

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução

BRUNA LUIZA DE JESUS MANZOLLI

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DA
NEUTRASE® COMERCIAL

SÃO CARLOS

2023

BRUNA LUIZA DE JESUS MANZOLLI

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DA
NEUTRASE® COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Professor Doutor Rubens Monti.

Coorientadora: Professora Doutora Maria Teresa Marques Novo Mansur.

SÃO CARLOS

2023

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos mesmo que eles pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

(Albert Einstein)

À **minha família**, principalmente aos meus pais, **Silvia e Reinaldo**, que desde sempre me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para que eu realizasse os meus sonhos; e à minha irmã, **Beatriz**, por toda cumplicidade e parceria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da minha graduação.

Aos meus pais, por todo suporte concedido, principalmente nas horas mais difíceis, e por serem meus maiores exemplos de perseverança e honestidade.

À minha irmã, por ser minha confidente e amiga.

À toda a minha família, especialmente, avós, tios, primos, que de alguma forma também contribuíram para que o sonho da graduação se tornasse realidade.

A todos os professores que participaram efetivamente da minha formação, especialmente aos que me concederam nesta reta final a oportunidade da realização deste trabalho de conclusão de curso, acreditando no meu potencial e por serem exemplos de profissionais/pesquisadores dedicados e competentes.

Aos meus amigos e colegas de curso, agradeço por todo amor, força e incentivo.

RESUMO

A utilização de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas tem se difundido bastante, principalmente, nas indústrias de alimentos. Um dos grupos mais estudados para este fim são as proteases. Proteases são responsáveis pelas quebras de ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, produzindo peptídeos menores e aminoácidos livres funcionais. O uso da enzima Neutrase[®] se explica por ser uma protease que hidrolisa proteínas do soro de leite, um subproduto altamente poluente e, na maioria das vezes, descartado nas indústrias de laticínios, visando à obtenção de derivados com melhores propriedades funcionais. O objetivo geral deste trabalho consistiu em caracterizar parcialmente o extrato bruto da Neutrase[®] comercial derivada de um *Bacillus* sp. Os resultados obtidos mostraram no primeiro ensaio enzimático da neutrase livre, sua atividade, determinada através de análise espectrofométrica, foi de 27,9 U/mL. Já a dosagem de proteínas totais encontrada no ensaio resultou em um valor de 0,94 mg/mL. Na temperatura ótima de atividade, 55 °C, a protease manteve-se estável por algumas horas. Além disso, com o uso de íons metálicos observou-se uma característica da existência de metaloproteases no extrato. Em relação a imobilização covalente, foram testados dois suportes e os valores de atividade dos derivados Neutrase-Glioxil-Sabugo de milho (NGSM) e Neutrase-Glioxil-Agarose (NGA) foram 1,04 U/g e 1,15U/g, respectivamente. Além de rendimentos de imobilização abaixo do esperado, valores não satisfatórios para a metodologia utilizada. Apesar disso, estudos futuros com outros tipos de imobilização e funcionalização do suporte podem favorecer a atividade hidrolítica da enzima, fato que ainda a torna um possível potencial para novas aplicações industriais.

Palavras-chave: enzima; protease; neutrase; hidrólise; imobilização covalente.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da ação das aminopeptidases e carboxipeptidases, assim como as endopeptidases em um substrato polipeptídico.
- Figura 2** Equação para cálculo da concentração da proteína.
- Figura 3** Equação para cálculo da atividade enzimática.
- Figura 4** Equação para cálculo de rendimento de imobilização.
- Figura 5** Equação para cálculo de atividade recuperada.
- Figura 6** Curva Analítica para determinação de proteínas totais pelo Método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972).
- Figura 7** Curva Analítica para determinação de tirosina.
- Figura 8** Atividade da protease em função do pH.
- Figura 9** Atividade da protease em função da temperatura.
- Figura 10** Estabilidade térmica da enzima a pH 7,5.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Valores necessários para a construção da curva de calibração da albumina de soro bovino (BSA)
- Tabela 2** Valores utilizados para a dosagem de proteínas
- Tabela 3** Valores utilizados para avaliação da atividade qualitativa da enzima
- Tabela 4** Valores utilizados para a construção da curva analítica da tirosina.
- Tabela 5** Valores de absorvância em diferentes concentrações de amostra.
- Tabela 6** Valores de absorvância em diferentes concentrações de amostra de tirosina.
- Tabela 7** Efeito de um inibidor de protease (1mM e 10mM) na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto.
- Tabela 8** Efeito de íons na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto.
- Tabela 9** Perfil de imobilização da neutrase® em agarose e SM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	atividade enzimática
AR	atividade recuperada
BSA	albumina do soro bovino
FD	fator de diluição
M	molar
mM	milimolar
mg	miligramas
mL	mililitros
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
RI	rendimento da imobilização
rpm	rotações por minuto
TCA	ácido tricloroacético
U	unidade de atividade proteolítica
µL	microlitro
µmoles	micromoles

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Enzimas Proteolíticas	14
2.2 Obtenção e aplicações das proteases	15
2.3 Gênero <i>Bacillus</i>	16
2.4 Neutrase®	17
2.5 Imobilização enzimática e suportes covalentes naturais	18
3 OBJETIVO GERAL	20
3.1 Objetivos Específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Material	21
4.2 Metodologia	21
4.2.1 Determinação de proteínas totais	21
4.2.2 Curva Analítica da Proteína Soro Albumina Bovina (BSA)	22
4.2.3 Diluição do extrato enzimático	23
4.2.4 Determinação da dosagem de proteína pelo método de Hartree (1972) . 23	
4.2.5 Cálculo da quantidade de proteínas	24
4.2.6 Ensaio para determinação da atividade enzimática	24
4.2.6.1 Teste de atividade qualitativa	24
4.2.6.2 Curva Analítica da Tirosina	25
4.2.6.3 Determinação da atividade hidrolítica da neutrase® livre.....	26
4.2.6.4 Avaliação da influência do pH na atividade enzimática	27
4.2.6.5 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática	28
4.2.6.6 Ensaio de estabilidade térmica da enzima	28

4.2.6.7 Ensaio de inibição e íons metálicos	28
4.2.7 Imobilização enzimática.....	29
4.2.7.1 Preparo do suporte pó de sabugo de milho	29
4.2.7.2 Ativação do suporte agarose e pó de sabugo de milho.....	29
4.2.7.3 Imobilização: preparo dos derivados NGA e NGSM.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Obtenção da Curva Analítica de Proteína	31
5.2 Obtenção da Curva Analítica da Tirosina.....	32
5.3 Determinação de proteína no extrato comercial enzimático	34
5.3.1 Primeiro ensaio enzimático com a enzima livre	34
5.3.2 Dosagem de proteínas totais.....	35
5.4 Influência do pH na atividade enzimática	35
5.5 Influência da temperatura na atividade enzimática	36
5.6 Estabilidade térmica da enzima	37
5.7 Ensaio de inibição e íons metálicos	38
5.8 Imobilização enzimática.....	40
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas orgânicas naturalmente produzidas por todos os organismos, capazes de catalisar e, dessa forma, acelerar a velocidade das reações bioquímicas no meio vivo. Além da função metabólica, elas podem ter inúmeras outras aplicações.

A tecnologia atual permite que as enzimas sejam extraídas de materiais biológicos e purificadas, fato que ampliou o uso destas em inúmeros segmentos industriais. As plantas, os animais e os microrganismos são representantes das várias fontes biológicas de enzimas, entre as quais as enzimas microbianas representam a maior parte das enzimas industriais.

A demanda global por novas tecnologias considera processos que são ecologicamente seguros, favorecendo a redução no uso de compostos químicos nocivos ao meio ambiente. A este respeito, a tecnologia enzimática é considerada um substituto viável para transformações químicas, e para o tratamento de resíduos derivados da atividade industrial (SILVA, 2018 a, b, c).

Dessa forma, a introdução de enzimas como catalisadores em processos industriais mostra-se cada vez mais vantajosa, principalmente por serem substâncias naturais, amplamente específicas e apresentarem baixa toxicidade. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada de maneira simples e fácil, bastando modificar os parâmetros do meio de reação, adicionando algum efector ou alterando o pH (DZIEZAK, 1991; COLEN, 2006).

Do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente viável é aquela que garante a obtenção de um produto de melhor qualidade que o método tradicional, melhora no processo de produção, redução de custos, produção em operações reduzidas ou indisponíveis no mercado e com diminuição de efluentes ao final do processo (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

As enzimas utilizadas em escalas industriais ainda devem tolerar elevadas concentrações salinas, mudanças de temperaturas, pH e concentrações de substratos e produtos nos reatores, dentre outros fatores operacionais (SHELDON; PEREIRA, 2017).

Grande parte do sucesso da implementação de enzimas em processos industriais se deve aos avanços alcançados pelo desenvolvimento de novas tecnologias capazes de produzir enzimas a baixo custo e também em estabilizar e prolongar a vida útil destes biocatalisadores, tornando os processos mais atrativos economicamente, fato que cada vez mais intensifica a busca por novas fontes produtoras (CHAPMAN *et al.*, 2018).

