

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE
BACTÉRIAS, LEVEDURAS E FUNGOS
ISOLADOS DOS FRUTOS E GRÃOS DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

MIRIAN PEREIRA RODARTE

2005

59406

050 658

MIRIAN PEREIRA RODARTE

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS, LEVEDURAS E
FUNGOS ISOLADOS DOS FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da UFLA**

Rodarte, Mirian Pereira

Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) / Mirian Pereira Rodarte. —Lavras : UFLA, 2005.

86 p. : il.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Protease. 2. Levedura 3. Fungo. 4. Bactéria I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

MIRIAN PEREIRA RODARTE

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS, LEVEDURAS E
FUNGOS ISOLADOS DOS FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada

UEM

Profa. Dra. Roberta Hisldorf Piccoli

UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

UFLA



Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

*Este trabalho, dedico aos meus "fiéis companheiros",
Luciano e Gabriela*

AGRADECIMENTOS

É preciso parar um pouco, olhar para trás e agradecer a todos que nos ajudam a descobrir novos e gratificantes caminhos:

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela acolhida e direcionamento na Universidade Federal de Lavras.

Aos meus colegas de laboratório, meu carinho.

À Ivani, Cidinha, Magda e Lamartine, obrigada pela paciência em resolver todos os nossos problemas.

Ao professor Disney Ribeiro Dias, pela parceria no conhecimento das proteases.

Aos professores e funcionários da Universidade, pela contribuição neste trabalho.

À Capes, pelo suporte financeiro.

Pelo imenso amor, que me ampara e me faz feliz para trabalhar, agradeço a Deus, meus pais, Gabriela, Luciano e Francis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Enzimas microbianas utilizadas na indústria.....	3
2.2 Obtenção de enzimas.....	6
2.3 Proteases.....	9
2.4 Aplicação de proteases na indústria.....	18
2.4.1 Indústria de detergentes.....	18
2.4.2 Indústria alimentícia.....	20
2.4.3 Indústria farmacêutica.....	23
2.4.4 Outras aplicações.....	23
2.5 Microrganismos produtores de proteases.....	25
2.6 Fatores interferentes na produção de proteases.....	28
2.6.1 Linhagens de microrganismos.....	29
2.6.2 Sistemas de produção.....	31
2.6.3 Purificação enzimática.....	34
2.6.4 Método analítico e substrato utilizados no ensaio enzimático.....	34
2.6.5 Engenharia genética.....	34
2.6.6 Estabilidade das proteases.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Origem e manutenção das culturas.....	38
3.2 Seleção de isolados para atividade proteolítica.....	42
3.3 Preparo do inóculo.....	43
3.4 Produção de proteases.....	44
3.5 Ensaio enzimático para proteases.....	45
3.6 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Seleção de bactérias para produção de proteases.....	46
4.2 Seleção de leveduras para produção de proteases.....	49
4.3 Seleção de fungos filamentosos para produção de proteases.....	51
4.4 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de bactérias.....	54
4.5 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de leveduras.....	60
4.6 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de fungos filamentosos.....	60

4.7 Seleção de bactérias e fungos filamentosos a partir da quantificação proteolítica.....	67
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	83

RESUMO

RODARTE, Mirian Pereira. **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.).** 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, sendo empregadas em diversos setores, como na indústria de detergentes, indústria alimentícia, indústria farmacêutica, tratamento de couro, recuperação de prata em filme de raios X e tratamento de resíduos industriais. Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e encontram-se em todos os organismos vivos, uma vez que realizam funções metabólicas essenciais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de frutos e grãos de café em diferentes valores de pH (3,0; 5,0 e 9,0). Foram utilizados 143 isolados que foram avaliados qualitativamente pelo teste de hidrólise da caseína. O percentual de isolados caseinolíticos foram para bactérias, leveduras e fungos filamentosos, respectivamente 50%, 48,71% e 2,63%. Os isolados caseinolíticos selecionados foram cultivados em meio líquido acrescido de caseína como indutor em frascos sob agitação. O sobrenadante obtido do processo fermentativo após centrifugação ou filtração foi utilizado para a quantificação proteolítica, caracterizando-a nos três valores de pH. Dentre os isolados bacterianos os que apresentaram as maiores atividades proteolíticas foram *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Enterobacter agglomerans*, *Kurthia sp*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Tatumella prytseos*. Apenas um isolado de levedura apresentou atividade proteolítica, não sendo significativa. Dentre os fungos proteolíticos os que apresentaram as maiores atividades foram *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Penicillium fellutanum* e *Penicillium waksmanii*. A maior atividade dentre as bactérias foi produzida por *E. agglomerans* (29,74 UP) e, dentre os fungos filamentosos, por *A. ochraceus* (48,75 UP), ambos em pH 9,0, nas condições do experimento.

*Comitê de orientação: Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora)

ABSTRACT

RODARTE, Mirian Pereira. **Proteolytic activity of bacteria, yeasts and fungi isolated from fruits and coffee grains (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86 p. Dissertation (Master in Agriculture Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Proteases constitute one of most important groups of industrial enzymes and have applications in different sectors such as detergent industry, food industry, pharmaceutical industry, treatment leather, recovery of silver from used x-ray films and treatment industries residues. These enzymes catalyze the hydrolysis reaction of peptides bonds in proteins and are present in organism, where realize metabolic essential functions. The work objective was evaluate proteolytic activity in bacteria, yeasts and fungi isolated from fruits and grains of coffee in different values of pH (3,0; 5,0 e 9,0). Qualitative test of hydrolysis of casein was realized in 143 isolates. The caseinolytic isolates percentage was of bacteria, yeasts and fungi were respectively 50%, 48,71% e 2,63%. Selected caseinolytic isolates were cultured in liquid medium supplemented with casein as inductor in flasks under agitation. The supernatant of fermentation process after centrifugation or filtration was utilized to quantitative proteolytic activity in three values of pH characterization. Isolate bacterial that showed the higher proteolytic activities conform statistic program were: *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Enterobacter agglomerans*, *Kurthia sp*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Tatumella tyseos*. Only one yeast isolate showed proteolytic activity, no significative. Proteolytic fungi that showed the higher proteolytic activities were: *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Penicillium fellutanum* e *Penicillium waksmanii*. Higher bacterial activity was observed by *E. agglomerans* (29,74 UP) e of the fungi by *A. ochraceus* (48,75 UP), both in pH 9,0, in experiment conditions.

Guidance Committee: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática hoje é empregada em diversos setores. A busca por produtos biodegradáveis, que não agridam o meio ambiente, impulsionou o crescimento do emprego de enzimas na indústria. Associado à proteção do meio ambiente, outras características justificam o grande interesse pelo uso de enzimas, como a sua alta especificidade e seu processo de obtenção mais econômico. As enzimas vêm gradativamente ampliando as suas áreas de atuação na indústria, uma vez que a preocupação em preservar o meio ambiente trouxe a busca por novas tecnologias (Moreira et al., 2002; Rao et al., 1998).

As proteases estão entre as enzimas de maior importância no mercado, sendo responsáveis por grande parte da movimentação financeira neste setor. São empregadas na indústria de detergentes, alimentícia, indústria farmacêutica, tratamento de couro, recuperação de prata em filme de raios X e tratamento de resíduos industriais. Com a maior utilização das enzimas na indústria, vem a necessidade de proteases mais específicas que atuem em determinados substratos sem interferir em outros e que possuam características determinadas para o processo em que serão empregadas (Novozymes, 2005).

Os microrganismos são a fonte mais empregada para a obtenção das proteases de uso industrial. As proteases microbianas são obtidas por processos fermentativos (Luna et al., 2002; Poza et al., 2001; Rao et al., 1998). As bactérias, leveduras e fungos proteolíticos são pesquisados a fim de obter novos isolados que sejam bons produtores de proteases e também para aumentar a produtividade e a estabilidade enzimática daqueles que já são conhecidos como proteolíticos (Azeredo et al., 2004; Beg & Gupta, 2003; Braga et al., 1998; Durand-Poussereau & Fevre, 1996; Kitano et al., 2002).

As proteases são enzimas complexas que diferem em suas propriedades como especificidade pelo substrato, sítio ativo e mecanismo de ação (Rao et al.,

1998). As proteases microbianas sofrem interferência de diversos fatores, como linhagens de microrganismo, sistemas de produção, purificação enzimática, método analítico e substrato, utilizados no ensaio enzimático, engenharia genética e presença de fatores que afetam a sua estabilidade no processo industrial (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Braga et al., 1998; Beg et al., 2002; Koka & Weimer, 2000; Pastore, 2002; Poza et al., 2001; Stoner et al., 2004; Yang & Lin, 1998). Esses fatores tornam o estudo das proteases complexo, porém, estimulam a busca por novas proteases que tenham maior ação catalítica além de maior estabilidade, na presença de interferentes, seja durante a sua produção ou em sua aplicação industrial.

A grande diversidade de microrganismos presentes na natureza faz com que as fontes de estudo em busca da seleção e melhoramento de produtores de proteases seja inesgotável. Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias, leveduras e fungos filamentosos proteolíticos que foram isolados dos frutos e grãos de café, quantificar as atividades proteolíticas produzidas pelos microrganismos selecionados e caracterizá-las em diferentes valores de pH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas microbianas utilizadas na indústria

As enzimas são catalisadores biológicos, sendo em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia de ativação de uma determinada reação, tornando assim mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para ser iniciada, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas. As enzimas têm sua atividade determinada pelas características estruturais das proteínas. A seqüência de aminoácidos (estrutura primária) de uma proteína, determina a sua estrutura tridimensional, que por sua vez, determina as suas propriedades. Cada enzima tem seu próprio mecanismo de catálise, uma vez que são altamente específicas (Campbell, 2000; Leningher, 1989).

Além da atividade intracelular, as enzimas podem catalisar transformações extracelulares, principalmente quando a substância alvo apresenta massa molecular elevada para permear a membrana celular. A enzima produzida por um organismo ou célula é liberada no meio extracelular para que atue no substrato de interesse (Oh et al., 2000).

A aplicação industrial de enzimas é amplamente utilizada, sendo obtida a partir de diversos organismos. As enzimas de microrganismos são mais empregadas que aquelas oriundas de vegetais ou animais, uma vez que não estão submetidas a limitações de produção e suprimento (Luna et al., 2002). Além disso, pode-se utilizar técnicas mais simples para a obtenção do produto, são suscetíveis à engenharia genética e possuem menor custo de produção (Pastore, 2002; Silva, 2002).

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado.

Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais. Muitos tratamentos químicos são realizados em altas temperaturas e pressões, utilizando ácidos fortes ou álcalis que significam perigo ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente (Bon, 2002 ; Mitidieri et al., 2002).

A grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida a partir de microrganismos, por processos fermentativos (Rao et al., 1998).

Os microrganismos produzem uma grande variedade de enzimas, muitas são sintetizadas somente em pequenas quantidades e participam nos processos celulares. As enzimas extracelulares são capazes de degradar nutrientes insolúveis, como celulose, proteína e amido. Estes produtos, após hidrólise, são transportados para dentro da célula, onde são usados como nutriente para o crescimento (Oh et al., 2000). Algumas enzimas extracelulares são usadas na indústria alimentícia, farmacêutica e têxtil, sendo produzidas em grandes quantidades pela síntese microbiana (Aleksieva et al., 2000; Benslimane et al., 1995).

As enzimas de origem vegetal que têm encontrado maior aplicação industrial são misturas de proteases usadas na indústria de alimentos, principalmente no amaciamento de carnes e clarificação de cervejas. Essas proteases são obtidas principalmente do látex oriundo de frutos verdes do mamoeiro-papaia (*Carica papaya*) e abacaxi (*Ananas comosus*). As proteases do mamão são comumente chamadas de papaína e as do abacaxi de bromelina (Belitz & Grosch, 1999). A papaína, a bromelina e a ficina, que é obtida a partir

do figo, também estão presentes em medicamentos para diversos fins (Said, 2002).

Há uma série de limitações com relação à manutenção da qualidade de enzimas de origem vegetal, especialmente nos extratos brutos, visto a grande diversidade de tipos de planta e estado de maturação dos frutos ou tecidos que darão origem às enzimas (Rao et al., 1998).

As enzimas de origem animal são obtidas pela maceração do tecido em que são produzidas (geralmente órgãos como o estômago ou o pâncreas), seguida da extração com soluções tampões apropriadas. A suspensão preparada é então submetida a processo de separação sólido-líquido e processada de forma similar ao descrito para as enzimas de origem microbiana (Rao et al., 1998).

A produção de enzimas é avaliada pelo montante de vendas e não pela quantidade produzida. Há grande variação de preços entre as enzimas. Algumas delas têm menor custo quando comparadas às enzimas de uso analítico ou farmacêutico, que são produzidas em menor escala, porém, comercializadas a preços mais elevados. As enzimas são quantificadas pela atividade enzimática de seus preparados e não pela sua massa. O mercado industrial de enzimas é distribuído de acordo com as aplicações enzimáticas. Inicialmente, dependia basicamente da demanda dos setores alimentício e de detergentes, porém, a tendência atual é o surgimento de novos setores usuários e em processos cada vez mais específicos. O mercado das enzimas correspondente ao mercado que hoje se denomina “outros setores” é muito relevante, destacando as enzimas usadas na biotransformação, principalmente em fármacos e nos kits diagnósticos (Pastore, 2002; Said, 2002)

Os produtos comerciais à base de enzimas são formulações complexas que agregam vários aditivos com a finalidade de diluição, estabilização e preservação das enzimas (Ghorbel et al., 2003). A maioria das enzimas industrialmente produzida é de natureza hidrolítica. Dentre as enzimas

hidrolíticas de maior mercado estão as proteases e as lipases (Sant Anna Jr., 2001).

2.2 Obtenção de enzimas

O processo de produção industrial de enzimas de origem microbiana pode ser dividido em duas etapas: processo fermentativo e processo de separação e recuperação das enzimas a partir da fermentação.

O processo fermentativo utilizado industrialmente é realizado baseado em condições otimizadas. A linhagem microbiana deve ser cuidadosamente mantida e estocada e o meio de cultura utilizado é de grande importância para a produção de enzimas. De modo geral, ele contém fontes de carbono, fontes de nitrogênio, fatores de crescimento e micronutrientes podendo utilizar também indutores enzimáticos. A fermentação industrial é realizada em fermentadores operados de modo descontínuo, mecanicamente agitados com sistemas de aquecimento e refrigeração, além de sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e espuma (Sant Anna Jr., 2001).

