

PRODUÇÃO DE PROTEASES MICROBIANAS COM *BACILLUS* CCMI 1253 PARA APLICAÇÕES AGRO-INDUSTRIAIS

Manuela Lageiro^{1,2,3*}, Nuno Alvarenga^{1,2,3}, Vanda Lourenço^{2,4}, Alberto Reis⁵

¹ INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras;

² FCT – Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica;

³ GeoBioTec – Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica;

⁴ CMA – Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica;

⁵ LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia I.P., 1649-038 Lisboa

* lageiro@campus.fct.unl.pt



INTRODUÇÃO

As proteases são ubíquas, existem nos animais, frutos, vegetais, bactérias, fungos e vírus. Industrialmente constituem um importante grupo de enzimas com 60% das vendas no mercado mundial de enzimas e apresentam várias aplicações agroindustriais alimentares, no amaciamento de carnes, no fabrico de queijo, na degradação de glúten, na panificação, e não alimentares, nos curtumes e têxteis, bem como no tratamento dos poluentes, tornando os processos mais ecosustentáveis.

A importância comercial e industrial das proteases microbianas promove a procura e seleção de estirpes microbianas que apresentem elevado nível de produção destas enzimas extracelulares. Isolaram-se e identificaram-se várias estirpes microbianas de um banho alcalino (pH 9,45) de purga de uma indústria de curtumes e foi seleccionada para produção de proteases a estirpe mais produtora o *Bacillus subtilis* CCMI 1253 (BRM2).

METODOLOGIA

- ❑ **Manutenção do microrganismo:** slants com meio sólido, *nutrient agar* (NA), 4°C
- ❑ **Produção de proteases:** meio líquido inicial* (*shake flask* e bioreactor)
- ❑ **Amostragem de hora em hora:**
 - ✓ Determinação com eléctrodo: pH e Oxigénio dissolvido
 - ✓ Determinação de biomassa: contagem do nº de células ao microscópio ou colónias em placas e contagem indirecta no espectrofotómetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
- ❑ **Armazenar no frio para análise:**
 - ✓ Actividade proteolítica**: $\lambda = 660 \text{ nm}$ (Anson 1938 e Folin & Ciocalteu 1929)
 - ✓ Actividade proteolítica: fluorescência emissão 525 nm, excitação 495nm (Twining 1984)
 - ✓ Proteína total: $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Bradford 1976)

Produção de proteases em balão com agitação (*shak flask*):



Estudos de otimização em cultura submersa com agitação:

	Shak flask	Bioreator (2L)
Temperatura (30, 35, 37, 40, 43, 45, 50, 55 °C)		Agitação (rpm)
Extrato de levedura (0, 2, 3, 4, 6, 5, 7 g/L)		Arejamento (vvm)
Glucose (0, 2, 4, 6, 7, 20 g/L)		pH
Peptona (0, 5, 2, 3, 6, 8, 10 g/L)		Maximizar Taxa específica de crescimento, μ (h ⁻¹) Protease (U/mL)
Extrato de carne (0, 3, 5, 7, 8, 10 g/L)		
Sais (CaCl ₂ e MnCl ₂) (g/L)		



Ensaio de otimização de arejamento e agitação em bioreator 2L a 43°C: ✓ sem controlo de pH / ✓ com controlo de pH

Arejamento (vvm)	Agitação (rpm)	μ (h ⁻¹)	Protease (U/mL)	pH controlado	μ (h ⁻¹)	Protease (U/mL)
1	300	1,1	0,5	pH 7	1,1	19,2
1	200	1,2	0,7	pH 8	0,2	22,0
2	300	0,3	9,8			
2	500	0,9	23,9			
2	700	0,5	66,9			

Actividade proteolítica por fluorescência rpm: rotações por minuto vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