O processo de atividade catalítica e obtenção do produto da hidrólise pode ser melhorado de variadas maneiras, uma delas é através do método de imobilização de proteínas. Apontado como um dos processos mais inovadores e, recentemente, bem estudados sistemas para aumentar a produtividade em uma escala industrial. Diversas técnicas de imobilização já são utilizadas em diversos setores industriais (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Enzimas imobilizadas apresentam uma maior estabilidade, que gera uma maior aplicabilidade para produção industrial (LI; DING; ZHOU, 2013).

Nesse contexto, a expansão do conhecimento sobre as propriedades das proteases, em conjunto com processos de imobilização que facilitem sua aplicação e aumentem sua produtividade, são de grande interesse social e econômico.

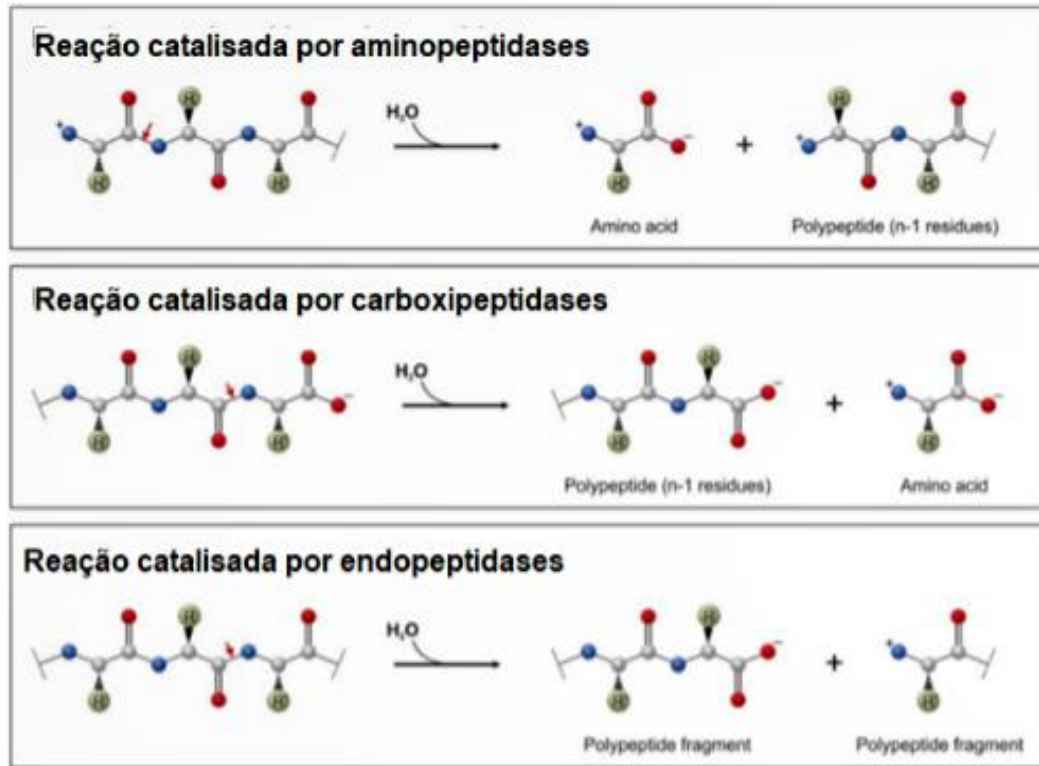
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas Proteolíticas

Proteases, também conhecidas como proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas, pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas, produzindo peptídeos menores e aminoácidos livres (RAO, et al., 1998). O processo é chamado de clivagem proteolítica, e é um mecanismo altamente específico comum de ativação ou inativação de enzimas. Como uma molécula de água é utilizada no processo, as proteases são classificadas como hidrolases (SANTOS, 2007; GURUMALLESH *et al.*, 2019) e estão entre os três grandes grupos de enzimas industriais com demandas crescentes no mercado e por isso são estudadas extensivamente. (VOJCIC *et al.*, 2015).

As enzimas proteolíticas podem ser divididas em dois grupos, dependendo da região catalítica que atuam (Figura 1). Caso a enzima for capaz de atuar sobre as ligações peptídicas na região interna da proteína, ela é chamada de endopeptidase. Endopeptidases podem ser subdivididas em quatro outros grupos, baseados em seu mecanismo de ação (serina protease, cisteína protease, aspártico protease e metaloprotease). Já as exopeptidases são enzimas capazes de atuar nas extremidades da proteína, podendo também ser subdivididas em dois outros dois grupos, baseado no sítio de ação (aminopeptidase e carboxipeptidase). (MURRAY, 2011; WARD *et al.*, 2009).

Figura 1 - Representação esquemática da ação das aminopeptidases e carboxipeptidases, assim como as endopeptidases em um substrato polipeptídico.



Fonte: MOTYAN *et al.*, 2013

As proteases em geral podem ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas em relação à faixa de pH em que as atividades são ótimas (SANDHYA *et al.*, 2005). Para a indústria alimentícia, as proteases neutras são as mais relevantes, devido a sua função de hidrólise de ligações de aminoácidos hidrofóbicos, restritos ao pH neutro, reduzindo assim o amargor dos hidrolisados de proteínas alimentares (SANDHYA *et al.*, 2005).

2.2 Obtenção e aplicações das proteases

As proteases são fisiologicamente necessárias a todos os organismos vivos. São oriundas de diversas fontes, incluindo animais (produtores de tripsina, quimiotripsina, pepsina), plantas (capazes de produzir papaína, bromelina, queratinases, ficina) e microrganismos. Os últimos são os principais produtores de

proteases preferencialmente utilizadas na indústria, devido a fácil manipulação, altas taxas de produção e liberação para o meio extracelular (JISHA, V.N. *et al.*, 2013).

Dentre as proteases microbianas destacam-se as proteases de origem bacteriana e fúngica, pois podem desenvolver-se em meio simples e barato (TAKAMI *et al.*, 1990). As proteases bacterianas possuem diversas aplicações nas indústrias de alimentos e químicas. Na indústria de alimentos, destacam-se por ter maior aplicação, apresentando um papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na produção de adoçantes artificiais e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (THYS, 2004).

As proteases de origem microbiana podem ser produzidas em grandes quantidades em um curto período por meio de processos fermentativos. Além disso, os microrganismos são considerados as melhores fontes de obtenção de proteases por conta de sua diversidade bioquímica e facilidade na manipulação genética (SANDHYA *et al.*, 2005).

Além disso, microrganismos possuem a capacidade de produzir proteases extracelulares, como é o caso das derivadas do gênero *Bacillus*, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação (GERMANO *et al.*, 2003, modificado).

Os métodos de obtenção das proteases microbianas podem ser facilmente aprimorados e as mesmas podem ser armazenadas por um longo período, não necessariamente em condições ótimas, sem perda significativa de sua atividade (Gupta *et al.*, 2002).

2.3 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* pertence ao grupo de bactérias com forma de bastonetes móveis, gram-positivos, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo, na sua maioria, catalase positiva. A maior parte das espécies são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento de 25 e 37°C, mas existem espécies termófilas e psicrótróficas que podem crescer em temperaturas tão altas quanto 75°C ou tão baixas quanto 3°C, respectivamente (JAY, 2005).

Os microrganismos pertencentes a este grupo possuem diversas características vantajosas para produção de proteases, tais como facilidade de adaptação e crescimento, menor tempo de cultivo e alguns como, por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. Amyloliquefaciens*, por serem reconhecidos como seguros (GRAS) pelo FDA (Food and Drug Administration) (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

As proteases produzidas por *Bacillus* apresentam grande potencial para utilização na hidrólise de proteínas e para aplicação em processos bioindustriais (SIRTORI *et al.*, 2006). Estima-se que metade da produção comercial de proteases disponíveis são derivadas das cepas de *Bacillus* sp. (BEG; GUPTA, 2003).

As enzimas produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* apresentam propriedades proteolíticas e distinguem-se das demais porque podem agir sobre proteínas complexas, como as de soro de leite e da caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos (BON *et al.*, 2008; DAROIT *et al.*, 2009). Além disso, de todos os microrganismos alcalinofílicos, ou seja, aqueles que apresentam taxa de crescimento ótima em pH elevado, *Bacillus* sp. são os maiores produtores de proteases alcalinas (JISHA, V.N *et al.*, 2013).

2.4 Neutrase®

A Neutrase® é uma endopeptidase derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* que hidrolisa aleatoriamente as ligações peptídicas internas das proteínas (MOHAMMAD, *et al.*, 2020). É utilizada na hidrólise de proteínas vegetais e animais devido à sua alta atividade enzimática, boa estabilidade térmica e segurança natural da saúde. Além disso é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, medicamentos, alimentos para animais, cosméticos, couro e têxteis (CHEN, *et al.*, 2017). Possui uma atividade ideal em torno de pH 5,5-7,5 e 40-55 °C. A neutrase é inativada em 85 °C por 2 min (MOHAMMAD, *et al.*, 2020).

Enzimas com atividade ótima em pH neutro, como a Neutrase®, têm sido amplamente utilizadas por promoverem a hidrólise controlada, gerando hidrolisados com propriedades funcionais satisfatórias (LUNELLI, 2015).