O processo de separação e recuperação depende inicialmente do tipo de enzima de interesse, intracelular ou extracelular. Para as enzimas extracelulares, o processo de recuperação tem início no líquido fermentado ou, no caso de fermentações em meio sólido, no líquido de extração do substrato. Para as enzimas intracelulares é necessário aplicar algum método prévio de ruptura celular a fim de liberar as enzimas. Em todas as etapas de separação e recuperação das enzimas é necessário manter condições não desnaturantes, isto é, condições nas quais as enzimas não perderão atividade. O custo da produção de enzimas intracelulares é maior que o de enzimas extracelulares e, como consequência, as intracelulares geralmente são utilizadas imobilizadas para que possa realizar a recuperação após o processo. O custo de produção de enzimas está associado não só ao tipo de excreção celular mas também ao grau de pureza

requerido no processo (Pastore, 2002). As enzimas produzidas e secretadas pela célula, ou seja, as exoenzimas, possuem grande interesse comercial, pois sua extração e purificação são menos onerosas (Marquart et al., 2002).

As enzimas microbianas apresentam várias vantagens sobre as enzimas de origem animal ou de plantas, tais como custos de produção relativamente baixos, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas ao hábitat e fisiologia do microrganismo produtor (por exemplo organismos termofílicos produtores de enzimas termorresistentes), possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável. Enzimas com a mesma forma de atuação sob o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a seleção de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas (Pastore, 2002)

Para produzir comercialmente uma enzima, torna-se necessário fazer seleção de microrganismos produtores e otimizar as condições de fermentação para alcançar rentabilidade e eficiência do processo (Schmid et al., 2001; Koeller & Wong, 2001). Diversos fatores devem ser considerados durante a otimização da produção de enzimas, tais como a composição do meio de cultivo do microrganismo e do substrato para produção da enzima, temperatura de incubação, pH do meio de cultivo e de produção, aeração e uso de indutores (Thiry & Cingolani, 2002).

Existem dois tipos básicos de fermentação para a obtenção de enzimas: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação submersa tem sido utilizada na maioria dos processos industriais de obtenção de enzimas (Papagiani et al., 1999). Sendo industrialmente predominante, é beneficiada pela instrumentação e pelo controle de processos, sendo adequada para cultivos de microrganismos recombinantes,

que vêm sendo crescentemente empregados na produção de enzimas (Sant Anna Jr., 2001).

Na fermentação submersa, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração ou centrifugação para remoção das células (Sant Anna Jr., 2001).

Avanços tecnológicos estão sendo gradualmente incorporados à fermentação em estado sólido, tornando-a interessante, principalmente nos países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo (Sant Anna Jr., 2001).

A fermentação em estado sólido é definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência (ou quase) de água livre, podendo ser empregados substratos naturais. A mínima quantidade de água permite a produção de metabólitos mais concentrados, diminuindo assim o tempo e o custo do processo de recuperação da enzima (Pandey et al., 2000).

A fermentação em estado sólido oferece vantagens em relação à submersa, como a obtenção de metabólitos concentrados, facilitando o processo de purificação e a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais, como substratos de fermentação, diminuindo os custos de produção relacionados ao meio de cultivo (Mitchell et al., 2000a; Mitchell et al., 2000b).

Na maioria das situações comerciais, o caldo fermentado é processado para recuperação das enzimas do caldo ou da massa celular. A seguir a enzima é purificada até o grau desejado. A finalidade de utilização e comercialização da enzima é que irá determinar o seu grau de purificação final, uma vez que os processos de purificação são normalmente onerosos. As enzimas destinadas à utilização na produção de detergentes podem ter grau de purificação menor enquanto que as enzimas destinadas à utilização na área de saúde ou alimentícia precisam ter grau de purificação maior e, portanto, são mais caras (Pastore, 2002; Sant Anna Jr., 2001).

É fundamental considerar que qualquer técnica de recuperação e purificação empregada deve, além de permitir recuperar a proteína em sua forma mais pura, proporcionar a obtenção da proteína na forma ativa, ou seja, a enzima não pode perder sua atividade (Sant Anna Jr., 2001).

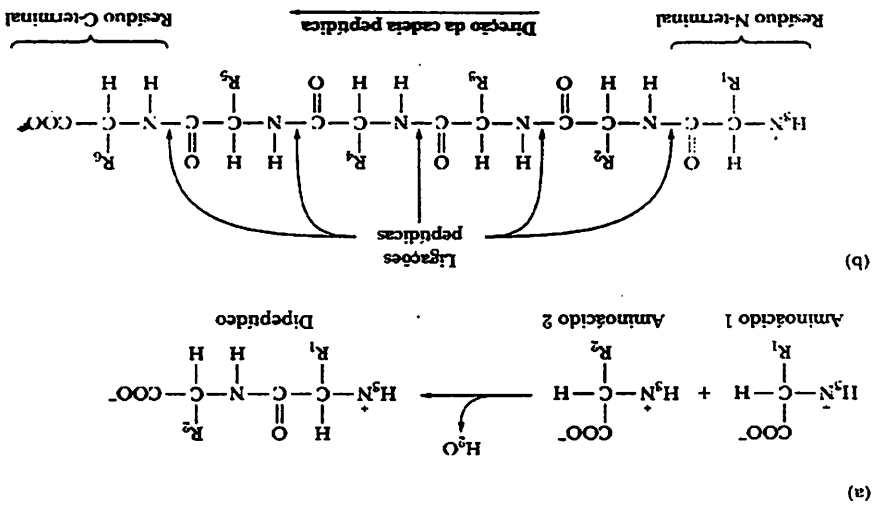
2.3 Proteases

São enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (Rao et al., 1998). As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A seqüência destes aminoácidos pode conferir às proteínas atividades metabólicas específicas. A seqüência de aminoácidos é determinada pelo genoma da célula. Quanto maior forem as forças que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas, mais difícil será a ação das proteases (Figura 1, Campbell, 2000).

Encontram-se em todos os organismos vivos, uma vez que conduzem funções metabólicas e essenciais. De maneira geral, as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de várias proteínas para moléculas menores e serão subsequentemente absorvidas pelas células, enquanto as proteases intracelulares têm importante papel na regulação do metabolismo (Rao et al., 1998).

As proteases têm importante papel em todos os processos fisiológicos, indo da quebra geral de proteína para nutriente à regulação da morte celular programada. É a única classe de enzimas que ocupa posição de destaque nos campos fisiológico e comercial. Sua grande diversidade e variação específica de ação têm atraído a atenção de biotecnologistas em todo o mundo (Poza et al., 2001).

FIGURA 1 A ligação peptídica (a) : a formação da ligação peptídica (b); um pequeno peptídeo mostrando a direção da cadeia (Campbell, 2000)



As enzimas proteolíticas estão entre os mais importantes grupos de enzimas industriais e representam aproximadamente 60% do mercado de enzimas, porém sua produção está concentrada em poucas empresas que dominam o mercado (Figura 2, Tabela 1) (Escobar et al., 1993; Germano et al., 2003; Moreira et al., 2002; Rao et al., 1998)

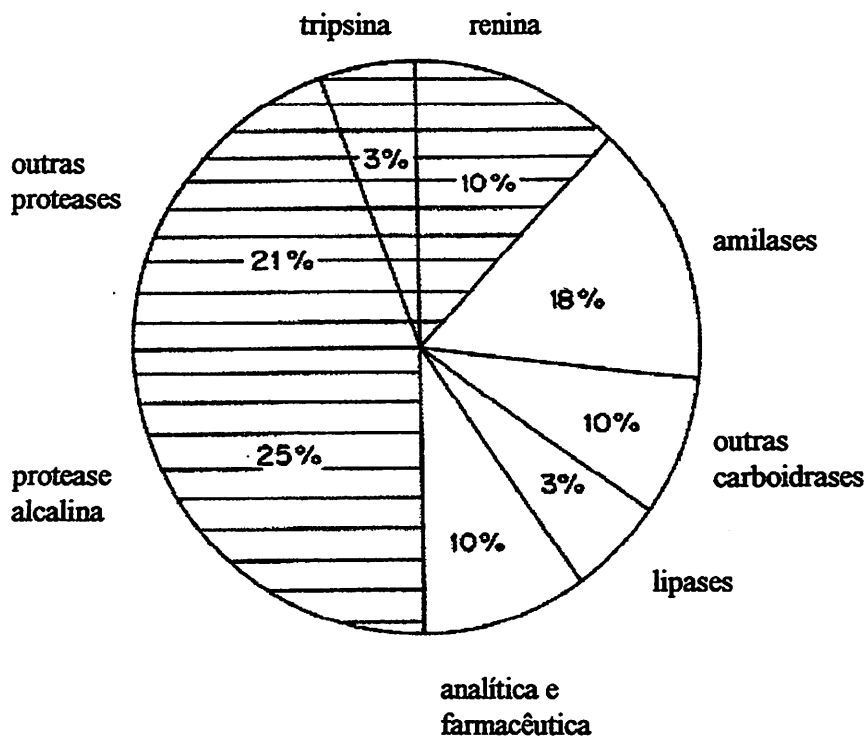


FIGURA 2 Mercado mundial de enzimas industriais (Rao et al., 1998)

TABELA 1 Maiores produtores mundiais de proteases

Empresa	País	Fração do mercado
Novo Industries	Dinamarca	40%
Gist Brocades	Holanda	20%
Genencor International	Estados Unidos	10%
Mites Laboratories	Estados Unidos	10%
Outras		20%

Fonte Rao et al., 1998

A maior aplicação de proteases ocorre na indústria de detergentes, processamento de carne e queijo, recuperação de prata em filme fotográfico, produção de medicamentos, processamento de resíduos proteínáceos, síntese de peptídeos (Andrade et al., 2002; Bakhtiar et al., 2002; Germano et al., 2003; Ghorbel et al., 2003; Longo et al., 1999).

As proteases vegetais mais conhecidas são a papaína e a bromelina, das quais a papaína tem longa história de uso. São ativas em pH 5,0 a 9,0 e estáveis às temperaturas de 80°C a 90°C. A performance da enzima depende da fonte da planta, das condições climáticas para o crescimento e os métodos usados para sua extração e purificação (Rao et al., 1998). A bromelina é uma cisteína-endopeptidase, ativa a pH 5,0 a 9,0, estável à temperatura de 70°C (Rao et al., 1998). É empregada na indústria alimentícia (Belitz & Grosch, 1999) e farmacêutica (Said, 2002). Podem ser empregadas na fabricação de queijos, como por exemplo, a utilização de extrato obtido a partir de flores e frutos de *Cynara cardunculus L* que é utilizado em produções artesanais. Extratos

vegetais obtidos a partir de outros vegetais estão sendo estudados para utilização na coagulação do leite (Duarte et al., 2002).

As proteases de origem animal podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, as mais empregadas são a tripsina e a quimotripsina (Neto, 2001; Said, 2002) e também na indústria alimentícia (Rao et al., 1998). As de origem microbiana são preferidas às de origem animal ou de plantas por possuir todas as características desejadas para aplicação em biotecnologia (Rao et al., 1998).

As proteases produzidas por determinado organismo podem inibir a ação de outras enzimas, uma vez que estas são proteínas (Azeredo et al., 2001; Rajmohan et al., 2002). Dividem-se em três grupos: proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas possuem atividade em pH 2,0 a 5,0 e as neutras possuem atividade em pH 6,0 a 9,0. O terceiro grupo, é formado pelas proteases alcalinas que tem atividade em pH 9,0 a 11,0 (Guerra, 1991).

São designadas como peptidases, indicando que elas hidrolisam ligações peptídicas. Aquelas que requerem a presença de região N ou C terminal no substrato são exopeptidases (anteriormente nomeadas como proteases) e as que não requerem são endopeptidases (anteriormente designadas proteinases). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença desses grupos terminais tem efeito negativo na atividade da enzima (NC-IUBMB, 2005; Sterchi & Stocker, 1999). A nomenclatura das peptidases é difícil; sua especificidade dificulta a definição, que é dependente da natureza de vários resíduos de aminoácidos ao redor da ligação peptídica serem hidrolisados e também da conformação da cadeia polipeptídica do substrato. Em consequência disso, a classificação envolvendo critérios adicionais do mecanismo de catálise é utilizada. Os termos protease e proteinase ainda são empregados para a capacidade da enzima hidrolisar peptídeos, mas sugere-se que sejam

substituídos, respectivamente, por exopeptidases e endopeptidases, ou simplesmente peptidases (NC-IUBMB, 2005).

Todas as hidrolases são designadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (2005) como E.C.3. e as peptidases como E.C.3.4. As principais classes de peptidases são definidas por um terceiro numeral, conforme Tabela 2.

TABELA 2 Tipos de peptidases definidas na Lista de Nomenclatura de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (2005)

Número Comissão Enzimas (EC)	Tipo de peptidase	Ação
EXOPEPTIDASES		
• 3.4.11.-	Amino peptidase	um único resíduo N-terminal liberado
3.4.13.-	Dipeptidases	ataca somente dipeptídeos
3.4.14.-	Dipeptidil peptidase	dipeptídeo N-terminal liberado
	Tripeptidil peptidase	tripeptídeo N-terminal liberado
3.4.15.-	Peptidil dipeptidase	dipeptídeo C-terminal liberado
3.4.16.-	Serina-carboxipeptidase	
3.4.17.-	Metalo-carboxipeptidase	
3.4.18.-	Cisteína-carboxipeptidase	
3.4.19.-	Omega peptidase	liberam resíduos modificados de N- ou C-terminal
ENDOPEPTIDASES		
3.4.21.-	Serina-endopeptidase	
3.4.22.-	Cisteína-endopeptidase	
3.4.23.-	Aspártico-endopeptidase	
3.4.24.-	Metalo-endopeptidase	
3.4.25.-	Treonina-endopeptidase	
3.4.99.-	Endopeptidases com mecanismo de catálise desconhecido	

As exopeptidases removem único aminoácido, dipeptídeo ou tripeptídeo de uma ou outra região terminal; estas ações são a base para a classificação das exopeptidases. Considerações similares de especificidade não podem ser empregadas para endopeptidases, que são melhor distinguidas pelo seu sítio ativo, resultando em cinco classes: serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina-endopeptidase. As serina-endopeptidases possuem resíduo de serina no seu centro-ativo, cisteína-endopeptidases resíduo de cisteína; as aspártico-endopeptidases; duas unidades de ácido aspártico; as metalo-endopeptidases necessitam de íon metálico, geralmente um cátion bivalente no seu mecanismo catalítico e as treonina-endopeptidases possuem resíduo de treonina no seu centro ativo (Sterchi & Stocker, 1999). Os cinco tipos de sítio ativos das endopeptidases foram reconhecidos primeiro pelo uso de alguns inibidores grupo-específicos.