OBJETIVO

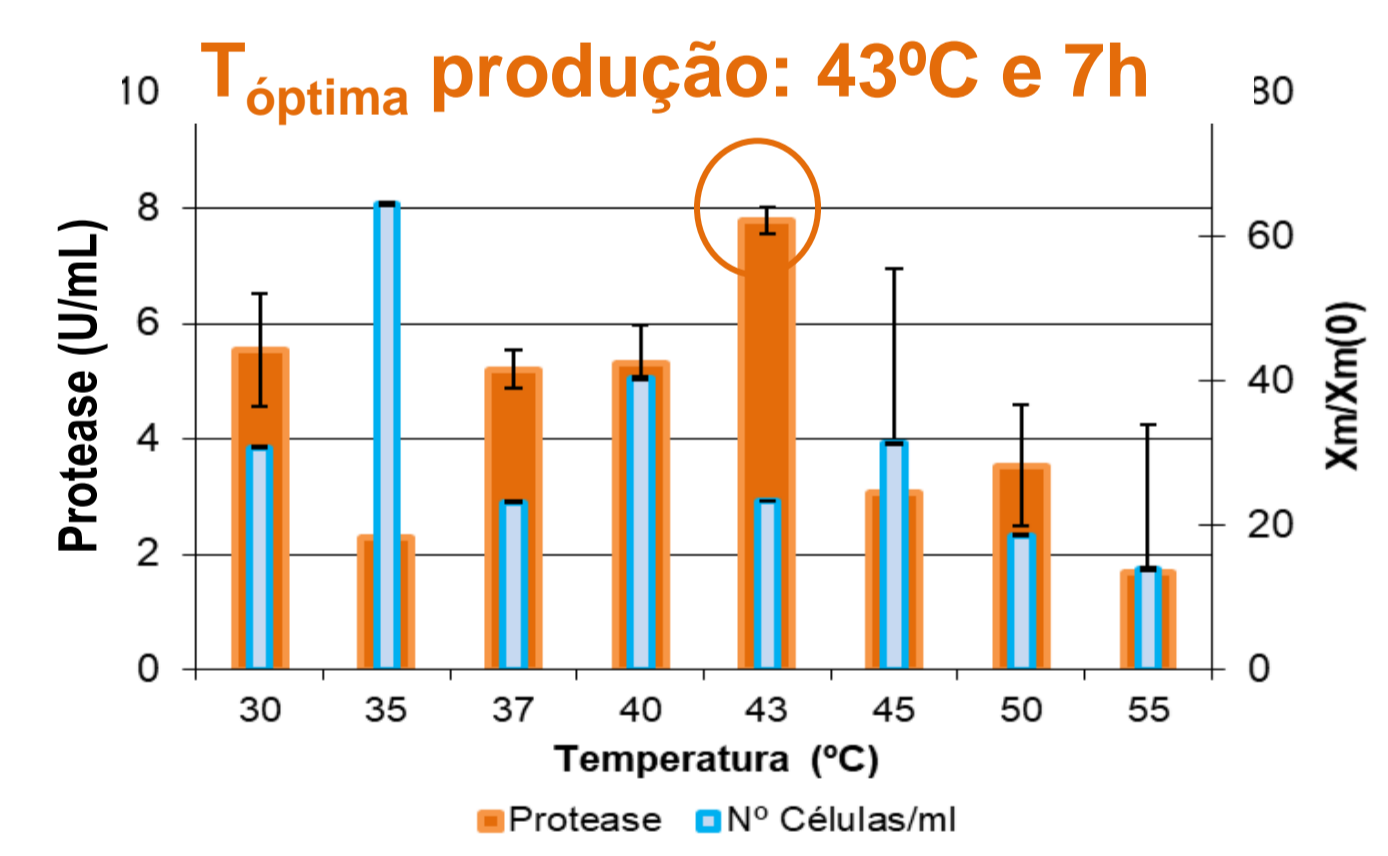
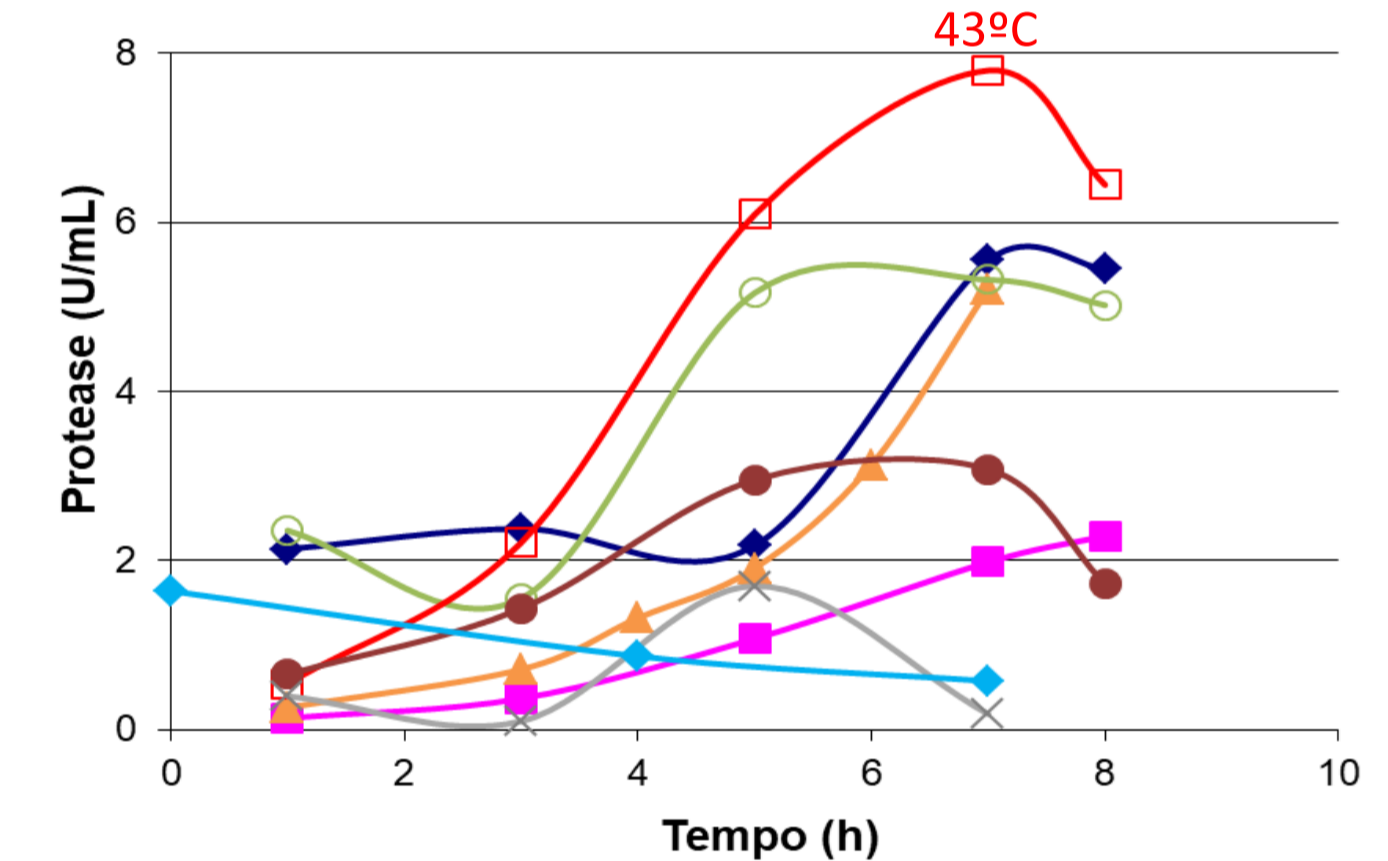
