

UTILIZAÇÃO DO SORO LÁCTEO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO *Bacillus sp.* SMIA-2

Gentil, N.O.¹, Barbosa, J.B.², Ladeira, S.A.³, Delatorre, A.B.⁴, Martins, M.L.L.⁵

¹UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, natiele_gentil@hotmail.com

²UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, joaotla@yahoo.com.br

³UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, silvanialadeira@gmail.com

⁴UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, andreidelatorre@hotmail.com

⁵UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, meire@uenf.br

Resumo – *Bacillus sp* é um microrganismo de fácil cultivo, resistente às condições adversas e produz várias enzimas de importância industrial, como, por exemplo, as proteases. Estas enzimas pertencem ao grupo das hidrolases e são de grande importância industrial. Porém a produção de proteases tem um custo elevado e por isso a utilização de resíduos agroindustriais como o soro de leite, pode ser uma alternativa viável para diminuir os custos da produção destas enzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 utilizando diferentes concentrações de soro lácteo no meio de cultura. As concentrações do soro lácteo avaliadas foram 0,25%, 0,50%, 1,0%, 1,5% e 2,0% (p/v). De acordo com os resultados encontrados as menores concentrações do soro lácteo (0,25% e 0,50%) foram as que propiciaram maiores níveis de atividade das proteases, enquanto que nas maiores concentrações (1,0%; 1,5% e 2,0%) houve uma relativa queda da atividade enzimática.

Palavras-chave: Soro lácteo, *Bacillus sp*, Proteases.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Proteases refere-se a um grupo de enzimas cuja função catalítica é a hidrólise de proteínas. Elas podem ser obtidas através de plantas, animais e microrganismos. No entanto, apenas as produzidas por microrganismos atendem às demandas industriais (ATOMI 2005; GHORBEL *et al.*, 2002).

Bacillus é conhecido por produzir uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como as proteases. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (WANG *et al.*, 2007). Além disso, são capazes de utilizar substâncias

orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos.

Dentre os resíduos gerados na indústria de alimentos, destaca-se o soro de queijo, líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou caseína (Brasil, 2005). Sua composição depende do tipo e do processo de fabricação do queijo (Bem-HASSAN & GHALY, 1994; ORDÓÑEZ, 2005).

O soro de queijo é considerado o principal subproduto da indústria laticínista, representando 85-90 % do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ALMEIDA *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi produzir proteases pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 utilizando

soro lácteo como meio de cultura, a fim de baratear o processo de produção desta enzima.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

O microrganismo empregado neste estudo foi uma bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001), a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ.

Para a produção da protease foram utilizados cinco meios de cultivo, cada um contendo distintas concentrações de soro de leite, preparado utilizando água destilada:

Meio1: 0,25% de Soro

Meio2: 0,50% de Soro

Meio3: 1,0% de Soro

Meio4: 1,5% de Soro

Meio5: 2,0% de Soro

Os meios (25 mL) foram preparados em frascos erlenmeyers de 250 mL e posteriormente esterilizados em autoclave a 121 ± 2 °C por 15 minutos. Depois de resfriados estes meios foram inoculados com 0,5 mL de um pré-inóculo preparado no dia anterior e incubados em um shaker orbital (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm e à temperatura de 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após 24h a turbidimetria das culturas foi determinada através da medida da densidade ótica a 600 nm em um espectrofotômetro Hitachi Model U-2000. As células foram separadas por centrifugação à 13000 rpm por 15 min e o sobrenadante livre de células foi usado na preparação das enzimas brutas.

Para a determinação da atividade de proteases foi utilizado 0,5 mL do extrato

enzimático (sobrenadante) e 1,0 mL do substrato azocaseína e foi incubada a 70°C durante 10 min. A reação foi paralisada pela adição de 0,5mL de ácido tricloacético (TCA 15%) e então, centrifugou-se a 15.000 rpm por 5 min. O sobrenadante (2mL) foi neutralizado com 0,5mL de NaOH 1M e a coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro a 420nm. Paralelamente, foi feito um tubo controle (branco) que conteve todos os reagentes do ensaio, exceto o extrato enzimático. Este só foi adicionado após ter paralisado a reação com o TCA 15%, seguindo a mesma metodologia.

A determinação da proteína também foi determinada conforme a metodologia descrita por Lowry, conforme modificações propostas por Peterson, 1977.