As serina-endopeptidases são proteases alcalinas exercendo sua atividade na faixa de pH 7 a 11. Podem ser obtidas a partir de fonte animais, como, por exemplo, a tripsina ou a partir de bactérias e fungos. Existe grande número de bactérias e fungos capazes de produzir essas proteases: *Bacillus cereus*, *B. firmus*, *B.licheniformis*, *B.megaterium*, *B. subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces fradiae*, *S. griseus*, *Tritirachium album*, *Aspergillus flavus*, *A. oryzae* e *A sojae*. Para sua caracterização, utilizam-se inibidores específicos, como, por exemplo, diisopropilfluorofosfato (DIFP) ou fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF). Esses reagentes inibem o resíduo serina presente no sítio ativo da enzima (Belitz & Grosch, 1999; Rao et al., 1998).

As cisteína-endopeptidases são representadas pela papaína, bromelina e outras proteases de origem microbiana. Essas enzimas são ativas em larga faixa de pH, dependendo do substrato, de 4,5 a 10, com o máximo de atividade em 6,0-7,5. São altamente sensíveis a agentes oxidantes (Rao et al., 1998; Belitz & Grosch, 1999).

As metalo-endopeptidases podem ser obtidas por diversos fungos e bactérias, como *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *Streptomyces griseus* e *Aspergillus oryzae*. São ativas em pH 6,0-9,0, e sua especificidade é geralmente baixa. São inibidas por agentes quelantes, como, por exemplo, EDTA (Belitz & Grosch, 1999; Rao et al., 1998).

As aspártico-endopeptidases são representadas pela pepsina, renina e outras proteases obtidas principalmente a partir dos fungos, *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium ssp* e *Mucor ssp*. São ativas em pH ácido, dependendo do substrato e da fonte da enzima. Como inibidores específicos dessa protease, um dos mais utilizados para sua caracterização é a pepstatina (Belitz & Grosch, 1999; Rao et al., 1998).

Em síntese, as proteases são classificadas como endo ou exopeptidases com base no sítio de ação no substrato protéico. São categorizadas como serina, aspártico, cisteína, metalo ou treonina-endopeptidase, dependendo de seu sítio ativo. São classificadas também em diferentes famílias, dependendo de sua seqüência de aminoácidos e afinidade evolucionária. Baseando-se em seu pH ótimo, elas também podem ser referidas como ácidas, básicas ou alcalinas.

O mecanismo de ação de proteases tem sido objeto de grande interesse para pesquisa. A purificação das proteases é pré-requisito para estudar seu mecanismo de ação. Diversos procedimentos de purificação, como cromatografia e técnicas de filtração em gel, são estudados e empregados (Rao et al., 1998; Hudadilok-Towatana et al., 1999; Beg et al., 2003; Bentsio et al., 2003).

2.4 Aplicação das proteases na indústria

2.4.1 Indústria de detergentes

As proteases são muito usadas como aditivo na indústria de detergentes desde 1914. Após 30 anos do início da sua aplicação, sua importância passou de aditivo menor para a de maior ingrediente chave na indústria de detergentes (Beg & Gupta, 2003). A preocupação com o meio ambiente e a necessidade de desenvolvimento de detergentes para uso especializado levaram os fabricantes a reavaliar as formulações existentes. As formulações atuais substituíram por enzimas, que são biodegradáveis, muitos dos ingredientes que agrediam o meio ambiente, provocavam desgaste de materiais e instrumentos, mantendo o mesmo desempenho (Mitidieri et al., 2002). Várias proteases detergentes são empregadas no mercado como Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN, Alcalase, Esperase e Savinase. Estas enzimas apresentam estabilidade na presença de vários componentes da formulação de detergentes e são ativas à temperatura de lavagem e condições de pH (Beg & Gupta, 2003).

As proteases detergentes são usadas em lavanderia doméstica, máquina para lavar louça, limpeza industrial e institucional. Manchas protéicas como sangue, alimentos e suor, são removidas por proteólise (Gupta et al., 2002; Rao, 1998). As proteases possuem grande aplicação em formulações para uso hospitalar, devido a sua capacidade de digerir e dissolver resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, suor e outros). As formulações são empregadas para higienizar as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruir canais com resíduos coagulados, eliminar resíduos fecais dos canais e superfícies de fibroscópios, remover contaminantes da roupa hospitalar (Mitidieri et al., 2002).

A adição de proteases, juntamente com amilases, celulasas e lipases, contribui para melhorar a eficiência de limpeza dos detergentes. O uso de enzimas em detergentes não é tão simples, ao lado de temperatura alta e

alcalinidade, a enzima deve resistir à presença de detergentes iônicos e não iônicos, surfactantes, clarificantes e agentes quelantes (Gupta et al., 2002 e Rao, 1998).

Geralmente, as enzimas usadas como aditivos em detergentes são alcalinas e termoestáveis, uma vez que o pH dos detergentes varia de 9,0 a 12,0 e a temperatura de lavagem de 50°C a 70°C (Beg & Gupta., 2003).

A termoestabilidade não tem sido problema significativa e a tolerância alcalina é inerente a proteases alcalinas de bacilos alcalifílicos. Para serem usadas como aditivo em detergente, requerem outras modificações na composição do detergente e ou melhoria da enzima por mutagênese. As características das proteases alcalinas que têm sido modificadas por mutagênese são a dependência a íons cálcio para sua estabilidade e sensibilidade à oxidação (Yang & Lin, 2000).

A estabilidade da enzima na presença de EDTA é vantajosa para uso da enzima como aditivo em detergente, uma vez que detergentes contêm altas quantidades de agentes quelantes que tornam a água mole e também auxiliam na remoção da sujeira. Estes agentes ligam-se a íons metálicos, tornando-os indisponíveis na solução detergente (Rao et al., 1998).

Como a ação das proteases é influenciada por vários fatores, como pH do detergente, força iônica, temperatura de lavagem, composição do detergente e sistema de branqueamento, o maior desafio no emprego de enzimas em detergentes é a sua estabilidade. Há sempre a necessidade de novas enzimas com propriedades que possam promover melhoramento no desempenho de lavagem dos detergentes atuais baseados em enzimas. Nos últimos anos, a estabilidade das proteases utilizadas na indústria de detergentes é aumentada utilizando técnicas de engenharia genética (Gupta et al., 2002; Çalik et al., 2003; Rao et al., 1998). Além da melhoria da estabilidade o uso de recombinantes também

aumenta o rendimento da protease extracelular no meio de fermentação (Rao, 1998).

A estabilidade a agentes branqueadores e oxidantes de muitas proteases comerciais, como Durazym, Maxapem e Purafect, é obtida por mutagênese na posição direcionada por técnicas de engenharia protéica (Gupta, 2002; Rao et al., 1998).

2.4.2 Indústria alimentícia

A proteólise tem grande influência no desenvolvimento do sabor e aroma e na textura de muitas variedades de queijos. Os aminoácidos livres contribuem diretamente, ou como substrato para outros compostos, que também contribuem para o desenvolvimento do sabor e aroma durante o processo de maturação de queijos (Fox & Wallace, 1997; Kilcawley et al., 2002). Os peptídios amargos podem gerar sabores indesejáveis, sendo de grande importância a capacidade da microbiota envolvida na fermentação de queijos hidrolisar estes peptídios. Estudos têm sido realizados com o objetivo de selecionar espécies de bactérias ácido-láticas e levedura, que possam ser empregadas no processo de maturação de queijos (Bentsio et al., 2003).

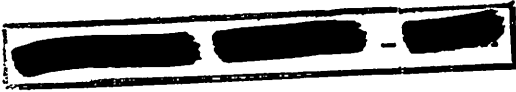
As proteases são também empregadas na produção industrial de biscoitos como condicionadores de massa que irão enfraquecer o glúten, tornando a massa adequada às etapas de laminação, formação e cozimento, podendo ser usadas para substituir o bissulfito de sódio (Bruno, 1989). Na panificação, também são utilizadas para hidrolisar o glúten para a obtenção de massa macia. As características da massa dependem do estado das proteínas presentes. Durante a sua preparação, essas proteínas formam uma rede que é responsável pelas características de elasticidade da massa. A rede do glúten é formada por pontes dissulfeto, e quanto maior o número dessas ligações, mais difícil é trabalhar a massa. As proteases modificam essas redes pela quebra das

ligações peptídicas. A extensão da quebra depende do tipo de protease utilizada, da sua concentração e do tempo de reação. A clivagem enzimática permite a formação de grupos NH e CO₂H. Esses grupos podem reagir com o açúcar usado na formulação ou produzido pela alfa-amilase, sendo responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e da cor característicos do pão (Lyons, 1988)

Na indústria de carne, as proteases são utilizadas no processo de tenderização (Germano et al., 2003). As enzimas proteolíticas degradam a estrutura das proteínas, sendo obtidas a partir de plantas ou microrganismos (Belitz & Grosch, 1999). As proteases derivadas de plantas, como a bromelina (abacaxi) e a ficina (figo) são usadas na tenderização de carnes. Entretanto, essas enzimas degradam a textura da carne devido à sua ampla especificidade pelos substratos, conduzindo a um gosto desagradável devido ao excesso de tenderização (Cronlund & Woychik, 1986). O ideal de uma enzima proteolítica para utilização na tenderização de carnes é que ela possua afinidade específica pelo colágeno e elastina presentes nos tecidos e que seja estável ao pH do processo e às temperaturas de armazenamento e cozimento da carne (Cronlund & Woychik, 1987).

A utilização das proteases para produção de oligopeptídeos é alternativa viável ao tratamento químico. A limitação ocorre devido à especificidade das proteases e à instabilidade a solventes orgânicos. Estudos são realizados com o objetivo de solucionar estes problemas, seja pela investigação de métodos de estabilização da enzima ou pelo isolamento de microrganismos que produzam uma protease estável na presença dos solventes orgânicos (Ghorbel et al., 2003).

A aplicação de hidrólise enzimática às proteínas tem sido uma das principais áreas de pesquisa. As proteínas podem ter a sua funcionalidade tanto incrementada quanto diminuída, dependendo do grau de hidrólise aplicado (Furtado et al., 2001)



O uso das enzimas proteolíticas permite a produção de hidrolisados protéicos, com diferentes estruturas moleculares, de grande valor para o desenvolvimento de características específicas, funcionais ou nutritivas, em produtos alimentares (Ferreira et al., 2002)

O valor nutricional dos hidrolisados depende da proteína de origem, do tipo de hidrólise (enzimática ou química) e do tamanho da cadeia polipeptídica (Carreira et al., 2003)

Ao hidrolisar as proteínas em peptídios e aminoácidos, facilita-se a sua absorção pelas células, devido à ação despolimerizante (Lozano et al., 1994). A introdução na dieta de hidrolisados ricos em pequenos peptídios propicia melhor utilização das proteínas, principalmente em indivíduos com alergias a determinadas proteínas ou com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática (González-Tello et al., 1994).

Carreira et al. (2003), utilizando a pepsina, obtiveram hidrolisado de caseína, que apresentou alto valor nutricional e elevada susceptibilidade à ação catalítica de todas as proteases conhecidas. As proteases podem ser usadas para a obtenção de aspartame, que é um dipeptídio utilizado como edulcorante (Lu & Chang, 1996). São utilizadas também para hidrolisar as proteínas que são responsáveis pela turvação da cerveja (OgrydziaK, 1993) e também propiciam ainda uma maior disponibilidade de nutrientes que são utilizados pelos microrganismos empregados no processo de produção (Novozymes, 2005)

2.4.3 Indústria farmacêutica

As proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de microrganismos patogênicos. Esses fatores tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (Campbell, 2000; Koelsch et al., 2000; Vermelho et al., 1996; Vermelho et al., 2002). Como exemplo, podem ser citadas as pesquisas de inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que esta enzima é essencial para a produção de novas partículas virais nas células infectadas (Campbell, 2000). As de origem vegetal como papaína e bromelina e animal como tripsina e quimotripsina, estão contidas em medicamentos para diversos fins (Said, 2002).

2.4.4 Outras aplicações

a) Tratamento de couro

Atualmente, procura-se desenvolver tecnologias que não provoquem distúrbios ambientais, como a utilização de proteases no tratamento do couro em substituição a compostos tóxicos e poluentes (Moreira et al., 2002; Rao et al., 1998)

Considerando que uma das primeiras aplicações de enzimas industriais foi na maceração de couros, a tecnologia enzimática progrediu lentamente na indústria de couro quando comparada a outros setores. Muitos curtidores de couro temem que as proteases possam destruir o couro, porém, as que são encontradas hoje no mercado são altamente específicas, atacando somente proteínas-chave (Novozymes, 2005).

A seleção da enzima a ser empregada depende da especificidade da proteína que será degradada e a quantidade de enzima depende do tipo de couro (leve ou pesado) (Rao et al., 1998).

b) Recuperação de prata em filme de raios X

Os resíduos de prata gerados nos processos fotoquímicos em hospitais, clínicas de radiologia, laboratórios fotográficos, indústrias e gráficas devem ser recuperados antes da disposição dos efluentes. As proteases podem ser empregadas na recuperação de prata em filmes (Bakhtiar et al., 2002; Horikoshi, 1999). A recuperação da prata é importante, do ponto de vista ambiental e econômico, uma vez que, se o efluente não for tratado, irá contaminar os rios com resíduos de prata entre outros. Economicamente, há um grande interesse na recuperação da prata, devido ao alto valor agregado a este resíduo. Fujiwara et al. (1987, 1991) e Ishikawa et al. (1993) relataram o uso de uma protease alcalina para decompor a camada gelatinosa contida em filme de raios X, no qual a prata foi recuperada.

c) Tecnologia ambiental

Os extratos enzimáticos que contêm apreciável atividade lipásica, proteásica e amilácea podem ser usados para o tratamento prévio de efluentes industriais. Esses extratos atuam como coadjuvantes dos processos biológicos de tratamento de efluentes, degradando os materiais gordurosos, protéicos e amiláceos. Essa etapa de hidrólise enzimática realizada antes do tratamento biológico convencional (aeróbio ou anaeróbio) contribui para aumentar o desempenho do tratamento de efluentes (Sant Anna Jr. & Freire, 2002)

2.5 Microrganismos produtores de proteases

Muitas indústrias são favoráveis à seleção de microrganismos de ocorrência natural, uma vez que os produtos deles oriundos são mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização do que os produzidos por manipulação genética. Vários grupos de microrganismos são capazes de produzir proteases por processos de fermentação devido ao seu crescimento rápido. Microrganismos também são preferidos em relação a plantas e animais, devido à sua facilidade de manipulação genética, gerando novas enzimas com uma característica específica ou simplesmente para superprodução da enzima (Luna et al., 2002; Poza et al., 2001; Rao et al., 1998).

As proteases microbianas são importantes porque elas atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia (Barata et al., 2002).