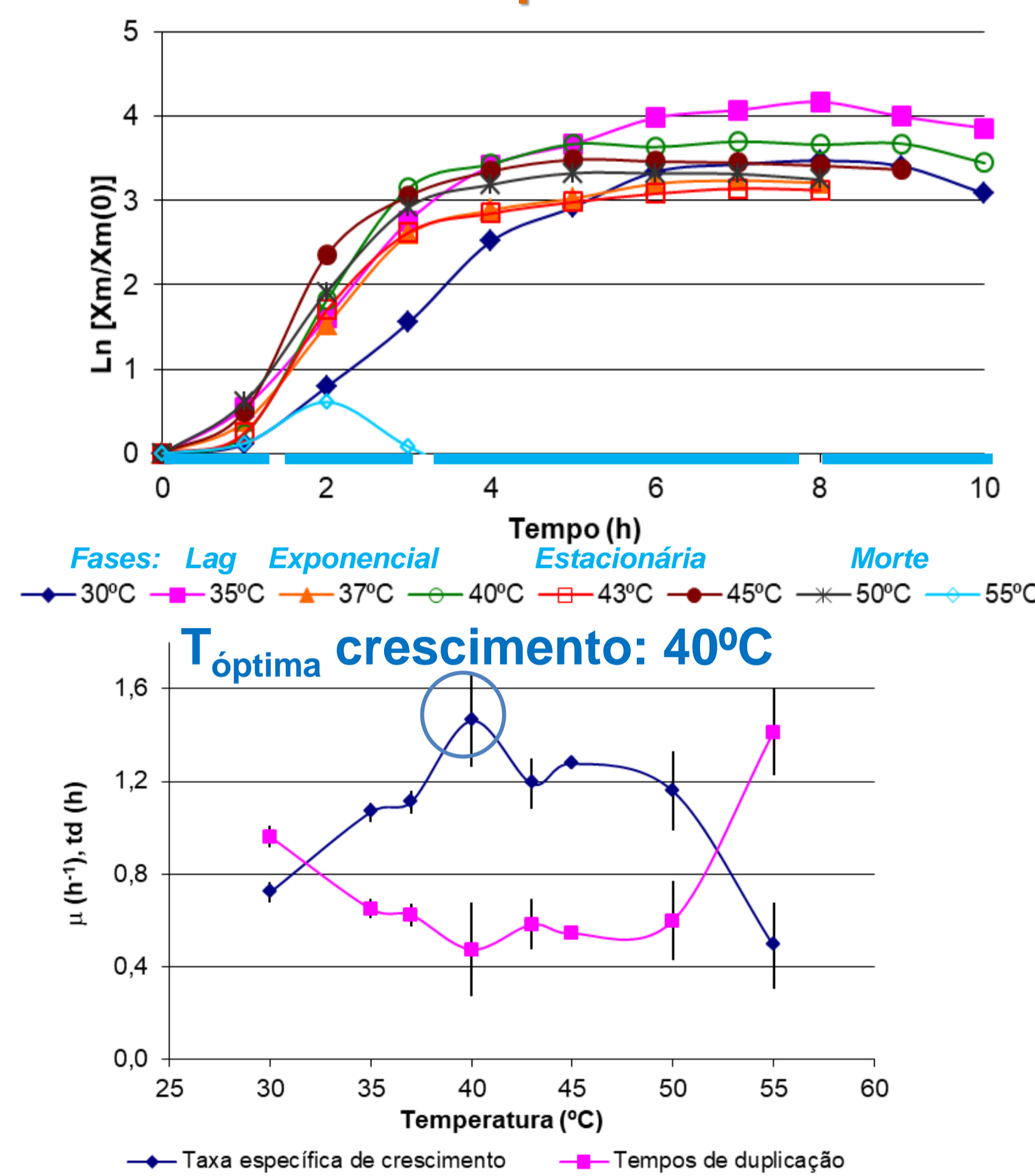
Optimização da produção de proteases com *Bacillus subtilis* CCMI 1253 em bioreator