A Neutrase® faz parte do grupo das proteases sendo empregada na hidrólise de proteínas do soro de queijo, um subproduto poluente e descartado pelas

indústrias de laticínios. A utilização dessa enzima visa à obtenção de derivados com melhores propriedades nutricionais e funcionais. (BEZERRA *et al.*, 2012)

Devido às enzimas atuarem sob condições suaves, elas são estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis em condições adversas, podendo inativar-se, ou seja, perderem sua capacidade de catalisar reações (TARDIOLI, 2003 apud BEZERRA *et al.*, 2012). Portanto, o procedimento de imobilização da enzima Neutrase® visa oferecer vantagens consideráveis, com a possibilidade de processamento contínuo, a reutilização da enzima, redução de autodigestão, como também poderá potencializar sua aplicação no setor industrial (SILVA, 2015).

2.5 Imobilização enzimática e suportes covalentes naturais

A imobilização é um processo utilizado para reter por meio de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, com o intuito de maximizar sua atividade catalítica. Imobilização é um procedimento bastante versátil, pois possibilita realizar ciclos de reuso no caso de reatores enzimáticos, facilita a recuperação e purificação do produto e uma vez imobilizada, a enzima torna-se mais estável mantendo seu poder catalítico efetivo por mais tempo (GUISÁN, 2006; DiCOSIMO *et al.*, 2013; TAVANO, 2013).

Na tecnologia de imobilização de enzimas outro fator muito relevante é a escolha do material suporte. Propriedades desejáveis de uma matriz incluem resistência física, hidrofobicidade, facilidade de derivatização, resistência ao ataque microbiano e alta capacidade de interação enzima-suporte por unidade de peso e baixo custo (GUISÁN, 2006).

Uma técnica bastante eficiente é a estabilização da enzima pela imobilização em suportes sólidos através de ligações covalentes multipontuais que entre outros objetivos visa prevenir mudanças conformacionais na estrutura terciária da enzima de forma a manter sua função catalisadora (MATEO *et al.*, 2006).

Um dos tipos de suporte que tem maior destaque são os polímeros orgânicos, que se caracterizam por ter uma elevada adaptabilidade a diferentes métodos de imobilização. Essa característica é dada pela facilidade da implementação de grupos funcionais reativos no suporte sólido. Dentre os polímeros orgânicos encontram-se aqueles que podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os

polímeros naturais, como os lignocelulósicos tem um custo menor por se tratar de subprodutos agroindustriais, que são biodegradáveis, evitando assim danos ambientais após sua utilização (DALLA-VECCHIA, R. *et al.*, 2004).

A utilização de resíduos lignocelulósicos como suporte para a imobilização de enzimas vêm sendo bastante explorada, como em alguns trabalhos encontrados na literatura. A enzima pepsina foi imobilizada com sucesso em pó de sabugo de milho ativado, mostrando que esse resíduo lignocelulósico abundante e de baixo custo apresenta grande potencial para imobilização de enzimas (BASSAN, 2015).

Segundo (CRUZ, 2017), os resultados mostram que foi possível imobilizar a alcalase® em suporte glioxil-sabugo de milho (SM) com eficientes rendimento de imobilização, atividade recuperada e fator de estabilidade e mais uma vez, este suporte natural apresentou grande potencial como suporte de baixo custo para a imobilização.

Nesse tipo de suporte todavia, torna-se necessária a aplicação de tratamentos químicos e/ou térmicos para a ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Este procedimento impulsiona ao fracionamento dos três principais componentes e leva à abertura da estrutura da celulose, favorecendo a ligação enzima-suporte. (CRUZ, 2017).

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o extrato bruto de uma Neutrase® comercial derivada de *Bacillus amyloquiefaciens*, visando apresentar as melhores condições para a reações enzimáticas *in vitro* e avaliar a imobilização da enzima em dois suportes covalentes (agarose e pó de sabugo de milho).

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática;
- Determinar a estabilidade térmica da protease bruta;
- Comparar atividade enzimática do extrato bruto livre com o imobilizado covalentemente pelos dois tipos de suporte.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Enzima Neutrase® (Novo Nordisk®), pó de sabugo de milho gentilmente doado pela SAGRAN (Indústria e Comércio de Ingredientes para ração Ltda.), Salto Grande/SP, caseína pura (Synth®). Todos os reagentes foram utilizados em grau analítico.

4.2 Metodologia

4.2.1 Determinação de proteínas totais

Para a determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Hartree (1972), este que se baseia no tratamento da amostra com uma solução alcalina de cobre e em seguida com o cromógeno misto de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico. Neste segundo passo, a cor é desenvolvida em decorrência da redução rápida do reagente fenólico pelos resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano) e de uma reação lenta do quelato de cobre com a cadeia polipeptídica, obtendo-se um heteropoliácido azul com absorção máxima a 750 nm.

Primeiramente, o procedimento consistiu no preparo de algumas soluções. Todas elas foram preparadas em quantidade suficiente para o número de amostras no momento do uso. A solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L foi preparada pesando-se 2,0 g do sal, dissolvendo-o em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, para o volume de 100 mL. Para o preparo de 1 mL da solução de sulfato de cobre 1%, foram dissolvidos 10 mg do sal em água ultrapura; a solução de tartarato de sódio e potássio 1% foi preparada com 0,25 g do sal, dissolvido em 25 mL água ultrapura. A solução de cobre-tartarato-carbonato (Solução A) contendo 2 % de carbonato de sódio, 0,01 % de sulfato de cobre e 0,02 % de tartarato de potássio em hidróxido de sódio 0,1 N, foi preparada com 1 mL da solução de sulfato de cobre, 1 mL da solução de tartarato de sódio e potássio 1% e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1 N para 100 mL.

4.2.2 Curva Analítica da Proteína Soro Albumina Bovina (BSA)

Para fins de cálculo, foi construída uma curva analítica utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão com concentração estoque de 0,6mg/mL, diluída duas vezes até atingir a concentração de 0,3mg/mL.

Foram reservados 8 tubos de ensaio para análise da amostra proteica. Ao tubo 1 não foi adicionado proteína (controle); ao tubo 2, 0,05 mL; ao tubo 3, 0,10 mL; ao tubo 4, 0,15 mL; ao tubo 5, 0,20 mL; ao tubo 6, 0,25 mL; ao tubo 7, 0,30 mL e, finalmente ao tubo 8, 0,35 mL. Os volumes de cada tubo foram completados com água miliq até 0,5 mL (Tabela 1).

Em seguida, a cada tubo foram acrescentados 2,5 mL de solução A, seguido de agitação e repouso por 15 minutos.

Posteriormente, 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído na relação 1:1 (v/v) foi colocado em cada tubo. Após breve agitação e repouso de 30 minutos, as amostras do ensaio foram lidas em espectrofotômetro a 660 nm.

Tabela 1- Valores necessários para a construção da curva de calibração da albumina de soro bovino (BSA)

Tubos	Solução de BSA (mL)	H ₂ O (mL)	Solução A (mL)	Espera	Folin-Ciocalteu (mL)	Espera
1	-	0,50	2,50	15'	0,25	30'
2	0,05	0,45	2,50	15'	0,25	30'
3	0,10	0,40	2,50	15'	0,25	30'
4	0,15	0,35	2,50	15'	0,25	30'
5	0,20	0,30	2,50	15'	0,25	30'
6	0,25	0,25	2,50	15'	0,25	30'
7	0,30	0,20	2,50	15'	0,25	30'
8	0,35	0,15	2,50	15'	0,25	30'

O valor do coeficiente de absorvidade foi determinado de acordo com o coeficiente angular obtido pela equação da reta da curva de [amostra proteica] x Absorbância, atingida pela média das absorbâncias do experimento, realizado em triplicata em cada ensaio.

4.2.3 Diluição do extrato enzimático

O extrato comercial da neutrase® mantido refrigerado passou por um processo de diluição prévio, onde em 10 mL de água ultrapura foram adicionadas 100 µL do extrato enzimático, ocasionando uma diluição de 101 vezes do extrato.

4.2.4 Determinação da dosagem de proteína pelo método de Hartree (1972)

Foram reservados 6 tubos de ensaio para dosagem da amostra protéica diluída (item 4.2.3) da neutrase®. Ao tubo 1 não foi adicionado proteína (controle); ao tubo 2, 0,05 mL; ao tubo 3, 0,10 mL; ao tubo 4, 0,15 mL; ao tubo 5, 0,20 mL e, finalmente ao tubo 6, 0,25 mL. Os volumes de cada tubo foram completados com água miliq até 0,5 mL (Tabela 2).

Em seguida, a cada tubo foram acrescentados 2,5 mL de solução A (item 4.2.1), seguido de agitação e repouso por 15 minutos.

Posteriormente, 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído na relação 1:1 (v/v) foi colocado em cada tubo. Após breve agitação e repouso de 30 minutos, foram realizadas as leituras das amostras em comprimento de onda de 660 nm.