As alcalinas comerciais de microrganismos geralmente têm atividade máxima em pH variando de 8,0 a 12,0 (Gupta et al., 2002; Rao et al., 1998). Essas enzimas têm um grande potencial para aplicação em detergente e indústria de couro, devido ao valor de seu pH ótimo e estabilidade a altas temperaturas (Rao et al., 1998)

As proteases de origem bacteriana são muito usadas na indústria, porém requerem custo intensivo na metodologia de filtração para obter a preparação enzimática livre do microrganismo, enquanto que, nas proteases de origem fúngica, o micélio é facilmente removido por filtração (Phadataré et al., 1993).

Embora muitos microrganismos sejam capazes de produzir proteases, o gênero *Bacillus* é destacado na pesquisa e na aplicação industrial. A maioria das serina-endopeptidases comerciais, principalmente as alcalinas e as neutras, é produzida por *Bacillus* (Mendonça, 1995).

As bacterianas neutras são ativas em pH 5,0 a 7,0 e possuem termotolerância. As proteases neutras são metalo-endopeptidases e requerem íon

metal divalente para sua atividade, enquanto outras são serina-endopeptidases, que não são afetadas por agentes quelantes (Rao et al., 1998).

As alcalinas são caracterizadas pela sua alta atividade em pH alcalino e sua ampla especificidade por substratos. Sua temperatura ótima é acima de 60°C. As proteases alcalinas têm um grande potencial para aplicação em detergentes e indústria de couro devido ao seu pH ótimo e sua termotolerância (Moreira et al., 2002; Rao et al., 1998).

O gênero *Bacillus* apresenta um número de espécies importantes industrialmente na produção de proteases, como *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefacies*, *B. thermoproteolyticus* e *B. licheniformis*. Aproximadamente metade da atual produção de proteases deriva de isolados de *Bacillus sp.* Linhagens de *Bacillus subtilis* representam a maior fonte de protease alcalina comercial do mundo (Beg & Gupta, 2003).

Enzimas proteolíticas são indispensáveis para o metabolismo de nitrogênio de bactérias ácido-láticas e também nos processos de produção da indústria alimentícia, como na maturação de queijos. Como consequência, várias proteases têm sido isoladas e caracterizadas a partir de bactérias ácido láticas e utilizadas na fabricação de queijos (Gobbetti et al., 1996).

Os actinomicetos são capazes de degradar macromoléculas em solos, sendo eficientes na quebra de proteínas (Tsujibo et al., 1990). *Streptomyces* é a espécie mais importante dentro dos actinomicetos, devido a sua capacidade de produzir numerosos metabólitos secundários, em especial antibióticos. A capacidade deste grupo de bactérias de produzir uma grande quantidade de enzimas, como proteases com especificidade para vários substratos, faz dela um potencial para utilização comercial. Azeredo et al. (2004) estudaram proteases termofilicas de *Streptomyces sp* isolados do solo do cerrado brasileiro, uma vez que a microbiota dos solos constitui uma excelente fonte de novas enzimas.

A alta atividade proteolítica em leveduras é relativamente rara (Ogrydziak, 1993). Entretanto, Poza et al. (2001) relataram que a levedura *Candida caseinolytica* apresentou alta atividade proteolítica quando cultivada em meio de cultura constituído em g/L por extrato de carne 3g, triptona 5g, glicose 1g e leite em pó desnatado (Nestlé S/A). A protease sintetizada por esta levedura apresentou ação numa ampla variação de pH (4,5 a 11). Segundo Poza et al. (2001), as características das proteases produzidas pela *C. caseinolytica* sugerem a sua aplicação na indústria de cerveja e, ainda, eventualmente, possuir aplicação na elaboração de certos tipos de detergentes (baixa temperatura) ou na indústria de pele ou couro devido à sua capacidade de proteólise a valores de pH extremos (acima de 12).

As proteases obtidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente da fermentação industrial de cerveja foram utilizadas na massa de pão, mostrando que as proteases liofilizadas da levedura apresentaram ação comparável à de uma enzima bacteriana comercial nas condições do experimento (Ponezi, 1997).

As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, considerando que a produção de enzima é normalmente extracelular, tornando mais fácil a sua recuperação no processo fermentativo (Germano et al., 2003). Muitos trabalhos relatam a biossíntese de proteases pelos gêneros *Aspergillus* (Kitano et al., 2002; Yang & Lin, 1998); *Penicillium* (Durand-Poussereau & Fevre, 1996; Germano et al., 2003); *Rhizopus* (Farley & Ikasari, 1992), *Humicola* (Aleksieva et al., 2000); *Mucor* (Andrade et al., 2002) e *Fusarium* (Barata et al., 2002).

Os fungos produzem uma maior variedade de enzimas que bactérias, podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e atuam em uma ampla variedade de substrato. Porém,

geralmente apresentam uma menor velocidade de reação e uma pior termotolerância (Rao et al., 1998).

As proteinases ácidas de importância comercial são geralmente de origem fúngica e são todas enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos, principalmente em tenderização de carnes, produções de alimentos fermentados e na indústria de laticínios (Aleksieva et al., 2000). Possuem um pH ótimo pH 4,0 a 4,5 e são estáveis entre pH 2,5 a 6,0. São empregadas na fabricação de queijos devido ao seu baixo pH de atividade e temperatura específica (Rao et al., 1998).

Proteases alcalinas produzidas por *A. oryzae* são usadas na fabricação de molho de soja e hidrólise de matéria-prima (Rao et al., 1998)

2.6 Fatores interferentes na produção de protease

As enzimas são catalisadores muito eficientes, porém, são menos resistentes a condições severas de reação, quando comparadas aos catalisadores inorgânicos, ou seja, qualquer agente externo que possa interferir no arranjo estrutural pode desnaturar a enzima e torná-la inativa, como por exemplo, pH, temperatura, força iônica e natureza do solvente (Sant Anna, 2001).

A atividade proteolítica pode ser determinada usando diferentes métodos e condições experimentais. Ogrydziak (1993) concluiu que a atividade proteolítica é altamente dependente das condições experimentais e da metodologia empregada.

Os bioprocessos são dependentes primariamente da capacidade de síntese biomolecular seja de um organismo selvagem ou recombinante, baseada na sua estrutura genética, mecanismos de controle genético e regulação das reações intracelulares. As condições ambientais do processo também são variáveis importantes, a interação entre essas condições e as reações

intracelulares é estudada com o objetivo de garantir uma boa performance de produção enzimática (Çalik et al., 2002).

Alguns fatores importantes na produção de proteases são descritos a seguir:

2.6.1 Linhagens de microrganismos

A atividade enzimática depende da linhagem, portanto é importante fazer uma seleção de linhagens para a produção proteolítica. Numerosas proteases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteases com diferentes propriedades podem ser produzidas dentro de uma mesma espécie dependendo do isolado e dos fatores relacionados com o processo de obtenção da enzima (Koka & Weimer, 2000).

Braga et al. (1998) & Poza et al. (2001) relataram a interferência do hábitat natural dos microrganismos na sua produção enzimática. Silva (2004) estudou a atividade enzimática da microbiota dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica L.*). Os grãos de café apresentam uma microbiota diversificada que afetam a qualidade da bebida, uma vez que esses microrganismos promovem reações indesejáveis que comprometem as suas características físicas e químicas (Carvalho et al., 1998). A presença desses microrganismos ocorre devido a maior atividade de água nos grãos que favorece o crescimento microbiano. Uma atividade de água a partir de 0,7 aw favorece o crescimento de fungos, as bactérias necessitam de uma atividade de água a partir de 0,9 aw (Borém, 2004).

O grupo de microrganismo mais citado na literatura, quanto à relação microrganismo versus qualidade da bebida de café, é o de fungos filamentosos, havendo menor número de trabalhos sobre fungos leveduriformes e bactérias (Silva et al., 2004).

O grão de café é constituído de casca, mucilagem e semente, sendo que cada uma destas partes tem sua composição química característica e durante as diversas fases de processamento do fruto e particularmente na secagem, alterações na composição química de uma das partes pode influenciar na da outra e conseqüentemente na qualidade do produto final.

Os produtos da fermentação da mucilagem podem atuar na composição da semente, que é composta por carboidratos, óleos, proteínas, minerais, ácidos, trigonelina e cafeína. A composição da mucilagem dos frutos de café fornece o substrato adequado para o crescimento de microrganismos. Ela é composta basicamente de 85% água e 15% de sólidos na forma de um hidrogel insolúvel e coloidal. Da porção de sólidos 80% correspondem a substâncias pécticas e os 20% restante a açúcares. Além do crescimento desses microrganismos, esse substrato propicia fermentações que provocarão alterações nos componentes químicos. Os compostos, por difusão, penetram na semente modificando sua composição, na maioria dos casos de forma detrimental à qualidade. Esses compostos podem ser também provenientes do metabolismo dos microrganismos, que produzem substâncias que difundem da mucilagem para a semente.

Para a ação dos microrganismos é necessário a injúria da película dos frutos para possibilitar o acesso à mucilagem. Essas injúrias podem ser de natureza mecânica ou causadas por inseto, particularmente a mosca das frutas. As fermentações que ocorrem, podem ser devidas às enzimas do próprio café e às de origem microbiana (Carvalho, 1998; Silva et al., 2004).

Cada microrganismo ou isolado tem suas condições especiais para o máximo de produção enzimática (Adinarayana & Ellaiah, 2002). Çalik et al. (2003) demonstraram maior atividade proteolítica em 20 horas de cultivo, correspondendo à fase estacionária na curva de crescimento do isolado de

Bacillus licheniformes, pelo fato da sua produção de proteases não estar relacionada com o seu crescimento.

Pereira et al. (2001) estudaram espécies de *Lactobacillus* que apresentaram o mais alto índice de atividade proteolítica no início da sua fase exponencial de crescimento.

Comparando dois isolados de um mesmo fungo *Metarhizium anisopliae*, a atividade proteolítica foi maior em um dos isolados avaliados. Em um deles a máxima atividade foi no 5º dia, após este dia, houve uma queda progressiva na atividade proteolítica. No outro isolado, o pico de atividade proteolítica foi observado no 9º dia, já na fase de autólise, caindo levemente até o 16º dia que foi o final do experimento. As proteases produzidas por esse fungo têm um interesse econômico para aplicação industrial, além de serem importantes durante o processo de penetração no hospedeiro (Braga et al., 1999).

As leveduras produzem proteases nas fases exponencial e estacionária de crescimento (Ogrydiziak, 1993).

2.6.2 Sistemas de produção

Os fatores relacionados com o sistema de produção envolvem todos aqueles presentes nas etapas do processo fermentativo (Adinarayana & Ellaiah, 2002), tais como:

a) Meio de cultivo na fermentação

Os nutrientes, bem como as suas quantidades, podem afetar a produção e o tipo de proteases (Longo et al., 1999). Estudos para a produção de proteases mostraram que a produção pode variar com o meio de cultura usado e com os efeitos regulatórios exercidos pelas fontes de carbono (Oh et al., 2000). A produção de proteases é induzida pela fonte de proteína e a síntese de enzimas é, em parte, regulada pela repressão catabólica (Barata et al., 2002).

Oh et al. (2000) estudaram o efeito das fontes de carbono na produção de proteases por *Pseudomonas aeruginosa* acrescido de uma das fontes de carbono adicionais: glicose, lactose, carboximetilcelulose, D(-)arabinose, D(+)xilose, celulose e farelo de arroz. A produção de proteases foi significativamente aumentada pela adição de carboximetilcelulose, lactose ou farelo de arroz ao meio de cultura. Quando o efeito das concentrações dessas três fontes de carbono foi estudado, a lactose na concentração de 1% mostrou-se a mais efetiva para a produção de proteases.

Poza et al. (2001) testaram diferentes açúcares e concentrações para a produção de proteases, obtendo resultados variáveis dependendo da fonte e concentração utilizada. Concentrações baixas de fontes de carbono permitem crescimento e síntese de enzimas em valores máximos, porém, altos valores de açúcares resultaram em repressão catabólica na atividade da enzima.

A fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens sobre a fermentação líquida submersa para a produção de enzimas fúngicas. O sistema em estado sólido é geralmente mais simples e podem ser utilizados substratos agroindustriais. A mínima quantidade de água permite a produção de metabólitos mais concentrados, tornando o processo mais rápido e mais econômico (Pandey, 2001). Estas condições favorecem o crescimento de fungos filamentosos que tipicamente crescem em natura em substratos sólidos, tais como pedaços de madeira, folhas de plantas e raízes e outros materiais orgânicos naturais (Soccol & Krieger, 1998; Pandey et al., 2000). As condições ambientais na fermentação em estado sólido podem estimular a produção de enzimas com diferentes propriedades das enzimas produzidas pelo mesmo organismo na fermentação submersa (Pandey et al., 1999; Pandey et al., 2001). Germano et al. (2003) obtiveram bons resultados ao trabalharem com fermentação em estado sólido para a produção de proteases por *Penicillium sp*, sugerindo assim a utilização de substratos baratos para a produção proteolítica.

Azeredo et al. (2004) obtiveram bons resultados para a produção de proteases por *Streptomyces sp* utilizando melaço de cana como meio líquido, que é um produto brasileiro de baixo custo, contribuindo assim para agregar valor a este produto.

b) pH

Vários trabalhos demonstram a interferência do pH do meio de fermentação na produção de proteases e no crescimento do microrganismo. Diferentes valores de pH podem produzir diferentes proteases e em quantidades também variadas (Braga et al., 1998; Çalik et al., 2002). A variável pH é muito importante no processo de produção enzimática e precisa ser bem avaliada para a obtenção do melhor desenvolvimento operacional. As fermentações para produção de enzimas podem ser realizadas em condições controladas ou não controladas de pH, ou ainda parcialmente controlada, ou seja o controle é realizado apenas em algumas etapas. A melhor condição depende do microrganismo e do produto final e rendimento desejados. Çalik et al. (2002) obtiveram maior produtividade de protease alcalina em condições não controladas de pH, entretanto, outros autores relatam que o controle de pH durante a produção de proteases é importante para a atividade enzimática (Moon & Parulekar, 1993).

c) Temperatura

A maioria dos estudos sobre caracterização de enzimas é realizada utilizando temperatura controlada durante o processo fermentativo para a produção de proteases. A temperatura tanto pode interferir no crescimento do microrganismo microbiano quanto na produção de metabólitos produzidos pelos microrganismos (Beg & Gupta, 2003; Koka & Weimer, 2000).

d) Outros

Yang & Lin (1998) demonstraram que a aeração e agitação favoreceram a produção de uma protease ácida por *Aspergillus niger*, uma vez que ótimos níveis de atividade proteolítica foram obtidos nessas condições.