No âmbito do doutoramento em Tecnologias Agro-Industriais da FCT/UNL: ESTUDOS DE OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MICROBIANA DE PROTEASES EXTRACELULARES COM APLICABILIDADE EM AGRO-INDÚSTRIAS, realizou-se o *screening* e identificação de microrganismos produtores de proteases extracelulares e a optimização da produção das proteases em bioreator (da escala laboratorial à semi-piloto) com estratégias de determinação e manutenção das condições óptimas (ambientais, fisiológicas, químicas e reológicas) e recurso a modelos de parâmetros cinéticos.

Futuros estudos consistem na caracterização bioquímica das principais enzimas extracelulares produzidas e estudos de viabilidade da sua aplicação em processos agro-industriais relevantes para a bioeconomia como os setores alimentar e dos têxteis/curtumes.

RESULTADOS

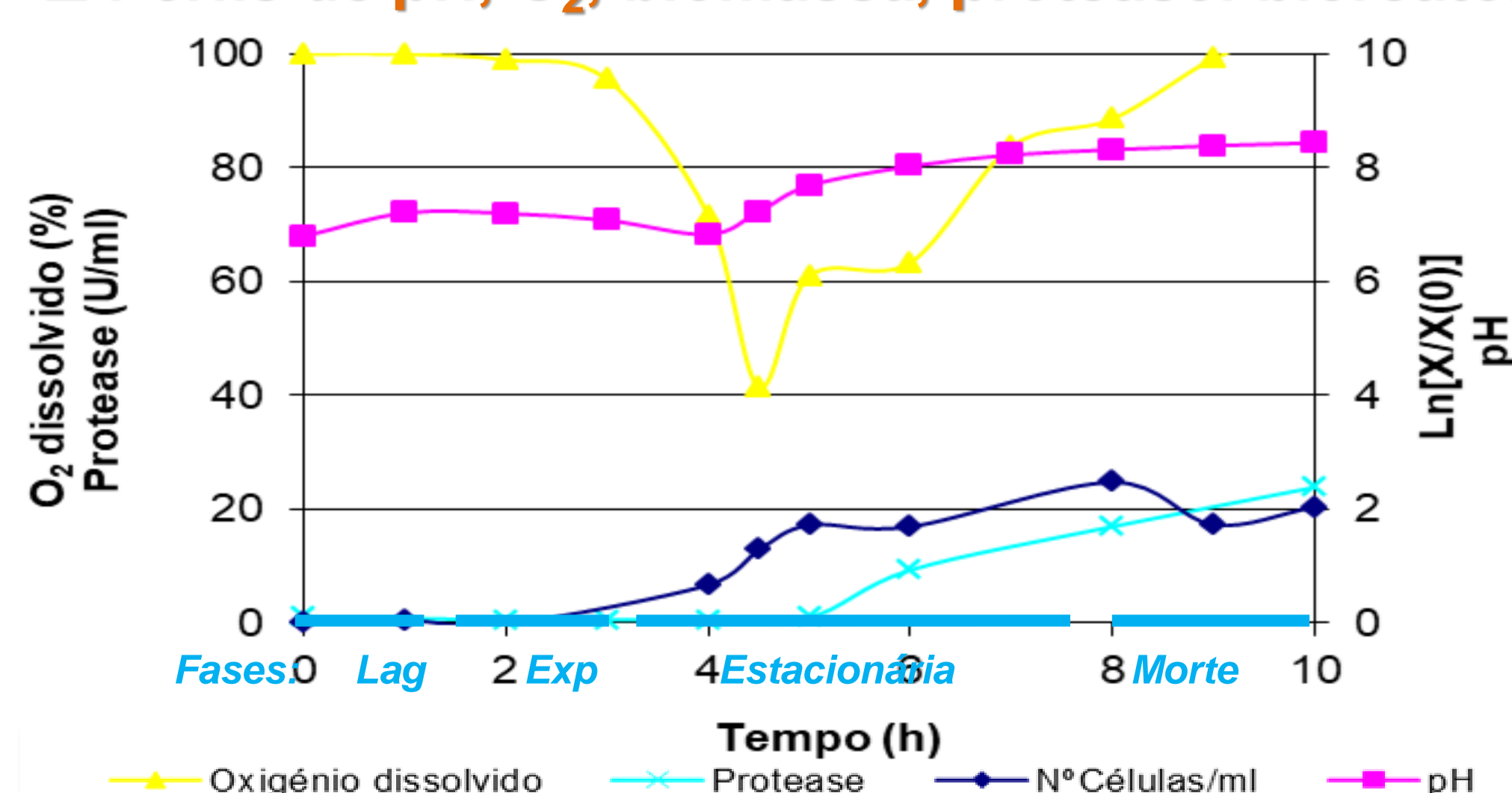
Ensaio de temperatura:



Ensaio de otimização do meio:

Microrganismo	Meio inicial	Meio optimizado
	<i>B. subtilis</i> IIQDB32	<i>B. subtilis</i> CCMI1253
Extrato de levedura	3 g/L	3 g/L
Glucose	6 g/L	0 g/L
Peptona	5 g/L	3 g/L
Extrato de carne	3 g/L	7 g/L
Sais: Ca ²⁺	0,004 g/L	0,2 g/L
Mn ²⁺	0,035 g/L	0,04 g/L
μ_{max} (h ⁻¹)	0,26	1,9 ± 0,1
Protease _{max} (U/ml)**	0,76	13,9 ± 0,3

Perfis de pH, O₂, biomassa, protease: bioreator 2L, 500 rpm, 43°C, 2vvm



CONCLUSÕES

B. subtilis CCMI1253 apresenta maior μ_{max} e maior actividade proteolítica nas mesmas condições experimentais do *B.s.* IIQDB32.

pH controlado a 8 apresenta desenvolvimento mais rápido do microrganismo mas menor indução da produção de protease que a pH 7.

A produção de protease é mais eficaz para o crescimento sem controlo do pH obtendo-se 66,9 ± 0,1 U/mL.