Tabela 2- Valores utilizados para a dosagem de proteínas

Tubos	Amostra neutrase® (mL)	H₂O (mL)	Solução A (mL)	Espera	Folin-Ciocalteu (mL)	Espera
1	-	0,50	2,50	15'	0,25	30'
2	0,05	0,45	2,50	15'	0,25	30'
3	0,10	0,40	2,50	15'	0,25	30'

4	0,15	0,35	2,50	15'	0,25	30'
5	0,20	0,30	2,50	15'	0,25	30'
6	0,25	0,25	2,50	15'	0,25	30'

4.2.5 Cálculo da quantidade de proteínas

A quantidade de proteína foi calculada pela equação:

Figura 2- Equação para cálculo da concentração da proteína

$$Prot. = \left(\frac{\left(\frac{\sum Abs}{\epsilon} \right)}{V_e} \right)$$

Onde:

Prot.: Concentração de proteína (mg/mL);

\sum **Abs:** somatória das absorvâncias obtidas;

ϵ : coeficiente de absorvidade da curva analítica de BSA;

Ve: Volume total de amostra (enzima) utilizado no experimento (mL).

4.2.6 Ensaios para determinação da atividade enzimática

4.2.6.1 Teste de atividade qualitativa

A enzima neutrase® foi analisada qualitativamente através do ensaio com gelatina. Foi adicionado gelatina (5 mg/mL) em tampão McIlvaine pH 7,0 em 4 tubos de ensaio mantidos a 35 °C por 10 minutos para homogeneização. Após este tempo foi adicionado 50 µL, 100 µL e 150 µL nos tubos 2, 3 e 4 (Tabela 3), respectivamente de enzima neutrase® conforme preparação citada no item 4.2.3. Após a adição do extrato enzimático aos tubos contendo a gelatina, os mesmos foram mantidos por 20 minutos a 70 °C com agitação. Em seguida, os tubos foram colocados em gelo para verificar a atividade da enzima sobre a gelatina.

Tabela 3- Valores utilizados para avaliação da atividade qualitativa da enzima

Tubos	Gelatina (mg)	Tampão pH=7 (mL)	Enzima (μL)
1	10	2,000	-
2	10	1,950	50
3	10	1,900	100
4	10	1,850	150

4.2.6.2 Curva Analítica da tirosina

Para determinação da atividade enzimática proteolítica da neutrase® através da hidrólise de caseína foi construída uma curva analítica com uma solução de L-tirosina P.A (1 mmol/L) em diferentes concentrações (Tabela 4). As concentrações das soluções variaram de 0,05 a 0,50 μ mol/1,6mL de tirosina, o tampão utilizado foi o McIlvaine pH 7,00 e as determinações foram feitas em triplicata

Tabela 4 - Valores utilizados para construção da curva analítica de tirosina.

Tubos	Solução tirosina (mL)	Tampão (mL)	Tirosina (μg)	μmol/1,6mL
1	-	1,60	-	-
2	0,05	1,55	9,05	0,05
3	0,10	1,50	18,1	0,10
4	0,15	1,45	27,15	0,15
5	0,20	1,40	36,2	0,20
6	0,25	1,35	45,25	0,25
7	0,30	1,30	54,3	0,30
8	0,35	1,25	63,35	0,35
9	0,40	1,20	72,4	0,40
10	0,45	1,15	81,45	0,45

11	0,50	1,10	90,5	0,50
----	------	------	------	------

Cada ensaio foi devidamente agitado e as leituras foram feitas no espectrofotômetro em uma absorvância de 260 nm, que é o comprimento de onda em que a tirosina por ser um aminoácido aromático, apresenta absorvância máxima.

4.2.6.3 Determinação da atividade hidrolítica da neutrase® livre

Determinou-se a atividade proteolítica da neutrase® através da hidrólise enzimática da caseína, proteína do leite conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984).

Primeiramente, uma solução de caseína 2 % (m/v) ressuspensa em 20 mL de tampão McIlvaine pH 7,0 50 mM a 40 °C por 10 minutos foi preparada. Um volume de 5 mL do substrato foi utilizado para o ensaio enzimático a 50 °C, com agitação de 100 rpm. A temperatura tal foi escolhida, devido as condições pré - especificadas pelo fabricante. Após a adição de 100 µL da enzima neutrase® diluída, foram retiradas amostras do meio reacional de 500 µL e adicionadas em tubos microtubos contendo 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (v/v) em diferentes tempos (0,10, 20 e 30 minutos). Em seguida, os tubos foram mantidos a 8 °C por 1 h e então centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante límpido foi usado em leituras em λ de 280 nm.

A atividade enzimática foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis no ácido. Os valores de absorvâncias lidos a 280 nm foram transformados em µmoles de tirosina por comparação a curva analítica deste produto formado durante a hidrólise. A atividade enzimática é expressa em µmoles de produto formado por minuto (Unidades Internacionais, U total), considerando-se o total de unidades obtidas em cada volume de solução do extrato. Para o cálculo, foi utilizada a equação:

Figura 3 - Equação para cálculo da atividade enzimática.

$$A = \left(\frac{\sum Abs}{\epsilon \cdot \sum t \cdot Ve} \right)$$

Onde:

A: atividade enzimática (U/mL);

Σ Abs: somatória das absorbâncias obtidas no ensaio de atividade com a enzima livre;

ϵ : coeficiente de extinção molar da curva analítica da tirosina;

Σt : somatória dos tempos de reação (minutos);

Ve: volume total de amostra (enzima) utilizada (mL).

Este procedimento foi utilizado para determinar a atividade da enzima livre. A determinação da atividade da enzima imobilizada seguiu procedimento semelhante, porém utilizando a massa do suporte após imobilização ao invés da solução enzimática.

4.2.6.4 Avaliação da influência do pH na atividade enzimática

A determinação do pH ótimo consiste em mensurar a atividade enzimática (proteolítica) em diferentes condições de pH de soluções tampões. Por isso ensaios enzimáticos foram realizados a 50°C, com os tampões McIlvaine para pH 5,0; 6,0; 6,5; e 7,0; Tris-HCl para pH 7,5; McIlvaine para pH 8,0 e carbonato-bicarbonato para pH 9,0 e 10,0. Todos os tampões utilizados foram de 50 mM. Para cada pH foram utilizados 4 tubos de ensaio, 1 para o controle e 3 com a enzima, consistindo-se em um ensaio realizado em triplicata.

Primeiramente, sob agitação, realizou-se a ressuspensão em 4 tubos de ensaio diferentes contendo 0,1 g de caseína e 5 mL de tampão por 10 minutos a 40 °C. Em seguida, os tubos foram inseridos em banho-maria à temperatura de 50 °C e adicionou-se 100 μ L da enzima. No tempo “zero” em um dos tubos a reação foi interrompida com solução de TCA 10% (v/v) e armazenado em geladeira. Os outros tubos permaneceram no banho por 30 minutos até a reação ser interrompida. Por fim, os tubos foram armazenados em geladeira por aproximadamente 1 hora, centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante límpido foi usado em leituras em λ de 280 nm. Estes procedimentos foram realizados para cada um dos 8 tampões utilizados no ensaio.

4.2.6.5 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática

A avaliação da temperatura ótima para a atividade da enzima foi realizada incubando-se a mistura reacional em pH considerado ótimo, obtido pelo item 4.2.6.4. As temperaturas de incubação variaram de 30 °C a 65 °C, com intervalos de 5 °C.

O experimento foi realizado em microtubos e feito em triplicata, sendo que para cada ensaio foi confeccionado um controle adequado.

4.2.6.6 Ensaio de estabilidade térmica da enzima

Para verificação da estabilidade térmica e da atividade enzimática, utilizou-se o mesmo ensaio descrito no item 4.2.6.3. com a preparação da enzima diluída descrita como no item 4.2.3, exceto pela pré-incubação da enzima nas temperaturas de 50, 55 e 60°C nos tempos 0, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720 e 1440 minutos antes do ensaio de atividade enzimática.

O tratamento sem calor (0 minutos) foi usado como controle e sua atividade relativa foi considerada como 100%.

A estabilidade enzimática, isto é, a capacidade de reter a atividade durante o tempo, é um dos fatores mais importantes em biotecnologia. A estabilidade na estocagem ou a vida útil de uma enzima refere-se à manutenção da sua capacidade catalítica entre o período de armazenagem e o seu eventual uso. A estabilização enzimática pode ser obtida por diferentes métodos: engenharia de proteínas, modificação química, uso de aditivos, uso de solventes orgânicos, imobilização e produção a partir de microrganismos extremófilos (Assis, *et al*, 2010).

4.2.6.7 Ensaio de inibição e íons metálicos

O efeito de inibidor da atividade enzimática foi realizado com o agente quelante de íons metálicos, EDTA. A enzima foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente com o inibidor em concentrações de 1 e 10 mM, respectivamente. Posteriormente, dosou-se a atividade residual de acordo com as condições de ensaio descrito no 4.2.6.3. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle (100 %) sem adição de inibidor.