A produção de proteases é variável com o sistema utilizado: células livres ou imobilizadas; a escolha do melhor sistema deve ser específica para cada bioprocessamento (Longo et al., 1999; Szczesna-Antczak et al., 2004)

2.6.3 Purificação enzimática

Valores diferentes de produção proteolítica são obtidos dependendo da purificação da enzima. Alguns trabalhos utilizam o extrato bruto, ou seja sem nenhuma purificação (Andrade et al., 2002; Azeredo et al., 2004; Germano et al., 2003), enquanto outros realizam a caracterização enzimática na amostra purificada ou parcialmente purificada (Beg et al., 2002; Germano et al., 2003).

2.6.4 Método analítico e substrato utilizados no ensaio enzimático

Cada substrato usado para o ensaio proteolítico tem um conjunto de características, incluindo seqüência de aminoácidos e localização individual de aminoácidos. Essas características têm uma grande interferência na especificidade da enzima pelo substrato. Os resultados da atividade proteolítica são variáveis em função da metodologia utilizada para quantificação. Utilizando a temperatura e pH adequados há maior produção proteolítica (Germano et al., 2003; Ogrydziak, 1993; Poza et al., 2001).

2.6.5 Engenharia genética

O emprego da engenharia genética é uma ferramenta potente para gerar enzimas com propriedades novas e ou melhoradas para a indústria biotecnológica (Çalik et al., 2003; Kitano et al., 2002; Silva et al., 2002).

As reninas são enzimas classicamente empregadas na fabricação de queijos, atuando sobre a caseína e suas frações. Historicamente, as reninas empregadas na fabricação de queijos são extraídas da mucosa gástrica de ovinos e bovinos jovens. A limitação da fonte dessas proteases estimulou a busca por fontes alternativas. Atualmente, são empregadas técnicas de engenharia genética em microrganismos, buscando a obtenção de uma renina de padrão igual ou superior à de origem animal (Pastore, 2002).

As proteases obtidas por engenharia genética são aplicadas na indústria de detergentes, uma vez que as enzimas bioprojetadas apresentam melhor estabilidade. As novas preparações de proteases apresentam atividade catalítica melhorada e maior estabilidade frente à temperatura, presença de agentes oxidantes e alterações nas condições de lavagem (Rao et al., 1998)

A capacidade de *B. subtilis* secretar várias proteínas no meio de cultura e sua não-patogenicidade fazem dele um hospedeiro para clonagem de genes de protease de outros *Bacillus sp.* Vários genes de proteases alcalina ou neutra de várias espécies de *Bacillus* são clonados em *B. subtilis* (Rao et al., 1998).

2.6.6 Estabilidade das proteases

As proteases produzidas precisam ser estudadas com relação à estabilidade no processo industrial no qual serão empregadas. Como exemplo pode-se citar a necessidade das proteases usadas na síntese de certos oligopeptídios serem estáveis a solventes orgânicos, como hexano, tolueno e benzeno. A protease de um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 apresentou estabilidade na presença destes e de outros solventes (Ogino et al., 1995; Ogino et al., 1999). A bactéria *Bacillus cereus* produz uma metaloprotease alcalina que apresenta estabilidade a elevadas temperaturas e à presença de solventes orgânicos, sendo um potencial para aplicação na síntese de peptídios e oligopeptídios e na produção de detergentes (Ghorbel et al., 2003).

Além de serem estáveis aos outros componentes usados no processamento industrial as enzimas precisam ser também estáveis no pH e temperatura em que serão utilizadas (Stoner et al., 2004)

As diferentes aplicações de proteases requerem um pH ótimo específico para melhor performance da enzima, como por exemplo, o uso de proteases em couro ou na indústria de detergente requer uma enzima com pH ótimo alcalino enquanto o uso na indústria de fabricação de queijo requer protease ácida. Modificações na superfície das enzimas podem alterar o pH ótimo da enzima (Rao et al., 1998)

A proteólise das proteases a elevadas temperaturas é responsável pela rápida inativação da enzima. Vários trabalhos relatam que os íons cálcio tem participação na estabilização das proteases a altas temperaturas e no aumento da atividade (Barata et al., 2002; Beg et al., 2003; Ghorbel, 2003). Beg et al. (2003), relataram o aumento da estabilidade térmica de uma protease à temperatura de 60°C e 65°C, porém, este efeito não foi observado a temperaturas acima de 70°C. A maior parte das proteases alcalinas tem sido estudada por ser significativamente estabilizada pela adição de Ca^{2+} em valores mais altos de pH e temperaturas.

Alguns íons metálicos protegem a enzima contra desnaturação térmica e têm um papel importante na manutenção da atividade da enzima a altas temperaturas (Kumar et al., 1999).

Barata et al. (2002) relataram que a atividade de protease em *Fusarium oxysporum* f. sp *lini* foi significativamente aumentada quando CaCl_2 ou MgCl_2 foram adicionados à mistura de reação. No entanto, ZnCl_2 tem efeito inibitório a altas concentrações. Provavelmente, íons Ca^{2+} e Mg^{2+} estão envolvidos na estabilização da estrutura ativa, mas eles não são necessários para o funcionamento catalítico.

A estabilidade da protease na presença de EDTA é vantajosa para ser utilizada como aditivo de detergente, uma vez que as formulações contêm altas concentrações de agentes quelantes, que se ligam aos íons metálicos, favorecendo a remoção da sujeira (Ghorbel et al., 2003).

Os isolados de *Bacillus sp* alcalifílicos são bons produtores de enzimas proteolíticas extracelulares em especial serina-protease alcalina, que é estável a valores mais elevados de pH e temperatura. Sua habilidade em resistir e manter atividade em condições desfavoráveis torna este grupo de enzimas ideal para aplicação industrial. Devido a essas características, vários estudos são realizados em espécies de *Bacillus sp*, apresentando proteases diferentes em suas características enzimáticas e físico-químicas. As serina-proteases têm sua atividade fortemente inibida por PMSF (Hutadilok-Towatana, 1999).

Uma protease empregada na indústria de cerveja, comercialmente conhecida como Neutrase (Novozymes), é insensível aos inibidores naturais das plantas. Ela apresenta baixa termotolerância que, neste caso, é uma vantagem, pois pode-se controlar a reação na produção de hidrolisados alimentares com baixo grau de hidrólise (Rao et al., 1998)

As proteases são um grupo complexo de enzimas que diferem em suas propriedades, como especificidade pelo substrato, sítio ativo e mecanismo de catálise. Sua alta especificidade fornece a base para suas numerosas aplicações fisiológicas e comerciais. São altamente dependentes da fonte enzimática e sistema de produção para sua utilização industrial (Rao et al., 1998)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e manutenção das culturas

Os isolados de bactérias, leveduras e fungos filamentosos utilizados nesta pesquisa pertencem à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Esses microrganismos foram isolados de frutos de café no estádio cereja da espécie *Coffea arabica* var. Acaiá durante o período de secagem via seca e armazenamento (Silva, 2004). Foram utilizados 143 isolados compreendendo 39 bactérias, 38 leveduras e 66 fungos filamentosos. As espécies utilizadas para a seleção de isolados proteolíticos encontram-se nas Tabelas 3,4 e 5.

TABELA 3 Isolados de bactérias para avaliação de atividade proteolítica

Espécie	Isolado
<i>Acinetobacter sp</i>	378, 500
<i>Arthrobacter sp</i>	407
<i>Bacillus cereus</i>	318, 338, 421
<i>Bacillus fastidiosus</i>	1024
<i>Bacillus macerans</i>	333, 351, 376
<i>Bacillus megaterium</i>	610, 749b, 817
<i>Bacillus polymyxa</i>	345, 379
<i>Cedecea lapagei</i>	1082
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1068
<i>Enterobacter agglomerans</i>	512, 1037
<i>Enterobacter sakazakii</i>	543
<i>Enterobacter. Cloacae</i>	558
<i>Klebsiella oxytoca</i>	317
<i>Klebsiella ozanae</i>	322
<i>Kurthia sp</i>	1044, 1080, 1095
<i>Proteus mirabilis</i>	1103
<i>Providencia rettigeri</i>	1086
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	536, 1046
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	873
<i>Serratia plymutica</i>	719, 816
<i>Serratia rubidea</i>	875, 1047, 1058
<i>Tatumella ptyseos</i>	699, 804, 1093
Total de isolados: 39	

TABELA 4 Isolados de leveduras para avaliação de atividade proteolítica

Espécie	Isolado
<i>Arxula adenivorans</i>	441 ^a , 734, 855
<i>Candida fermentati</i>	383, 390, 398
<i>Candida membranifaciens</i>	474
<i>Candida saitoana</i>	369, 476
<i>Cyteromyces matritensis</i>	567
<i>Debaryomyces hansenii</i>	640, 641, 642
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	384, 385, 650
<i>Dekkera bruxellensis</i>	955b
<i>Pichia anômala</i>	507, 508, 702
<i>Pichia burtonii</i>	553, 605
<i>Pichia guilliermondii</i>	381, 397, 493
<i>Pichia jadinii</i>	933
<i>Pichia holstii</i>	441b, 957b
<i>Pichia sydowiorum</i>	732, 759
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	856
<i>Saccharomyces Kluyveri</i>	567, 768
<i>Stephanoascus smithiae</i>	707, 733, 737
<i>Zygoascus hellenicus</i>	366, 368
<hr/>	
Total de isolados: 38	

TABELA 5 Isolados de fungos filamentosos para avaliação da atividade proteolítica

Espécie	Isolado
<i>Aspergillus dimorphicus</i>	670, 671
<i>Aspergillus flavus</i>	516, 517
<i>Aspergillus foetidus</i>	663
<i>Aspergillus niger</i>	528
<i>Aspergillus sydowii</i>	557
<i>Aspergillus ochraceus</i>	418
<i>Aspergillus viridicatum</i>	647
<i>Fusarium concolor</i>	625, 377
<i>Fusarium equiseti</i>	379
<i>Fusarium illudens</i>	358
<i>Fusarium lateritium</i>	224, 540, 711
<i>Fusarium moniliforme</i>	221, 223
<i>Fusarium nivale</i>	222
<i>Fusarium solani</i>	146, 359, 237
<i>Fusarium stilboides</i>	371
<i>Fusarium trincictum</i>	480
<i>Fusarium xylaroides</i>	490, 369, 370
<i>Paecilomyces sp</i>	258, 321
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	526
<i>Penicillium aurantiogriseum Dierckx</i>	439
<i>Penicillium brevicompactum</i>	243, 343, 479
<i>Penicillium citrinum</i>	391, 723, 725
<i>Penicillium chrysogenum</i>	251, 351, 578
<i>Penicillium corylophilum</i>	584
<i>Penicillium crustosum</i>	261, 388
<i>Penicillium expansum</i>	356
<i>Penicillium fellutanum</i>	309
<i>Penicillium funiculosum</i>	218, 219
<i>Penicillium implicatum</i>	660
<i>Penicillium janthinellum</i>	345
<i>Penicillium minioluteum</i>	215, 216, 256
<i>Penicillium purpurogenum</i>	284, 285
<i>Penicillium roqueforti</i>	393, 397, 425
<i>Penicillium solitum</i>	324, 482, 637
<i>Penicillium viridicatum</i>	647
<i>Penicillium waksmanii</i>	449, 668
Total de isolados: 66	

As bactérias mantidas congeladas a -20°C , foram reativadas em meio YEPG contendo, em g/L: extrato de levedura 10 g, peptona bacteriológica 10g, glicose 20g e incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Foi verificada a pureza da cultura após o re-isolamento da cepa a partir de estrias compostas em meio YEPG, pela visualização microscópica de lâminas utilizando a coloração de Gram.

As leveduras foram reativadas em meio YEPG pH 3,5 acrescido de gentamicina ($100\mu\text{g/mL}$) e ampicilina ($100\mu\text{g/mL}$) e incubadas a 28°C por 24 horas. A pureza da cultura foi realizada pela visualização microscópica de lâminas utilizando o corante azul de metileno, que foram confeccionadas a partir de colônias isoladas obtidas de estrias compostas em placas contendo o mesmo meio usado para reativação.

Os fungos filamentosos que encontravam-se em tubos inclinados a temperatura de 4°C ou esporos congelados a -20°C foram reativados em meio ágar nutriente baixo (SNA) contendo, em g/L: KH_2PO_4 1g, KNO_3 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, KCl 0,5g, glicose 0,2g, ágar 20g, para os isolados pertencentes ao gênero *Fusarium*, enquanto que os outros isolados foram reativados em meio ágar extrato de malte (MEA) contendo em g/L: extrato de malte 20g, glicose 20g, peptona bacteriológica 1g, ágar 20g, pH 5,6 e incubados à temperatura de 28°C por 5 dias.

3.2 Seleção de isolados para atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi detectada pela hidrólise de caseína em placa de petri contendo meio YNB (DIFCO) suplementado com 0,5% caseína, 0,5% glicose e 2% de ágar e o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1M e incubados a 28°C por 7-8 dias. Após este período, foi realizada a precipitação utilizando o tratamento com uma solução HCl 1M. A presença de um halo claro ao redor da colônia caracterizou o isolado como produtor / secretor de protease.

Os testes foram realizados em triplicata e como controle positivo foi utilizada uma solução de protease comercial (Sigma P-4032) a 0,001%.

Para a inoculação na placa de petri foram utilizadas pré-culturas. Para bactéria utilizaram-se 3 μ L de uma cultura de 24 horas em YEPG, para levedura utilizaram-se 4 μ L de uma cultura de 24 horas em YEPG e para o fungos filamentosos foi realizada a repicagem utilizando uma cultura de 5 dias em meio MEA ou SNA, como relatado anteriormente.

3.3 Preparo do inóculo

O inóculo para bactéria foi obtido inoculando-se 1% da cultura estoque em meio caldo nutriente, contendo, em g/L: extrato de carne 3g e peptona bacteriológica 5g, que foram incubados à 28°C por 12 horas. O crescimento celular foi avaliado pela densidade ótica a 600nm em espectrofotômetro (Shimatzu – UV1601PC).

O inóculo para levedura contendo 10⁸ células/mL foi obtido pelo crescimento da cultura estoque (100 μ L para 1mL de meio YEPG) por 48 horas à temperatura de 28°C. O número de células após 48 horas foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer.

O inóculo para fungos filamentosos consistiu em suspensão contendo 10⁸ esporos/mL. Para a obtenção desta suspensão de esporos os isolados foram repicados em placas contendo MEA e incubados a 28°C por 12 dias. A seguir foi realizada a retirada dos esporos utilizando-se solução aquosa contendo 0,85% de NaCL e 0,002% Tween-20 (Braga et al., 1999). A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer.

3.4 Produção de proteases

O meio de cultivo utilizado para a produção de proteases por bactérias foi o meio caldo nutriente acrescido de 0,01% de caseinato de sódio. Foi inoculado 1mL da cultura preparada para o inóculo em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo. Os frascos foram mantidos à temperatura de 28°C, sob agitação a 200 rpm, durante 24 horas. O cultivo foi realizado em duplicata para cada isolado selecionado e o pH do meio foi avaliado ao final do processo. A seguir o crescimento foi avaliado pela densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro (Shimatzu – UV1601PC).