Resultados e Discussão

Bacillus sp SMIA-2 cresceu e se desenvolveu bem no soro de leite, pois os valores da densidade ótica no tempo de 24h tiveram um relativo aumento (Figura 1).

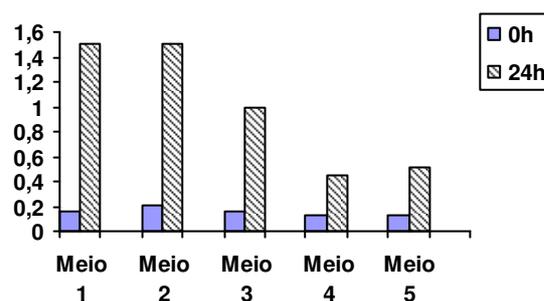


Figura 1. Valores da densidade ótica (600nm) de culturas de *Bacillus* SP SMIA-2 em soro lácteo a diferentes concentrações.

Mas se compararmos o crescimento do meio 1 e do meio 2 com o restante, observa-se que ambos obtiveram um maior crescimento que os demais. Tal fato possui relação com a adaptação do microrganismo em determinado

ambiente. Logo se percebe que quando exposto às altas concentrações do soro, o microrganismo não consegue se desenvolver com tanta rapidez e facilidade quando exposto às baixas concentrações deste substrato.

Como mostrado na Figura 2, o meio 1 e o meio 2, com concentrações de 0,25% e 0,50% de soro lácteo respectivamente, resultaram na maior atividade enzimática pela protease. Enquanto os meios 3, 4 e 5, com concentrações de 1,0%; 1,5% e 2,0% de soro respectivamente, resultaram em uma baixa atividade pela mesma enzima.

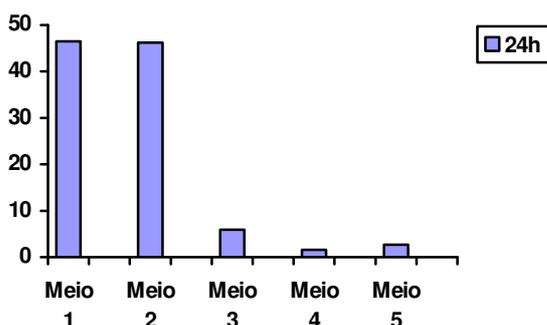


Figura 2. Valores de atividade da protease secretada por culturas de *Bacillus* SP SMIA-2 em soro lácteo a diferentes concentrações.

Essa comparação pode explicar o motivo da baixa atividade nos meios com altas concentrações. Pois nesses meios não tinham tantos microrganismos como nos meios de alta atividade enzimática. Logo produziram menos enzimas que os meios 1 e 2.

Em relação aos valores do pH do meio foi observado que para todas as concentrações do soro de leite utilizadas foi observado um aumento do pH do meio, demonstrando que a produção desta enzima ocorre em valores alcalinos de pH.

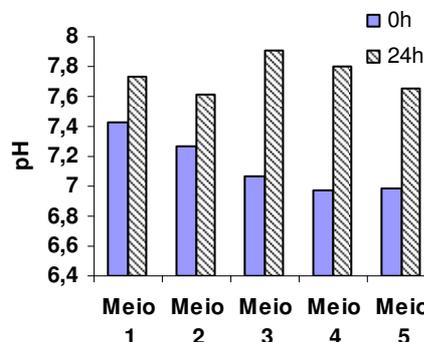


Figura 3. Variação dos valores do pH dos meios contendo diferentes concentrações do soro de leite.

Conclusão

Com os dados apresentados neste trabalho, estabeleceu-se a melhor concentração de soro lácteo para o cultivo do microrganismo *Bacillus* sp na produção de proteases, que foi de 0,5% de soro.

A partir destes resultados será feita ainda outras análises para aperfeiçoar esta produção. Como por exemplo, testes de melhor tempo de incubação e o volume de microrganismo a ser inoculado.

Referências

- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.E.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas com soro de queijo Minas Frescal. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 21, p. 187-192, mai./ago. 2001.
- ATOMI, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 166-173.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de

2005 aprova os Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 agosto, 2005.

BEM-HASSAN, R.M.; GHALY, A.E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p.89-105, 1994.

NUNES, A. S.; MARTINS, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiology*, v.32, p.271-275.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83, 346-356. 1977.

WANG, X.-D. E RAKSHIT, S.K. (1999). Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering*. 20:429-434.