Com o objetivo de avaliar a influência de íons metálicos na atividade proteolítica, algumas amostras contendo o extrato bruto proteico foram incubadas com íons catiônicos, dentre eles, cálcio, manganês, cobalto, magnésio e zinco em uma concentração final de 0,1 M. A avaliação da atividade proteolítica foi realizada conforme o item 4.2.6.3. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.7 Imobilização enzimática

4.2.7.1 Preparo do suporte pó de sabugo de milho

O pó de sabugo de milho (SM) foi tratado com álcool 70% submetido à descompressão térmica, por meio de autoclave 121 °C, por 20 minutos visando expandir a matéria lignocelulósica e, conseqüentemente, aumentar sua superfície de contato. Posteriormente, o SM foi mantido sob agitação de 140 rpm por 24 horas em NaOH 2 M para o rompimento e remoção da lignina, lavado com água abundante e filtrado. O SM tratado foi armazenado até o momento da ativação e imobilização em solução de álcool 20% a 8 °C, com o intuito de evitar contaminação biológica do material (BASSAN et.al., 2016).

4.2.7.2 Ativação do suporte agarose e pó de sabugo de milho

Foram avaliadas a imobilização utilizando os suportes agarose 6BCL e pó de sabugo de milho. A ativação e funcionalização do pó de sabugo de milho e agarose a suportes glioxil (SM-glioxil/AG-glioxil) foi realizada com a adição de 6 mL de água ultrapura, 9,52 mL de NaOH (1,7 M), 0,2714 g de borohidreto de sódio e 6,86 mL de glicidol (2,3-epóxi-propanol) a 20 g de pó de sabugo de milho previamente tratado e a agarose. As suspensões obtidas foram mantidas sob agitação suave, em temperatura ambiente por 18 h. Após este período, os suportes foram oxidados, ou seja, ativados, com adição de periodato de sódio 100 mM, sob agitação frequente e suave por 1h 30min. Em seguida, os suportes foram filtrados à vácuo e lavados.

4.2.7.3 Imobilização: preparo dos derivados NGA e NGSM

Para a imobilização, 1 g de ambos os suportes foram adicionados a 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,5 contendo 9 U de neutrase para o derivado neutrase-glioxil-agarose (NGA) e 29 U para o neutrase-glioxil-sabugo de milho (NGSM). As

suspensões foram mantidas a 25 °C, sob agitação suave. Periodicamente, as atividades do sobrenadante, do controle e da suspensão foram determinadas para acompanhar o rendimento da imobilização. Ao final da imobilização foi adicionado borohidreto de sódio (NaBH₄ 1 mg/1mL) para a redução dos grupos ativos remanescentes. O derivado foi então filtrado e lavado com água destilada (GUISÁN, 2006).

O rendimento de imobilização (RI) foi definido como a relação entre as atividades no sobrenadante e no controle da enzima livre e a atividade recuperada (AR) foi dada pela razão entre a atividade da suspensão final, após o processo de imobilização e a atividade inicial da enzima oferecida.

Figura 4 - Equação para cálculo de rendimento de imobilização.

$$RI (\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

onde A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (controle) e B é a atividade verificada no sobrenadante.

Figura 5 - Equação para cálculo de atividade recuperada.

$$AR (\%) = \frac{C}{A} \times 100$$

onde A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (controle) e C é a atividade do derivado obtido após o processo de imobilização.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da Curva Analítica de Proteína

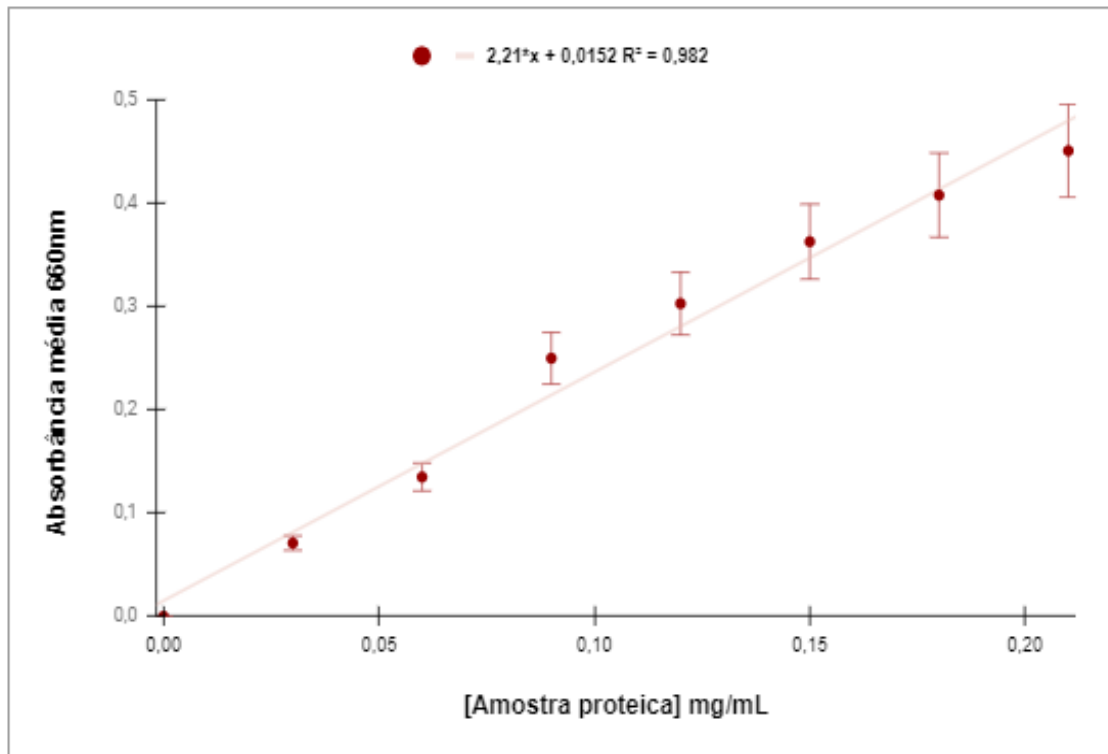
Os valores de absorvância obtidos em cada solução, dado o comprimento de onda de 660 nm e caminho ótico de 1 cm, estão dispostos na tabela abaixo:

Tabela 5- Valores de absorvância em diferentes concentrações de amostra.

Tubos	[Amostra] mg/mL	A1 660nm	A2 660nm	A3 660nm	A4 660nm	Amédia 660nm
1	0	0	0	0	0	0
2	0,03	0,095	0,057	0,065	0,070	0,071
3	0,06	0,152	0,112	0,140	0,137	0,135
4	0,09	0,285	0,222	0,244	0,251	0,250
5	0,12	0,324	0,298	0,292	0,301	0,303
6	0,15	0,388	0,355	0,350	0,360	0,363
7	0,18	0,429	0,397	0,402	0,404	0,408
8	0,21	0,468	0,442	0,439	0,455	0,451

À partir dos valores apresentados na Tabela 5, construiu-se uma curva de analítica de Absorvância Média x Concentração com o auxílio do software Microsoft® Office Excel. A curva analítica, assim como a sua equação podem ser observadas abaixo (Figura 6):

Figura 6 - Curva Analítica para determinação de proteínas totais pelo Método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972)- (Absorbância x Concentração). Cada ponto representa a média de três repetições.



Com o ajuste da curva, determinou-se o coeficiente de absorvidade, identificado como o coeficiente angular da reta. Dessa maneira, o valor do coeficiente foi de $2,21 \text{ (mg/mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ou seja, 1 mg de BSA em um volume de 1 mL apresenta uma absorvidade de 2,21.

5.2 Obtenção da Curva Analítica da Tirosina

Os valores de absorbância obtidos em cada solução, dado o comprimento de onda de 280 nm e caminho óptico de 1 cm, estão dispostos na tabela abaixo:

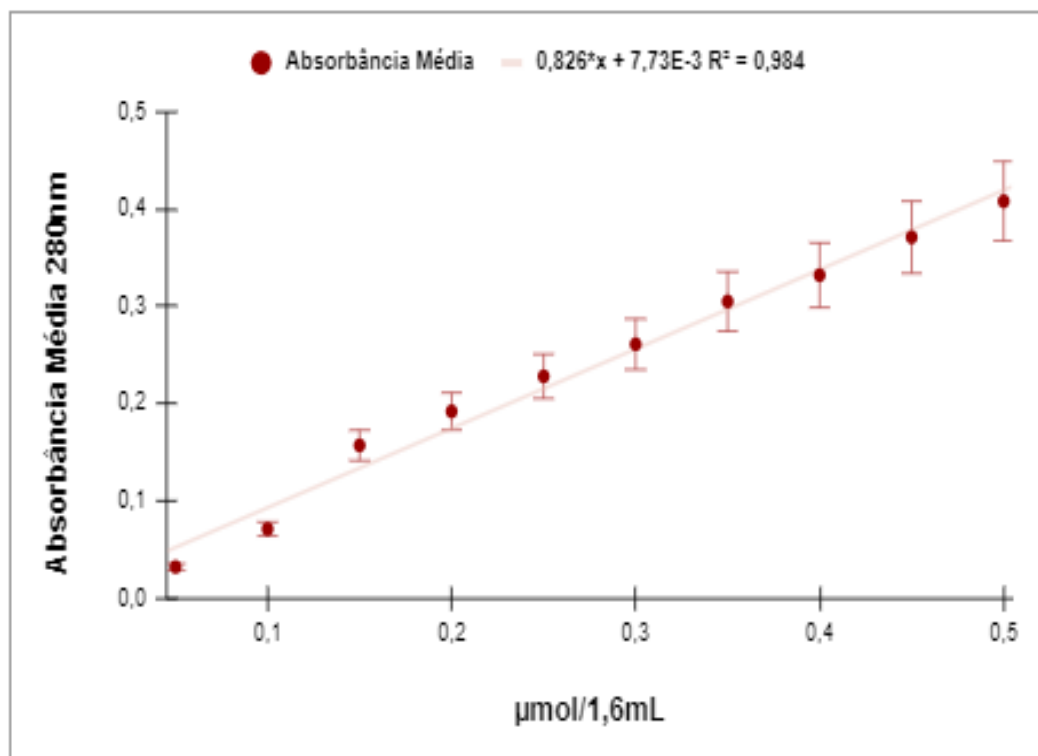
Tabela 6 - Valores de absorvância em diferentes concentrações de amostra de tirosina.