Para produção de proteases em leveduras foi utilizado o meio YCB (DIFCO) suplementado com 0,01% de caseinato de sódio e 0,1% de glicose. Foram inoculados 2,5 mL da cultura contendo 10^8 células/mL em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo. Os frascos foram mantidos à temperatura de 28°C sob agitação a 120 rpm durante 48 horas. O cultivo foi realizado em duplicata para cada isolado selecionado e o pH do meio foi determinado no final do cultivo.

O meio de cultivo utilizado para produção em fungos filamentosos foi meio mineral constituído, em g/L de $MgSO_4$ 0,52g, KCl 0,52g, KH_2PO_4 1,52g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g, acrescido de 5g de caseinato de sódio. Foram inoculados 10 mL da suspensão de esporos preparada conforme descrito no item 3.3 em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo. Os frascos foram mantidos à temperatura de 28°C sob agitação a 150 rpm durante 5 dias. O cultivo foi realizado em duplicata para cada isolado selecionado e o pH do meio foi determinado ao final do cultivo. Após o período de incubação, o material de cada frasco foi filtrado para a retenção da massa micelial. A massa micelial foi armazenada a 70°C para secagem até peso constante.

Após o crescimento dos microrganismos, os meios de cultivo foram centrifugados ou filtrados (fungos filamentosos) e o sobrenadante considerado

como extrato enzimático bruto. O sobrenadante foi recolhido e congelado em alíquotas de 1mL para posterior quantificação enzimática.

3.5 Ensaio enzimático para proteases

O ensaio para atividade proteolítica utilizando caseína como substrato foi realizado pelo método modificado de Ramakrishna & Pandit (1988) com as seguintes modificações: 250µL do sobrenadante foram adicionados em um tubo contendo 500µL de caseinato de sódio (Sigma) 1% em 50mM do tampão desejado. Os tubos foram selados com filme plástico e incubados a 30°C em banho-maria por 2 horas. A reação foi paralisada pela adição de 375 µL de ácido tricloroacético a 20%. Os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, o material foi centrifugado a 5.000g por 15 minutos a 4°C. A leitura de absorvância foi realizada a 280 nm contra o branco (750µL do tampão desejado + 375µL de ácido tricloroacético). De cada amostra, subtraiu-se o valor do controle (mistura idêntica da amostra, mas sem incubação prévia). Foram realizadas três repetições por amostra. A atividade proteolítica foi expressa em unidade proteolítica, sendo definida como 1 unidade proteolítica (PU) a atividade requerida para gerar uma OD₂₈₀ de 0,01 no sobrenadante por hora (Braga et al., 1998).

3.6 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH

A determinação das proteases foi realizada em triplicata para cada amostra, conforme metodologia descrita no item 3.5 em três valores de pH: 5,0; 7,0 e 9,0. O substrato foi preparado em três tampões com concentração 50mM: tampão citrato de sódio para pH 5,0, tampão fosfato de sódio para pH 7,0 e tampão tris para pH 9,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de bactérias para produção de proteases

Dentre os 39 isolados de bactérias testados, 19 (48,71%) apresentaram halo claro ao redor da colônia (Tabela 6), indicando atividade proteolítica.

O gênero *Bacillus* é conhecido pela sua propriedade de produção de proteases extracelulares (Beg & Gupta, 2003). Neste estudo, isolados de três diferentes espécies de *Bacillus* (*B. macerans*, *B. megaterium* e *B. polymyxa*) foram selecionados para a avaliação quantitativa de proteases. Outras espécies de *Bacillus* não apresentaram resultado positivo no teste qualitativo. As três espécies de *Bacillus* selecionadas mostram que a produção de proteases é específica para cada isolado e não para determinada espécie, conforme relataram Braga et al. (1998). As espécies selecionadas apresentaram isolados com atividade caseinolítica e outros não caseinolíticos (Tabela 6).

Outro fator a ser considerado é a possibilidade de um isolado perder a sua capacidade proteolítica devido a subculturas repetidas e ou devido ao tempo de congelamento (Braga et al., 1998)

Muitas proteases são produzidas pelas espécies de *Pseudomonas* (Koka & Weimer, 2000). Oh et al. (2000) relataram a produção de uma protease por *Pseudomonas aeruginosa* que foi ativa na faixa de pH 7 a 9, sendo seu pH ótimo 8,0. Koka & Weimer (2000) relataram a produção de metalo-protease por *Pseudomonas fluorescens* com pH ótimo de atividade em torno de 5,0 e temperatura de incubação a 35°C. Rajmohan et al. (2002) descreveram uma melato-protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* isolada de amostras de leite pasteurizado, semi-desnatado e desnatado. Neste trabalho, duas espécies de *Pseudomonas* (*P. paucimobilis* e *P. putrefaciens*) foram avaliadas com relação à capacidade caseinolítica. Os isolados de *P. paucimobilis* (dois) apresentaram

hidrólise da caseína enquanto que nenhum isolado de *P. putrefaciens* apresentou atividade caseinolítica (Tabela 6).

O gênero *Serratia* não tem sido considerado um típico produtor de proteases, porém, Longo et al (1999) encontraram altos níveis de produção de proteases em um isolado de *Serratia marcescens* quando comparados com um isolado de *B. subtilis*. Os dois isolados de *Serratia plymutica* avaliados com relação à capacidade caseinolítica apresentaram resultado positivo, enquanto que a espécie *S. rubidea* não apresentou nenhum isolado com atividade caseinolítica (Tabela 6).

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se verificar que espécies diferentes ou mesmo isolados diferentes de uma mesma espécie podem apresentar resultados diferentes com relação à produção de proteases (Tabela 6). Essas diferenças confirmam que a produção de proteases é altamente dependente da linhagem, conforme descrito por vários autores (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Braga et al., 1998; Koka & Weimer, 2000).

TABELA 6 Hidrólise da caseína por isolados de bactérias isoladas de frutos e grãos de café

Espécie	Isolado	Hidrólise caseína
<i>Acinetobacter sp</i>	378, 500	+
<i>Arthrobacter sp</i>	407	-
<i>Bacillus cereus</i>	318, 338, 421	-
<i>Bacillus fastidiosus</i>	1024	-
<i>Bacillus macerans</i>	376	+
	333, 351	-
<i>Bacillus megaterium</i>	749b, 817	+
	610	-
<i>Bacillus polymyxa</i>	345	+
	379	-
<i>Cedecea lapagei</i>	1082	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1068	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1037	+
	512	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	543	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	558	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	317	-
<i>Klebsiella ozanae</i>	322	-
<i>Kurthia sp</i>	1044, 1080, 1095	+
<i>Proteus mirabilis</i>	1103	-
<i>Providencia rettigeri</i>	1086	+
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	536, 1046	+
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	873	-
<i>Serratia plymutica</i>	719, 816	+
<i>Serratia rubidea</i>	875, 1047, 1058	-
<i>Tatumella ptyseos</i>	699, 804, 1093	+

+ presença de halo claro ao redor da colônia: isolado caseinolítico

- ausência de halo claro ao redor da colônia: isolado não caseinolítico

4.2 Seleção de leveduras para a produção de proteases

Nesta seleção, o teste qualitativo para hidrólise de caseína em leveduras mostrou que apenas um isolado de *Cyteromyces matritensis* (2,63%) dentre os 38 avaliados, apresentou a formação de halo claro ao redor da colônia, caracterizando-a como proteolítica (Tabela 7).

As produções de proteases extracelulares por leveduras vêm sendo pesquisadas para utilização industrial (Braga et al., 1998; Ponezi, 1997; Poza et al., 2001) uma vez que elas não são tradicionalmente reconhecidas como boas produtoras de protease (Poza et al., 2001). Entretanto, alguns autores demonstraram a existência de alta atividade proteolítica em diferentes espécies de leveduras (Ogrydziak, 1993; Poza et al., 2001).

As proteases de leveduras na área médica são estudadas há mais tempo, devido a leveduras patogênicas, como por exemplo, *Candida albicans*. Essa levedura secreta uma aspártico-protease extracelular que é importante na sua patogenicidade. A resistência de algumas cepas aos medicamentos existentes faz com que a pesquisa por novos medicamentos seja prioritária. O estudo dessa protease é importante para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o tratamento da candidíase (Koelsch et al., 2000; Pichova et al., 2001).

Além das proteases extracelulares para aplicação industrial as proteases intracelulares também são estudadas devido a sua importância metabólica. Bolumar et al. (2005) purificaram e determinaram as propriedades bioquímicas de uma protease intracelular de *Debaryomyces hansenii* que são importantes no metabolismo de nitrogênio, interferindo na fisiologia e adaptação desta levedura nos processos de produção de alimentos fermentados.

TABELA 7 Hidrólise de caseína por isolados de leveduras isoladas de frutos e grãos de café

Espécie	Isolado	Hidrólise caseína
<i>Arxula adenivorans</i>	441 ^a , 734, 855	-
<i>Candida fermentati</i>	383, 390, 398	-
<i>Candida membranifaciens</i>	474	-
<i>Candida saitoana</i>	369, 476	-
<i>Cyteromyces matritensis</i>	567	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	640, 641, 642	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	384, 385, 650	-
<i>Dekkera bruxellensis</i>	955b	-
<i>Pichia anômala</i>	507, 508, 702	-
<i>Pichia burtonii</i>	553, 605	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	381, 397, 493	-
<i>Pichia jadinii</i>	933	-
<i>Pichia holstii</i>	441b, 957b	-
<i>Pichia sydowiorum</i>	732, 759	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	856	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	567, 768	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	707, 733, 737	-
<i>Zygoascus hellenicus</i>	366, 368	-

+ presença de halo claro ao redor da colônia: isolado caseinolítico

- ausência de halo claro ao redor da colônia: isolado não caseinolítico

Braga et al. (1998) realizaram uma seleção de leveduras proteolíticas, na qual diferentes espécies de *Candida* e *Pichia* apresentaram teste positivo para hidrólise da caseína. Porém, neste trabalho, nenhuma espécie desses gêneros apresentou esta característica.

O baixo percentual de isolados de leveduras caseinolíticas obtido nessa seleção concorda com os resultados de Poza et al. (2001), nos quais a maioria das leveduras secretou pouca ou nenhuma protease extracelular.

O fato de alta atividade proteolítica ser descrita como rara em leveduras não impede a proposta de novos trabalhos, uma vez que vários autores encontraram altos níveis de produção de proteases em leveduras, além da

possibilidade de encontrarem isolados com novas características de interesse para utilização em biotecnologia.

4.3 Seleção de fungos filamentosos para a produção de proteases

Os fungos filamentosos têm sido extensivamente utilizados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (Braga et al., 1999).

As proteases bacterianas têm sido largamente utilizadas na indústria, entretanto, requerem custo intensivo na metodologia de filtração para obter a preparação enzimática livre do microrganismo. As proteases de origem fúngica oferecem a vantagem do micélio ser facilmente removido por filtração (Phadatare et al., 1993).

Dentre os 66 isolados de fungos filamentosos submetidos ao teste qualitativo para hidrólise da caseína, 33 (50%) apresentaram a formação de halo claro ao redor da colônia, caracterizando-os como proteolíticos.

Os isolados que apresentaram atividade proteolítica pertencem às espécies *Aspergillus dimorphicus*, *A. ochraceus*, *Fusarium illudens*, *F. lateritium*, *F. solani*, *Paecilomyces sp*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium aurantiogriseum Dierckx*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. roqueforti*, *P. solitum* e *P. waksmanii* (Tabela 8)

TABELA 8 Hidrólise caseína por isolados de fungos filamentosos isolados de frutos e grãos de café

Espécie	Isolado	hidrólise caseína
<i>Aspergillus dimorphicus</i>	670, 671	+
<i>Aspergillus flavus</i>	516, 517	-
<i>Aspergillus foetidus</i>	663	-
<i>Aspergillus niger</i>	528	-
<i>Aspergillus sydowii</i>	557	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	418	+
<i>Aspergillus viridicatum</i>	647	-
<i>Fusarium concolor</i>	337, 625	-
<i>Fusarium equiseti</i>	379	-
<i>Fusarium illudens</i>	358	+
<i>Fusarium lateritium</i>	224	+
	540, 711	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	221	+
	223	-
<i>Fusarium nivale</i>	222	-
<i>Fusarium solani</i>	237, 359	+
	176	-
<i>Fusarium stilboides</i>	371	-
<i>Fusarium trincictum</i>	480	-
<i>Fusarium xylaroides</i>	370, 369, 460	-
<i>Paecilomyces sp</i>	321	+
	258	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	526	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		
<i>Dierckx</i>	439	+
<i>Penicillium brevicompactum</i>	243, 479	+
	343	-

...continua....

alcalina por *Fusarium oxysporum* f. sp *lini*. Essa espécie utiliza proteínas e peptídeos como substrato de crescimento e produz enzimas proteolíticas para gerar pequenos peptídeos. Durand-Poussereau (1996) descreveu a importância de uma aspártico-protease extracelular produzida por *Penicillium roqueforti* que foi a maior responsável pela atividade proteolítica total.

Os resultados obtidos no teste qualitativo para a seleção de fungos filamentosos proteolíticos também mostraram que a produção de proteases é específica para um isolado e não para uma determinada espécie, conforme já discutido no item 4.1.

4.4 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de bactérias

A atividade proteolítica foi determinada no sobrenadante da cultura após a fermentação, sendo considerado como extrato enzimático bruto. A determinação da atividade enzimática foi realizada em três valores diferentes de pH: 5,0; 7,0 e 9,0, utilizando uma temperatura de 30°C para incubação em banho-maria. O valor do pH no final do processo fermentativo foi determinado para cada isolado selecionado como caseinolítico (Tabela em anexo).

As maiores atividades proteolíticas em pH 5,0, nas condições do experimento, foram apresentadas pelas espécies de bactérias *Pseudomonas paucimobilis* (1046), *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus polymyxa* e *Tatumella ptyseos* (1093) que exibiram, respectivamente, 26,50 UP; 19,51 UP; 16,44 UP e 16,34 UP. Os valores de produção dos dois últimos isolados não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% (Tabela 9).

O isolado da espécie *Pseudomonas paucimobilis* (1046) apresentou a mais alta atividade proteolítica dentre os isolados selecionados como maiores produtores em pH 5,0. A variação de sua produção enzimática nos três valores de pH encontra-se na Tabela 9. O isolado apresentou a mesma atividade em pH

TABELA 8, Cont.

