymes: a practical approach*, (Eds) Beynon, R. J. and Bond, J. S., IRL Press, Oxford, pp.1-13.

Neves-Souza, R. D.; Silva, R.S.S.F. 2005. Estudo de Custo-Rendimento do Processamento de Queijos Tipo Minas Frescal com Derivado de Soja e Diferentes Agentes Coagulantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 25(1): 170-174.

Oberoi, R.; Beg, Q.K.; Puri, S.; Saxena, R.K.; Gupta, R. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 17: 493–497

- Paliwal N.; Singh, SP.; Garg, SK.1994. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technology*, 50(3): 209-211.
- Rahman, R.N.Z.A.; Razak, C.N.; Ampon, K.; Basri, M.; Yunus, W. M. Z.; Salleh, A.B. 1994. Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (40): 822-827.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.P.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 597-635.
- Said, S. and Pietro, R. 2002. *Enzimas de interesse industrial e biotecnológico*. Ed Eventos, Rio de Janeiro pp.121.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. 2001 *Biotecnologia Industrial*. Edgard Blücher Ltda, São Paulo. 4: 388-413.
- Secades, P. and Guijarro J. A.1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Applied and environmental microbiology*. 65(9): 3969-3975.
- Secades, P.; Alvarez, B. and Guijarro J. A.2001. Purification and Characterization of a Psychrophilic, Calcium-Induced, Growth-Phase-Dependent Metalloprotease from the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*. 67(6): 2436–2444.
- Sen, S.; Satyanarayana, T. 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. *Indian Journal of Microbiology*. 33: 43-47.
- Silva, G.A.B.; Almeida, W.E.S.; Cortes, M.S.; Martins, E.S. 2009. Production and characterization of protease from *gliocladium verticilloides* by solid-state fermentation of agroindustrial wastes. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Brasil. 03(01): 28-41.
- Sousa, F.; Jus, S.; Erbel, A.; Kokol, V.; Paulo, A.C.; Gubitz, G.M. 2006. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1772–1781.
- Storey, R. D.; Wagner, F. W.1986. Plant proteases: a need for uniformity. *Phytochem.*, 25: 2701-2709.
- Twining, S.S. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*. 143: 30-34.
- Vidyasagar, M.; Prakash, S.; Litchfield, C.; Sreeramulu, K. 2006. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the

extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* 2: 51–57.

Weil, J. 2000. *Bioquímica Geral* 2ªEd. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Wiseman, A. 1991. *Manual de biotecnologia de los enzimas*. Zaragoza: Editorial Acribia, pp.444.

Zhu, W.; Cha, D.; Cheng, G.; Peng, Q.; Shen, P. 2007. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *GeoBacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1592–1597.