Tubos	$\mu\text{mol}/1,6\text{mL}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	Média
1	-	-	-	-	-	-
2	0,05	0,035	0,030	0,033	0,033	0,032
3	0,1	0,070	0,065	0,078	0,071	0,071
4	0,15	0,157	0,148	0,161	0,164	0,157
5	0,20	0,195	0,183	0,194	0,198	0,192
6	0,25	0,233	0,221	0,230	0,231	0,228
7	0,30	0,265	0,254	0,261	0,264	0,261
8	0,35	0,305	0,324	0,294	0,298	0,305
9	0,40	0,339	0,330	0,330	0,332	0,332
10	0,45	0,381	0,356	0,368	0,380	0,371
11	0,50	0,424	0,402	0,399	0,407	0,408

À partir dos valores apresentados na Tabela 6, construiu-se uma curva de analítica de Absorvância Média x Concentração com o auxílio do software Microsoft® Office Excel. A curva analítica, assim como a sua equação podem ser observadas abaixo:

Figura 7 - Curva Analítica para determinação de tirosina (Absorbância x Concentração).

Cada ponto representa a média de três repetições



Com o ajuste da curva, determinou-se que o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da tirosina foi de $0,826 (\mu\text{mol}/1,6 \text{ mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, que equivale a $1321,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, onde uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de aminoácido por minuto nas condições de ensaio.

5.3 Determinação de proteína no extrato comercial enzimático

5.3.1 Primeiro ensaio enzimático com a enzima livre

Com os resultados obtidos verificou-se no primeiro ensaio enzimático da neutrase livre que sua atividade, ou seja, a quantidade de enzima neutrase que

catalisa a transformação de 1 μmol de tirosina produzida por minuto em 1 mL do extrato pH 7,0 a 50 °C, foi de 27,9 U/mL.

A atividade obtida da protease nos ensaios realizados, foi considerada inferior à obtida por CAVALLARO, 2019 que trabalhou na obtenção de hidrolisados de proteína concentrada de feijão utilizando planejamento experimental. A preparação da protease comercial Neutrase® 0.8L apresentou valor de atividade enzimática igual a 61,963 U/mL, em pH 7,0 e a 50 °C.

5.3.2 Dosagem de proteínas totais

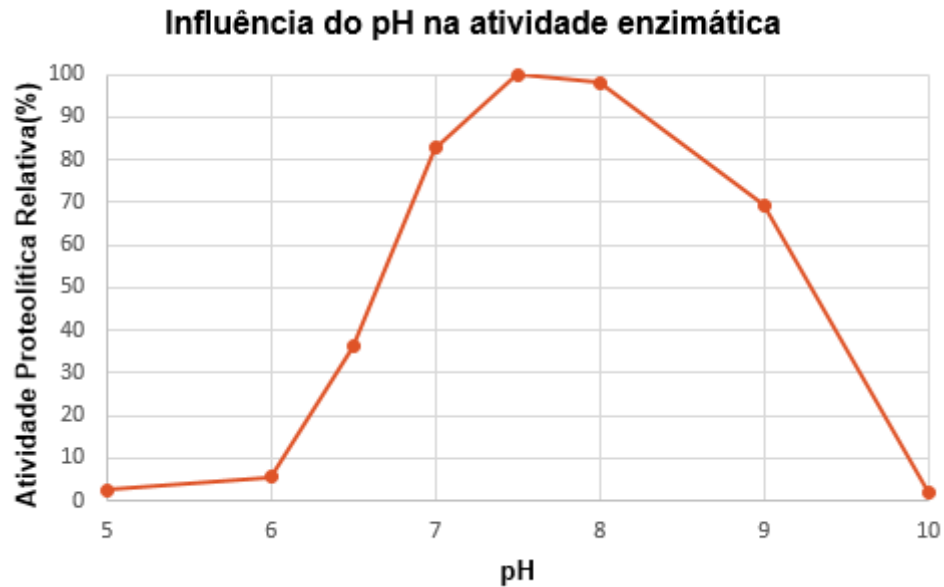
A dosagem de proteínas totais, determinada utilizando albumina de soro bovino como padrão, resultou no final do ensaio o valor de 0,94 mg/mL. Sendo assim, a quantidade 1mg de proteínas totais do correspondeu a aproximadamente 1,06 mL do extrato analisado.

5.4 Influência do pH na atividade enzimática

As alternâncias de pH podem mudar a conformação da enzima, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo (GIONGO, 2006). Desta forma, valores de pH abaixo ou acima do ótimo ocasionam uma baixa atividade da protease. O efeito do pH na atividade enzimática do extrato bruto da enzima está representado na figura 8.

Um aumento da atividade da protease foi observado à partir de valores de pH acima de 6,0, alcançando seu valor máximo em pH 7,5. Posteriormente, a atividade foi reduzindo conforme o aumento da alcalinidade. Em pH 9 a enzima perdeu aproximadamente 30 % de sua atividade original e em pH 10 a sua atividade foi praticamente nula.

Figura 8 - Atividade da protease em função do pH.

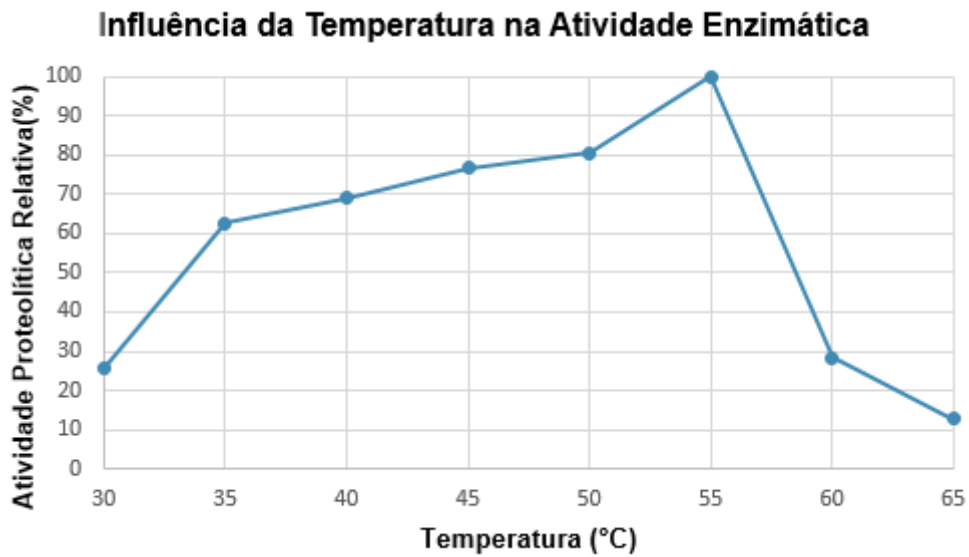


Resultados semelhantes relacionados ao pH ótimo de proteases foram encontrados por vários autores para diferentes microrganismos estudados do gênero *Bacillus*. Sousa *et al.*, (2006) referem-se a uma metaloprotease obtida à partir de *Bacillus Cereus* que apresenta um pH ótimo a 7. Segundo GIONGO (2006), uma protease bruta de *Bacillus* sp. BL16 apresentou atividade máxima em pH 9 e 55 °C. Por outro lado, protease de *Bacillus licheniformis* NH1 demonstrou atividade ótima a 65-70 °C e pH 10-11 (EL HADJ-ALI *et al.*, 2007). De fato, geralmente, proteases produzidas por espécies de *Bacillus* sp. atuam em uma faixa de pH relativamente ampla, de 7 a 11, e em temperaturas de 40-70 °C (ELLAIAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2002; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

5.5 Influência da temperatura na atividade enzimática

Tendo definido o pH ideal para essa enzima foi feita a caracterização em relação à temperatura. A atividade relativa foi obtida a partir da atividade residual, da mesma forma que no cálculo do pH. A figura 9, mostra a influência da temperatura sobre a protease.

Figura 9 - Atividade da protease em função da temperatura.