Espécie	Isolado	Hidrólise caseína
<i>Penicillium citrinum</i>	391, 723, 725	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	251, 351, 578	+
<i>Penicillium corylophilum</i>	584	+
	319, 325	-
<i>Penicillium crustosum</i>	261, 388	+
	664	-
<i>Penicillium expansum</i>	356	+
<i>Penicillium fellutanum</i>	309	-
<i>Penicillium funiculosum</i>	218, 219	-
<i>Penicillium implicatum</i>	660	+
<i>Penicillium janthinellum</i>	345	-
<i>Penicillium minioluteum</i>	215, 216, 256	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	284, 585	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	393, 397, 425	+
<i>Penicillium solitum</i>	324, 482, 637	+
<i>Penicillium viridicatum</i>	647	-
<i>Penicillium waksmanii</i>	449, 668	+

+ presença de halo claro ao redor da colônia: isolado caseinolítico

- ausência de halo claro ao redor da colônia: isolado não caseinolítico

Vários trabalhos descrevem eficiente expressão de proteases pelos gêneros *Aspergillus* (Germano et al., 2003; Kitano et al., 2002; Yang & Lin, 1998), *Fusarium* (Barata et al., 2002) e *Penicillium* (Chrzanowska et al., 1993; Poussereau et al., 1996).

Germano et al. (2003) realizaram a caracterização parcial de uma protease produzida por *Aspergillus sp.* Os resultados foram compatíveis com uma serina-protease uma vez que a enzima foi inibida na presença de inibidores específicos para esse tipo de protease.

Uma alta produção de protease ácida foi obtida utilizando-se um isolado de *Aspergillus niger* cultivado sob melhores condições de aeração e agitação (Yang & Lin, 1998). Barata et al. (2002) relataram a produção de uma protease

5,0 (26,50 UP) e 9,0 (25,37 UP), uma vez que não difere estatisticamente. Em pH 7,0 (17,02UP), a atividade proteolítica foi menor.

Em pH 7,0, nas condições do experimento, as maiores atividades foram encontradas no cultivos de *B. megaterium* (817), *Kurthia sp* (1095) e *Tatumella ptyseos* (1093) que apresentaram, respectivamente, 26,22 UP, 26,67 UP e 26,37 UP. Estes valores não diferiram estatisticamente, a 5%, pelo teste de Tukey (Tabela 9).

A atividade proteolítica de *Bacillus megaterium* (817) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 9. O pH ótimo de atividade foi 7,0 (26,22 UP) e 9,0 (26,18 UP), uma vez que estes valores não diferiram estatisticamente. Em pH 9,0, este isolado não apresentou a maior atividade, porém, foi um dos maiores produtores. Houve um decréscimo significativo em sua atividade em pH 5,0 (13,94 UP).

A produção proteolítica de *Kurthia sp* (1095) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 9. Os resultados foram semelhantes aos obtidos para o isolado de *B. megaterium* (817). O pH ótimo foi 7,0 (26,67 UP) e 9,0 (25,98 UP), ocorrendo um decréscimo na atividade em pH 5,0 (13,02 UP). Em pH 9,0, esse isolado também esteve entre os maiores produtores, embora não fosse o maior.

A produção proteolítica para *Tatumella ptyseos* (1093) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 9. O pH ótimo de atividade foi 7,0 (26,37UP) e 9,0 (27,02UP), valores que não diferiram estatisticamente. Em pH 9,0, não foi o isolado com maior produtividade, porém, foi um dos maiores produtores. Houve uma perda de atividade em pH 5,0 (16,34UP), porém foi uma perda menor que a apresentada por *B. megaterium* e *Kurthia sp*, uma vez que este foi um dos maiores produtores neste valor de pH.

As maiores atividades proteolíticas dentre os isolados em pH 9,0, nas condições do experimento, foram obtidas pelas espécies *Enterobacter*

agglomerans, *Tatumella ptyseos* (1093), *Bacillus megaterium* (817) e *Kurthia sp* (1095) que apresentaram, respectivamente, 29,74 UP, 27,02 UP, 26,18 UP e 25,98 UP. Os valores de produção dos dois últimos isolados não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% (Tabela 9).

O maior produtor em pH 9,0 foi o isolado de *Enterobacter agglomerans*, sua atividade proteolítica para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 9. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0 (29,74 UP), havendo um decréscimo gradativo da atividade proteolítica nos valores de pH 7,0 e 5,0, que apresentaram, respectivamente 22,70 UP e 19,51 UP.

A variação da produção de proteases em diferentes valores de pH para as outras espécies que obtiveram as maiores atividades em pH 9,0, *Tatumella ptyseos* (1093), *Bacillus megaterium* (817) e *Kurthia sp* (1095) já foi relatada anteriormente.

Em pH 5,0, o isolado de *B. polymyxa* não foi o maior produtor, porém, foi um dos maiores produtores dentre os fungos filamentosos caseinolíticos neste pH. A variação de produção de proteases para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 9. Embora ele tenha se destacado dentre os outros isolados em pH 5,0 (16,44 UP), o seu pH ótimo foi 7,0 (22,85 UP) e 9,0 (20,78 UP), uma vez que não diferiu estatisticamente.

TABELA 9 Atividade proteolítica de bactérias caseinolíticas em três diferentes valores de pH

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica (UP)		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>Acinetobacter sp</i>	378	10,92 ^B	12,19 ^B	21,00 ^A
	500	1,15 ^B	5,34 ^A	7,86 ^A
<i>Bacillus macerans</i>	376	0,00 ^A	0,00 ^A	0,73 ^A
<i>Bacillus megaterium</i>	817	13,94 ^B	26,22 ^A	26,18 ^A
	749b	11,56 ^B	21,11 ^A	22,17 ^A
<i>Bacillus polymyxa</i>	345	16,44 ^B	22,85 ^A	20,78 ^A
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1068	5,52 ^C	14,24 ^B	20,02 ^A
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1037	19,51 ^C	22,70 ^B	29,74 ^A
<i>Kurthia sp</i>	1044	10,86 ^C	20,90 ^B	24,94 ^A
	1080	7,07 ^B	18,98 ^A	19,64 ^A
	1095	13,02 ^B	26,67 ^A	25,98 ^A

...continua...

TABELA 9, Cont.

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica (UP)		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>Providencia rettigeri</i>	1086	14,21 ^B	14,89 ^B	24,28 ^A
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	536	5,34 ^C	14,84 ^B	20,26 ^A
	1046	26,50 ^A	17,02 ^B	25,37 ^A
<i>Serratia plymutica</i>	719	11,51 ^B	23,60 ^A	22,73 ^A
	816	6,53 ^C	19,60 ^B	24,86 ^A
<i>Tatumella ptyseos</i>	699	0,31 ^A	2,15 ^A	3,14 ^A
	804	4,12 ^C	15,51 ^B	20,52 ^A
	1093	16,34 ^B	26,37 ^A	27,02 ^A

Unidade proteolítica (UP): 1 UP é a atividade requerida para gerar uma OD₂₈₀ de 0,01 no sobrenadante por hora. Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente, pelo Teste de Tukey (5%)

Em todos os isolados das espécies *B. megaterium* (817), *B. polymyxa*, *E. agglomerans*, *Kurthia sp* (1095), *P. paucimobilis* (1046) e *Tatumella tyseos*, que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, ficou evidente que o pH é uma variável importante na atividade proteases e específica para cada isolado.

Os valores de pH ótimo 7,0 e 9,0 indicam que este microrganismo pode ser estudado para a produção de proteases em processos que requerem pH neutro ou alcalino, como a indústria de detergentes (Çalik et al., 2003; Gupta et al. 2002; Mittidieri et al., 2002; Rao et al., 1998).

Para os isolados em que o pH ótimo para atividade enzimática foi 5,0, sugere-se o estudo da produção de proteases para a aplicação na indústria alimentícia, como na síntese de peptídeos (Ogino et al, 1995; Ogino et al., 1999; Rao et al., 1998).

Cabe ressaltar que o fato de uma enzima possuir o pH ótimo para aplicação em um determinado setor industrial não implica que ela possa ser utilizada. Precisa-se fazer uma caracterização da protease, a fim de identificar outros fatores importantes, como temperatura ótima para atividade e estabilidade na presença de interferentes, seja na sua produção ou no processo industrial onde serão empregadas (Barata et al., 2002; Germano et al., 2003; Ogino et al., 1995; Ogino et al., 1999; Stoner et al., 2004).

O isolado de *P. paucimobilis* apresentou, como pH ótimo para a atividade proteolítica, os valores 5,0 e 9,0, ocorrendo, entretanto, uma queda da atividade enzimática no valor de pH 7,0 (Tabela 9). Esta variação da atividade em função do pH pode ser devido a várias proteases produzidas pelo mesmo isolado (Koka & Weimer, 2000), uma vez que foram quantificadas neste trabalho as proteases extracelulares totais.

Os microrganismos que produziram proteases que não tiveram perda de atividade com a variação de pH (9,0 e 7,0), como *B. megaterium* (817), *B. polymyxa*, *Kurthia sp* e *Tatumella tyseos*, apresentam uma maior estabilidade

com relação a alterações nos valores de pH. A manutenção da atividade em uma ampla faixa de pH faz com que a enzima possa ser utilizada em vários processos industriais (Poza et al., 2001).

4.5 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de leveduras

A única levedura selecionada para a quantificação proteolítica apresentou atividade apenas em pH 5,0 que foi 2,40 UP. A sua atividade enzimática neste pH foi baixa quando comparada com as apresentadas por isolados de bactérias e fungos filamentosos.

Braga et al. (1998) estudaram a produção de proteases em diferentes espécies de leveduras em três valores diferentes de pH: 5,0, 7,0 e 9,0. Nenhuma delas apresentou atividade em pH 9,0 e em pH 7,0 apresentaram baixa atividade.

Poza et al. (2001) relataram uma alta produção proteolítica em um isolado de *Candida caseinolytica* isolada de tecidos necróticos de várias espécies de cactus, sendo uma rara característica entre as leveduras. Esta levedura também apresentou outra propriedade, que é a ampla variação do pH de atividade.

4.6 Determinação quantitativa de proteases em diferentes valores de pH para os isolados de fungos filamentosos

As maiores atividades proteolíticas em pH 5,0, nas condições do experimento, foram apresentadas pelas espécies *Aspergillus dimorphicus* (671), *Fusarium solani* (359) e *Penicillium fellutanum*, que exibiram, respectivamente, 20,35 UP, 18,34 UP e 18,65 UP. Os valores de produção dos três isolados não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 10).

A atividade proteolítica de *A. dimorphicus* (671) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10. Embora esse isolado tenha apresentado a maior

atividade enzimática em pH 5,0 (20,35 UP), quando comparado a outros fungos filamentosos, o seu pH ótimo de atividade foi 9,0 (31,74 UP). Observou-se um decréscimo gradativo da atividade proteolítica à medida que os valores de pH diminuem, sendo sua atividade em pH 7,0 de 23,53 UP.

A atividade proteolítica de *F.solani* (359) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0 (37,40 UP), embora nesse valor de pH a produção enzimática tenha ficado entre as maiores, mas não foi a melhor. As proteases desse isolado também mostraram um decréscimo gradativo de atividade enzimática com a diminuição dos valores de pH, sendo 29,11 UP em pH 7,0 e 18,34 em pH 5,0. Esse isolado mostrou-se como melhor produtor também em pH 7,0

A atividade proteolítica de *P. fellutanum* para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0 (31,53 UP), embora não tenha se destacado entre os demais nesse valor de pH. As proteases desse isolado também mostraram um decréscimo gradativo da atividade enzimática com a diminuição dos valores de pH, sendo 28,83 UP em pH 7,0 e 18,65 UP em pH 5,0. Esse isolado mostrou-se como melhor produtor também em pH 7,0.

Em pH 7,0, nas condições do experimento, as maiores atividades foram obtidas por *Fusarium solani* (359), *Penicillium fellutanum* e *P. waksmanii* (668), que apresentaram, respectivamente, 29,11 UP, 28,83 UP e 27,63 UP. Os dois primeiros valores não diferiram estatisticamente a 5% pelo Teste de Tuckey (Tabela 10).

A variação enzimática em função da variação de pH para os melhores produtores em pH 7,0, *F. solani* (359) e *P. fellutanum*, já foi descrita anteriormente.

As maiores atividades proteolíticas em pH 9,0, nas condições do experimento, foram obtidas pelas espécies *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium*

moniliforme e *Fusarium solani* (359,) que exibiram 48,75 UP, 37,51 UP e 37,40 UP, respectivamente. Os dois últimos valores não diferiram estatisticamente (Tabela 10).

O melhor em pH 9,0 foi *A. ochraceus*; a sua produção proteolítica para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10 e Figura 12. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0. Observou-se um decréscimo significativo fora desse valor de pH, sendo 13,82 UP em pH 7,0 e 9,39 em pH 5,0.

A atividade proteolítica de *F. moniliforme* para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0, tendo sua atividade uma das melhores quando comparada aos demais isolados. Observou-se um decréscimo gradativo com a diminuição do pH, sendo 25,54 UP em pH 7,0 e 11,45 UP em pH 5,0.

A atividade proteolítica em função da variação de pH para *F. solani* (359) já foi descrita anteriormente.

A produção proteolítica de *P. waksmanii* (668) para diferentes valores de pH encontra-se na Tabela 10. O seu pH ótimo de atividade foi 9,0 (33,85 UP), embora neste valor de pH sua produção enzimática não tenha sido uma das maiores. Observou-se também um decréscimo gradativo da atividade em função da diminuição do valor de pH, sendo 27,63 UP em pH 7,0 e 12,45 UP em pH 5,0. Sua atividade em pH 7,0 foi uma das maiores dentre os isolados estudados.

O gênero *Paecilomyces* não apresentou atividades significativas em nenhum dos valores de pH.

TABELA 10 Atividade proteolítica de fungos filamentosos caseinolíticos em três diferentes valores de pH

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica (UP)		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>Aspergillus dimorphicus</i>	670	10,58 ^B	20,90 ^A	21,18 ^A
	671	20,35 ^C	23,53 ^B	31,74 ^A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	418	9,39 ^C	13,82 ^B	48,75 ^A
<i>Fusarium illudens</i>	358	8,74 ^C	16,51 ^B	27,59 ^A
<i>Fusarium lateritium</i>	224	0,52 ^A	0,11 ^A	0,00 ^A
<i>Fusarium moniliforme</i>	221	11,45 ^C	25,54 ^B	37,51 ^A
<i>Fusarium solani</i>	237	4,09 ^B	4,09 ^B	21,48 ^A
	359	18,34 ^C	29,11 ^B	37,40 ^A

...continua...

TABELA 10, Cont.