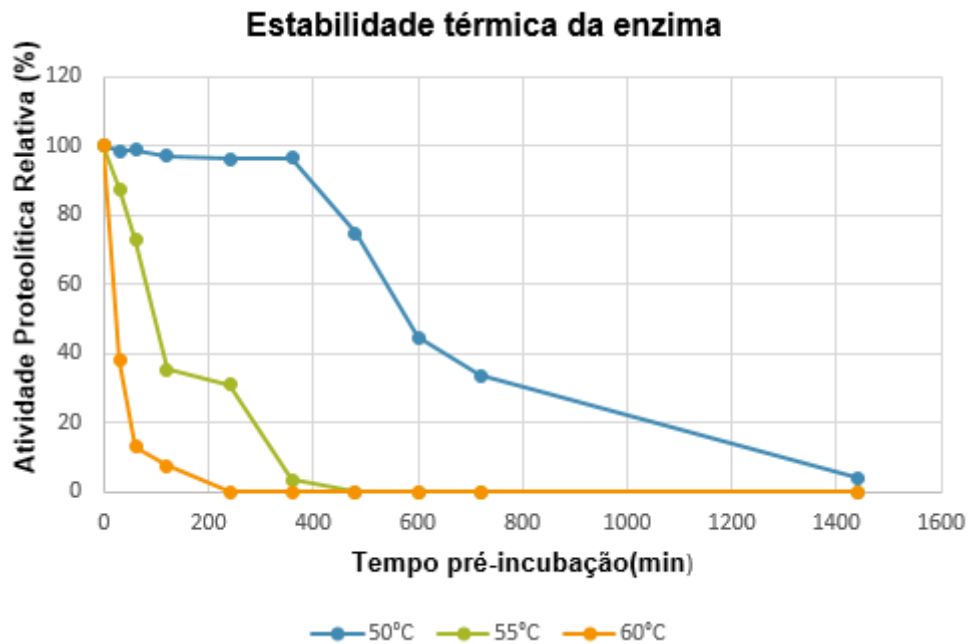
A figura 9 mostra que a protease expressou atividade em todas as temperaturas testadas (30 °C-65 °C), sendo que a temperatura ideal encontrada para a máxima atividade da enzima estudada no extrato bruto é 55 °C. A atividade da protease é crescente até um determinado pico, sendo que a partir deste, decresce devido desnaturação proteica associada ao excesso de temperatura. Sendo assim, percebe-se que a mesma perde aproximadamente 70% de sua atividade na temperatura de 60°C, mostrando um potencial termofílico bem expressivo.

Cabe salientar que cada enzima possui uma temperatura e pH ótimos de atuação, no qual sua atividade é considerada máxima. No entanto, isso não representa que estas condições sejam as que favoreçam sua maior estabilidade.

5.6 Estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da enzima foi estudada, medindo a atividade residual após a pré-incubação da enzima durante diferentes períodos de tempo, a 50, 55 e 60 °C. Os resultados apresentam-se na figura 10 abaixo:

Figura 10 - Estabilidade térmica da enzima a pH 7,5.



A pH 7,5 a enzima é muito estável a 50 °C, mantendo valores de atividade perto de 100% até aproximadamente 7 horas. Na pré-incubação do extrato a 55 °C (temperatura ótima) após 4 horas sua atividade foi reduzida para cerca de 70% da atividade inicial. Por fim, os resultados demonstram que a mesma não é estável a 60 °C, sendo rapidamente desnaturada em aproximadamente 2 horas. Dados da literatura mostram que a estabilidade térmica das proteases está diretamente relacionada com a temperatura ótima a qual é, em geral, ligeiramente inferior a temperatura de desnaturação enzimática.

5.7 Ensaio de inibição e íons metálicos

A fim de se obter maiores conhecimentos sobre a natureza da protease, a atividade enzimática foi determinada na presença de um inibidor específico de metaloproteases, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Tabela 7 - Efeito de um inibidor de protease (1 mM e 10 mM) na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto.

Inibidor	Classe de enzima inibida	Atividade residual (%)
----------	--------------------------	------------------------

Controle (sem inibidor)	-	100
EDTA (1mM)	Metalo	37,35
EDTA (10mM)	Metalo	34,60

Pode-se observar de acordo com a tabela 7 que houve considerável grau de inibição da atividade proteolítica por EDTA 1 mM e 10 mM (62,65 % e 65,40 %, respectivamente), indicando possivelmente a existência de uma metaloprotease no extrato enzimático bruto. Alguns estudos relatam também a inibição parcial de serino proteases por EDTA, indicando a importância de íons metálicos na estabilização da conformação ativa destas enzimas (BOECKLE; GALUNSKY; MUELLER, 1995; NAM *et al.* 2002). Outra possibilidade a ser analisada é que seja uma metaloprotease contendo um resíduo serina no sítio ativo, como a protease de *Clostridium sp.* (ALAM *et al.*, 2005).

A presença de sais no meio reacional pode influenciar na atividade proteolítica. A tabela 8 mostra o efeito de íons metálicos sobre a atividade da enzima neutrase. Conforme a tabela, a presença dos íons Co^{2+} e Zn^{2+} reduziram a atividade enzimática. No entanto, Mg^{2+} , Mn^{2+} tenderam a estimular a atividade, enquanto a presença do sal CaCl_2 aparentemente não apresentou influência.

Em estudos anteriores, perfil similar quanto ao efeito de sais foi observado para a protease bruta de *Bacillus sp.* P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Comparativamente, embora a protease de *Bacillus cereus* BG1 tenha sido inibida por Cu^{2+} e Zn^{2+} , incrementos significativos na atividade enzimática foram observados na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). Especialmente, o efeito de inibição do íon Zn^{2+} já foi observado para metaloproteases devido a formação de pontes entre hidróxido de zinco (ZnOH) e íons de zinco catalítico no sítio ativo (RIFFEL *et al.*, 2007).

Tabela 8 - Efeito de íons na atividade proteolítica do extrato enzimático bruto.

Íon	APR(%)
Controle	100
Mg ²⁺	107,33
Mn ²⁺	118,41
Co ²⁺	82,30
Ca ²⁺	101,85
Zn ²⁺	73,40

Os íons metálicos Ca²⁺ e Mg²⁺ podem estimular a atividade da enzima por proporcionar estabilidade na sua conformação ativa e proteger contra a desnaturação térmica (KUMAR; TAKAGI 1999; CORRÊA; DAROIT; BRANDELLI, 2010). Considerando as particularidades e características de cada enzima, torna-se importante avaliar os efeitos de diferentes íons. Neste sentido, a adição de sais específicos ao meio reacional, principalmente cátions, pode auxiliar na estabilização da protease microbiana por meio de ligações a sítios específicos na estrutura da enzima (SILVEIRA *et al.*, 2010), e assim contribuir para a uma melhor catálise enzimática.

5.8 Imobilização enzimática

Os resultados provenientes do perfil de imobilização da enzima neutrase® podem ser visualizados na tabela 9.

Tabela 9 - Perfil de imobilização da neutrase® em agarose e SM.

Enzima	Atividade Enzimática	Rendimento de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
Neutrase® Livre	27,9 U/mL	-	-
NGA	1,15 U/g	56,19	88,70

NGSM	1,04 U/g	59,65	63,65
------	----------	-------	-------

A enzima neutrase® foi imobilizada covalentemente em dois suportes: glioxil-agarose e glioxil-SM. A reação de imobilização foi cessada após intervalo de 3 horas para ambos os suportes. A imobilização da enzima, em geral, ocorre nos primeiros minutos de contato enzima-suporte. Porém, é necessário um maior tempo de imobilização para permitir um rearranjo da enzima, de forma que ela se estabilize e se ligue por mais pontos ao suporte. A ligação covalente multipontual aumenta a estabilidade da enzima pela rigidificação de sua estrutura tridimensional, o que confere resistência às pequenas mudanças conformacionais causadas por calor, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes. (PEDROCHE *et al.*, 2007).

Os dois derivados apresentaram rendimento de imobilização relativamente próximos de 59,65 % para NGSM e 56,19 % para NGA (tabela 9 acima). Tendo em vista que os valores de rendimento de imobilização para os dois métodos não são expressivamente diferentes, o que mostra que tanto a agarose quanto o sabugo de milho (SM) foram capazes de imobilizar a enzima.

O rendimento de imobilização indica a quantidade em porcentagem da enzima que é imobilizada no suporte. A razão mais óbvia para esses resultados obtidos é que uma quantidade de enzima que está acima da capacidade de ambos os suportes foi utilizada. No entanto, o baixo rendimento de imobilização pode ser associado a outros fatores, como por exemplo, que talvez seja possível que o extrato enzimático bruto utilizado contenha várias enzimas capazes de catalisar a reação e apenas algumas dessas enzimas ficaram imobilizadas no suporte. Logo, a oferta de proteínas disponíveis ao suporte foi bem mais baixa que a esperada inicialmente, o que pode ter comprometido a eficácia do processo de imobilização da enzima.

Para a atividade recuperada, obteve-se 88,7% para agarose e 63,65 % para o sabugo de milho. Este parâmetro, de modo geral, mostra a porcentagem de atividade que é mantida na enzima imobilizada em comparação a atividade da enzima oferecida. O fato do suporte glioxil-agarose ter apresentado uma atividade recuperada maior provavelmente deve-se a diferença na estrutura dos dois suportes, já que a porosidade oferecida ao suporte pela agarose, pode ter favorecido a um maior espaço disponível para arranjo da enzima e ligação com o suporte.

A atividade enzimática da neutrase® livre foi de 27,9 U/mL enquanto a dos derivados NGSM e NGA foram 1,04 U/g e 1,15U/g, respectivamente (tabela 9). A enzima livre mostrou maior atividade catalítica que os derivados, já que provavelmente em decorrência do processo de imobilização, o substrato apresentou acesso limitado ao centro ativo da enzima.

Outro ponto, é que em muitos casos os extratos enzimáticos comerciais líquidos são suplementados com algumas formulações de agentes estabilizantes e, em algumas situações, esses componentes podem interferir na medição da determinação da atividade. Uma maneira mais satisfatória de realizar o experimento seria previamente utilizar a técnica da diálise no extrato enzimático bruto e verificar se tem algum efeito na atividade enzimática e no curso do tempo de imobilização. Caso a diálise possa remover o inibidor, o ideal seria utilizar o extrato dialisado para realizar uma nova imobilização, embora isso possa a gerar alguns problemas relacionados a inativação da enzima durante o processo.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A protease em questão foi caracterizada parcialmente e apresentou uma boa atividade em uma faixa de pH 7,5, valor próximo a neutralidade. A temperatura de atividade ótima foi 55 °C, entretanto, apresentou uma queda brusca de atividade em temperaturas um pouco acima deste valor, fato que evidencia uma possível desnaturação enzimática. Ainda assim, a enzima demonstrou uma ótima estabilidade térmica, mantendo altos níveis de atividade a 50 °C por 7 h, fatores condizentes com a literatura consultada.

Em relação a imobilização, os dois suportes utilizados apresentaram rendimentos próximos a 60 %, evidenciando que tanto a agarose quanto o sabugo de milho foram capazes de imobilizar a enzima. Dentre os processos de imobilização covalentes, o derivado Neutrase-glioxil-agarose (NGA) foi o que apresentou uma maior atividade, 1,15 U/g, fato que pode ser explicado pela característica porosa do próprio suporte. Apesar da atividade relativamente baixa, comparada a enzima livre (27,9 U/mL), a enzima imobilizada tende a favorecer na separação do produto e aumentar a capacidade de reuso, além de possivelmente apresentar uma atividade estável em uma ampla faixa de pH e temperatura.

Essas, dentre outras especificidades, demonstram que a enzima apresenta características de grande interesse para diversos processos industriais voltados, principalmente a tecnologia de alimentos. Dessa forma, esses resultados são promissores, indicando a necessidade de estudos futuros a fim de maximizar a técnica de imobilização, já que cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, além de ser determinado empiricamente pelo processo de erro e acerto, avaliando os parâmetros utilizados durante o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F., *et al.* Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, 2011. v. 46, p. 2301-2310.

ALAM, S. I. *et al.* Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 824-831, 2005.

ASSIS, S. A. *et al.* Estabilização de enzimas: uma abordagem. **Série Ciências Biológicas**, v. 10, n. 2, p. 195-200, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/123459>.

BASSAN, J. C. *et al.* Buffalo cheese whey proteins, identification of a 24 kDa protein and characterization of their hydrolysates: in vitro gastrointestinal digestion. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-18, 2015.

BASSAN, J. C. *et al.* Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potential from whey protein. **Materials**, v. 9, n. 5, 2016.

BEG, Q.K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 294-304, 2003.

BEZERRA, F. B.; NOGUEIRA, J. A. M.; MAMMARELLA, J. E.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B. **Caracterização de um biocatalizador preparado pela imobilização de Neutrase em quitosana**. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012.

BOECKLE, B.; GALUNSKY, B.; MUELLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3705-3710, 1995.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506p, 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. v. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735-1750, 2010.

CAVALLARO, G. **Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para obtenção de peptídeos bioativos**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques and outlooks. **Catalysts**. v. 8, 2018.

CHEN, Z.; WANG, Y.; LIU, W.; WANG, J.; CHEN, H. A Novel Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of Papain and Neutrase Production, Partial Characterization and Application. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 95, p. 650–657, 2017.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Ciências de alimentos), 2006.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2017.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1-6, 2010.

COSTA, L. N. F.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, L. G. S. M.; ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de 37 fermentos biológicos comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*) Dr. Oetker e Dona Benta. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012

CRUZ, C. Z. P. **Imobilização de Alcalase em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos**. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 55; 72-77p. 2017.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DiCOSIMO, R.; McAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6437-6474, 2013.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, jan. 1991.

EL HADJ-ALI, M. *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 515-523, 2007.

ELLIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. A review on microbial alkaline proteases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 61, n. 9, p. 690-704, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

GERMANO, S. *et al.* Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 246-251, 2003.

GIONGO, J.L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GUISÁN, J. M. (Ed). **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2006. 449 p.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; KHAN, S.; Chauhan, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. **Appl. Microbiol Biotechnol.** v. 60, p.381-395, 2002.

GURUMALLESH, P. *et. al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. v. 128 p. 254 - 267.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem...**, England, v.48, p.422-427, 1972.

HASAN, S. M.; SANTOS, J. P.; ZEMPULSKI, M. L. F. GOMES, S. D.; LUCENA, S. L. Otimização da extração de proteases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria. **ENGEVISTA**, v. 16, n. 2, p. 244- 254, 2014.

JISHA, V.N. *et al.* Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, 2013, v.1 , p. 39-51.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

KUNITZ, M. Crystalline trypsin inhibitor II, General properties. **Journal of general Physiology**. v.30, p. 295-310, 1947

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUNELLI, T. **Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto.** Dissertação (Mestrado), 76p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2015.

MATEO C., *et.al.* Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 274–280, 2006.

MOHAMMAD, B.J.; MOHAMMAD, A.M. Production and evaluation of enzyme-modified lighvan cheese using different levels of commercial enzymes. **International Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology**. v.3, p. 11-16, 2020.

MOTYAN, J. A., TOTH, F., TOZSER, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, v. 3, 923–942, 2013.

MURRAY, M-Y. **Comprehensive Biotechnology**. Boston: Elsevier, 2011.

NAM, G. *et al.* Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 6, p. 538-547, 2002.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PEDROCHE, J. *et al.* Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160-1166, 2007.

PESSATO, T. *et al.* Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized alcalase: characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, v. 83, p. 112-120, 2016.

RAO *et al.*, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Rev. Microbiol. Mol. Biol.** v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, G.R.R.M. **Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 77 p. 2007.

SARATH, G.; MOTTE, R. S. D. L.; WAGNER, F. W. Hemoglobin hydrolysis assay. *Proteolytic Enzymes-A Practical Approach*. Oxford IRL Press New York, USA.

SAVITHA *et al.*, Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, 2011. v. 42, p. 298–304.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.1, p.1-17, 2004.

SILVA, E.B. **Estudo da coimobilização de lactase e neutrase em suporte de quitosana: comparação de metodologias visando à hidrólise da lactose e proteínas proveniente do soro de queijo**. Dissertação (Mestrado Ciências Naturais

e Biotecnologia). Universidade Federal de Campina Grande- Campus Cuité- PB, 84 p., 2015.

SILVA, Gislaine A. B. *et al.* Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. V. 03, n. 01; p. 28-41, 2009.

SILVA, R. R. Comment on mRNA-Sequencing analysis reveals transcriptional changes in root of maize seedlings treated with two increasing concentrations of a new biostimulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 2061–2062, 2018a.

SILVA, R. R. Enzymatic Synthesis of Protein Hydrolysates From Animal Proteins: Exploring Microbial Peptidases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 735, 2018b.

SILVA, R. R. Keratinases as an Alternative Method Designed To Solve Keratin Disposal on the Environment: Its Relevance on Agricultural and Environmental Chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 7219-7221, 2018c.

SILVEIRA, S. T. *et al.* Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 548-560, 2010.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.

Sousa, F.; Jus, S.; Erbel, A.; Kokol, V.; Paulo, A.C.; Gubitz, G.M. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 1772–1781, 2006.

SOUZA *et al.*, A biotechnology perspective of fungal proteases. **J. Braz. Microbiol.**, 2015. Jun; 46 (2) p. 337–346.

TAKAMI, H., AKIBA, T., HORIKOSHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, GE, v. 34, p.157-162, 1990.

TARDIOLI, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; Design of New Immobilized-Stabilized Carboxipeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins; **Biotechnology** 19; pp.565-574, 2003.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, p.1-11, 2013.

THYS, R. C. S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium sp. Kr10***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 114p., 2004.

VERMELHO, A. B; NORONHA, E. F; FERREIRA FILHO, E. X; FERRARA, M. A; BON, E. P. S. **Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes**. Rio de Janeiro, 2013. p. 214-235.

WALTER, H.E. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer. H. U. Ed., **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 5, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, p. 270-277, 1984.

WARD, O. P.; RAO M. B.; KULKARNI A. Proteases, production. In: **Encyclopedia of Microbiology**, 3. Ed. San Diego, USA, 2009.