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>Paecilomyces sp</i>	321	8,18 ^C	15,38 ^B	19,46 ^A
<i>P.aurantiogriseum</i>	526	0,58 ^B	7,03 ^A	0,41 ^B
<i>P.aurantiogriseum Dierckx</i>	439	1,17 ^A	1,39 ^A	1,56 ^A
<i>P. brevicompactum</i>	243	13,44 ^C	20,53 ^B	27,36 ^A
	479	0,19 ^A	1,43 ^A	0,00 ^A
<i>Penicillium citrinum</i>	391	8,31 ^B	19,74 ^A	20,36 ^A
	723	10,89 ^C	20,72 ^B	29,91 ^A
	725	6,43 ^C	8,15 ^A	7,66 ^B

...continua...

TABELA 10, Cont.

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica (UP)		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>P. chrysogenum</i>	251	1,22 ^B	1,73 ^B	4,58 ^A
	351	3,06 ^A	1,41 ^C	2,40 ^B
	578	0,99 ^C	1,60 ^B	2,63 ^A
<i>P. corylophilum</i>	584	9,68 ^C	14,42 ^B	21,09 ^A
<i>Penicillium crustosum</i>	261	0,35 ^A	0,61 ^A	0,13 ^A
	388	0,16 ^A	0,09 ^A	0,03 ^A
<i>Penicillium expansum</i>	356	2,55 ^B	5,12 ^A	4,78 ^A
<i>Penicillium fellutanum</i>	309	18,65 ^C	28,83 ^B	31,53 ^A

...continua...

TABELA 10, Cont.

Espécie	Isolado	Atividade proteolítica (UP)		
		pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
<i>Penicillium implicatum</i>	660	11,51 ^C	14,21 ^B	22,08 ^A
<i>Penicillium roqueforti</i>	393	0,00 ^A	0,26 ^A	0,35 ^A
	397	0,00 ^A	0,00 ^A	0,11 ^A
	425	6,02 ^A	2,74 ^B	0,65 ^C
<i>Penicillium solitum</i>	324	10,58 ^C	20,83 ^B	31,06 ^A
	482	1,42 ^A	0,85 ^A	1,97 ^A
	637	0,03 ^A	0,07 ^A	0,07 ^A
<i>Penicillium waksmanii</i>	449	5,02 ^C	9,80 ^B	28,62 ^A
	668	12,45 ^C	27,63 ^B	33,85 ^A

Unidade proteolítica (UP): 1 UP é a atividade requerida para gerar uma OD₂₈₀ de 0,01 no sobrenadante por hora. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, pelo Teste de Tukey (5%).

Assim como foi observado para as bactérias, para todas as espécies de fungos filamentosos que apresentaram as maiores atividades enzimáticas ficou evidente que o pH é uma variável importante na atividade de proteases e específica para cada isolado. Estes isolados apresentaram características em comum. O pH ótimo para atividade proteolítica em todos os casos foi 9,0. Observou-se também, que fora deste pH, houve uma redução da atividade enzimática. O decréscimo da atividade proteolítica ocorreu à medida que houve a diminuição dos valores de pH. Essa característica de instabilidade fora de seu pH ótimo sugere que essas proteases têm maior poder de catálise em processos industriais com valor de pH 9,0. Apesar dessas características em comum, observando-se a tabela 10, verificou-se que cada isolado apresenta valores de atividade e um decréscimo específico, confirmando que a produção de proteases é dependente da linhagem (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Braga et al., 1998; Koka & Weimer, 2000). A Tabela 10 mostrou também outras variações de produções em função do isolado como as menores produções obtidas por outros isolados de *A. dimorphicus* (670), *Fusarium solani* (237) e *P. waksmanii* (449).

Embora os valores de pH 5,0 e 7,0 não tenha sido o pH ótimo para nenhum isolado de fungos filamentosos é importante selecionar os melhores produtores também nestes valores, pois a quantificação enzimática realizada foi de proteases totais. Portanto, não se sabe quantas proteases extracelulares foram produzidas para cada isolado.

4.7 Seleção de bactérias e fungos filamentosos a partir da quantificação proteolítica

Foram selecionados doze isolados, compreendendo seis bactérias e seis fungos filamentosos, que podem ser utilizados para estudos de caracterização proteolítica. Estes isolados foram selecionados por apresentarem as maiores atividades proteolíticas em pH 5,0; 7,0 e 9,0. Dentre as bactérias caseinolíticas,

caseinolíticas, as espécies selecionadas foram *B. megaterium* (817), *B. polymyxa*, *E. agglomerans*, *Kurthia sp* (1095), *P. paucimobilis* (1046) e *Tatumella pyseos* (1093). Dentre os fungos filamentosos caseinolíticos, as espécies selecionadas foram *A. dimorphicus* (671), *A. ochraceus*, *F. moniliforme*, *F. solani* (359), *P. fellutanum* e *P. waksmanii* (668).

As bactérias e fungos filamentosos são tradicionalmente conhecidos como bons produtores de proteases (Phadatare et al., 1993; Rao et al., 1998, Beg & Gupta, 2003). Neste trabalho, as bactérias e fungos filamentosos apresentaram percentuais significativamente superiores, 48,71% e 50% respectivamente, aos das leveduras (2,63%) quando submetidos ao teste qualitativo para hidrólise da caseína.

Alguns gêneros de microrganismos já foram amplamente estudados quanto à atividade proteolítica, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Barata et al., 2002; Durand-Poussereau et al., 1996; Kitano et al., 2002; Rajmohan et al., 2002; Uyar & Baysal, 2004). A importância de estudar outros gêneros e espécies deve-se ao fato da necessidade de obtenção de novas enzimas, uma vez que a aplicação de proteases está se estendendo a novos setores, exigindo uma especificidade cada vez maior (Germano et al, 2003).

A busca por novas espécies é incentivada pelas grandes empresas produtoras de proteases, uma vez que existe em todo o mundo um grande número de microrganismos que crescem em regiões e substratos diferentes, conferindo a eles características peculiares, que podem ser aquelas desejadas para a utilização na bioindústria (Novozymes, 2005). As leveduras, bactérias e fungos filamentosos utilizados neste estudo foram isolados dos frutos e grãos de café durante o processo de secagem via seca e armazenamento. Os frutos de café apresentam uma alta diversidade de espécies microbianas (Silva, 2004), além de uma composição química que inclui proteínas, carboidratos, óleos, ácidos e

caféina (Carvalho, 1998). Durante o processo de secagem dos frutos ocorrem alterações na estrutura e composição química dos frutos. Os microrganismos presentes nestes frutos precisam ter a capacidade de se desenvolverem em um substrato em constantes alterações, como mudança no pH e na disponibilidade de nutrientes (Silva, 2004). Poza et al. (2001) sugeriram que as propriedades da protease produzida por *C. caseinolytica* podem estar relacionadas com o hábitat natural dessa levedura, formado pelos que tecidos necróticos de cactus. Durante a necrose dos tecidos há uma ampla variação de pH, sendo, na fase inicial, 4,5 e, na fase final, 8,5. A protease produzida também apresentou atividade em uma ampla faixa de pH. Braga et al. (1998) testaram três valores de pH: 5,0; 7,0 e 9,0, em uma seleção de leveduras proteolíticas, porém algumas leveduras apresentaram menores atividades em pH 7,0 e nenhuma levedura apresentou atividade em pH 9,0. As maiores atividades foram produzidas em pH 5,0. O autor sugeriu que esses resultados podem estar associados com a acidez do substrato, tendo as leveduras sido isoladas do que possuía um pH de 3,0 a 6,0. Neste estudo, a maioria dos isolados testados apresentou atividade proteolítica nos três valores de pH, sugerindo assim que essa característica pode estar associada ao substrato natural (frutos e grãos de café), uma vez que esse substrato sofre uma variação de pH de 4,0 a 8,0 (Silva et al., 2004).

Os isolados selecionados, por apresentarem maior atividade proteolítica, tanto os de bactéria como os de fungos filamentosos, podem ser utilizados para estudos mais específicos, visando identificar as características de cada isolado, oferecendo assim condições de aumentar a sua produtividade (Andianarayana & Ellai, 2002; Çalik et al., 2002).

Neste estudo, foi determinada a atividade proteolítica extracelular total produzida, ressaltando que muitos microrganismos podem produzir mais de um tipo de protease (Koka & Weimer, 2000). As diferenças entre as curvas de crescimento ou a diferença na cinética de produção da enzima torna difícil a

comparação entre estes isolados selecionados (Braga et al., 1999). Da mesma forma que outros estudos de seleção de microrganismos, a avaliação proteolítica foi realizada após um dado período de crescimento (Braga et al., 1998).

Para verificar a variação cinética na produção de proteases deve-se fazer a monitorização em todas as etapas de crescimento e autólise. Vários estudos mostram diferentes produções de proteases ao longo do crescimento do microrganismo (Braga et al., 1999; Çalik et al., 2003; Ogrydziak, 1993).

Neste estudo, foi utilizado o mesmo meio de cultura para espécies diferentes, uma vez que em estudos de seleção é difícil oferecer condições específicas (Braga et al., 1998). Entretanto, esses isolados selecionados podem ser cultivados em meios mais específicos, visando uma melhor produção proteolítica tanto no aspecto de maior produtividade quanto em maior estabilidade.

A grande diversidade de recursos naturais e resíduos da agroindústria do Brasil fornece várias fontes para seleção de microrganismos proteolíticos (Azeredo et al., 2004; Bon et al, 2002; Germano et al. 2003).

5 CONCLUSÃO

Foram selecionados isolados proteolíticos, pela determinação qualitativa, em todos os grupos estudados, bactérias, leveduras e fungos proteolíticos, isolados dos frutos e grãos de café.

As bactérias e fungos filamentosos apresentaram os maiores percentuais de isolados selecionados, enquanto dentre as leveduras apenas um isolado apresentou atividade proteolítica, não sendo significativa.

Na avaliação quantitativa de atividade proteolítica a partir dos isolados selecionados qualitativamente a atividade enzimática foi característica para cada isolado e não para determinada espécie. O pH foi uma variável importante na atividade proteolítica, sendo também específico para cada isolado.

Foram selecionados seis isolados de bactérias *B. megaterium* (817), *B. polymyxa* (345), *E. agglomerans* (1037), *Kurthia sp* (1095), *P. paucimobilis* (1046) e *Tatumella ptyseos* (1093) e seis de fungos filamentosos *A. dimorphicus* (671), *A. ochraceus* (418), *F. moniliforme* (221), *F. solani* (359), *P. fellutanum* (309) e *P. waksmanii* (668) que apresentaram as maiores atividades proteolíticas, nas condições do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutae* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 5/6, p. 402-405, Mar. 2000.
- ADINARAYANA, K.; ELLAIK, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* **Journal of Pharmacy Pharmaceutical Science, Alberta**, v. 5, n. 3, p. 272-278, Sept./Dec. 2002.
- ANDRADE, V. S.; SARUBBO, L. A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, A.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 106-110, Apr./June 2002.
- AZEREDO, L. A. I.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, R. M. A.; LEITE, S. G. F.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp* isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 3/4, p. 354-358, Mar. 2004.
- AZEREDO, L. A. I.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; BENCHETRIT, L. C.; COELHO, R. R. R. Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hialuronidase activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 207-212, July 2001.
- BARATA, R. A.; ANDRADE, M. H. G.; RODRIGUES, R. D.; CASTRO, I. M. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, Oct. 2002.
- BARTHIAR, S.; ANDERSSON, A. G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 525-531, Apr. 2002.
- BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 294-304, Feb. 2003.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999. 992 p.

BENSLIMANE, C.; LEBRIHI, A.; LOUNES, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Influence of dextrans on the assimilation of yeast extract amino acids in culture of *Streptomyces ambofaciens* producer of spiramycin. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 11, p. 1003-1013, Nov. 1995.

BENTSI, T.; VAFOPOULOU-MASTROJINNAKI, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 68-77, 2003.

BOLUMAR, T.; SANZ, Y; ARISTOY, M-CONCEPTION, A; TOLDRÁ, F. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 167-177, Feb. 2005.

BON, E. P. S. Enzimas industriais: política e gestão. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. , 2002, Brasília. **Anais. . . Brasília, DF, 2002.**

BORÉM, F. M. Pós-colheita. Lavras: Editora UFLA, 2004, 103p.

BRAGA, A. A.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R. Screening of yeast from Brazilian Amazon Rain Forest for extracellular proteinases production. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 21, n. 3, p. 353-359, Aug. 1998.

BRAGA, G. U. L.; DESTEFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Produção de proteases durante o crescimento e análise de culturas submersas de *Metarhizium anisopliae*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-113, mar./abr. 1999.

BRUNO, M. E. C. **Utilização de proteases de origem bacteriana e fúngica na produção de biscoitos semidoces duros**. 1989. 143 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

ÇALIK, P.; BILIR, E. , ÇALIK, G.; OZDAMAR, T. H. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 5, p. 685-697, Oct. 2002.

ÇALIK, P.; ÇELIK, E.; TELLI, I. E.; OKTAR, C.; OZDEMIR, E. Protein-based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 7, p. 975-986, Dec. 2003.

ÇALIK, P.; KALENDER, N.; OZDAMAR, T. H. Overexpression of serine alkaline encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 7, p. 967-974, Dec. 2003.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. SILVESTRE. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 625-634, jul./set. 2003.

CARVALHO, V. D. **Qualidade do café**. Lavras: Editora UFLA, 1998. 53 p.

CHRZANOWSKA, J.; KOLCZKOWSKA, M.; POLANOWSKI, A. Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, n. 2, p. 140-143, Feb. 1993.

CRONLUND, A. D.; WOYCHICK, J. H. Effect of microbial rennets on eat fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, n. 3, p. 502-505, May/June 1986.

CRONLUND, A. D.; WOYCHICK, J. H. Solubilization of collagen in restructured beef with collagenase and α -amylase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 4, p. 857-860, July/Aug. 1987.

DUARTE, A. R.; CAVALCANTI, M. T. H.; CHAVES, A. C.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Caracterização de uma protease coagulante do leite extraída de *Jacaratia corumbensis* O. Kutze. PASTORE, G. M. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos....** Brasília, DF, 2002.

DURAND-POUSSEREAU, N.; FEVRE, M. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potencial use for protein production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 97-105, 1Oct. 1996.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. M. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, n. 12, p. 1009-1013, Dec. 1993.

FARLEY, P. C., IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, n. 12, p. 2539-2544, Dec. 1992

FERREIRA, H. P.; OLIVEIRA, D. T. M.; COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO, A. F. S. Produção de proteases fúngicas em soro de leite. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M. Formation of flavour compounds in cheese. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 45, p. 17-85, 1997.

FUJIWARA, N.; YAMAMOTO, K. Decomposition of gelatin layers on x-ray by the alkaline protease from *Bacillus sp* B21. **Hakkokogaku kaishi - Journal of the Society of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 6, p. 531-534, 1987.

FUJIWARA, N.; YAMAMOTO, K.; MASUI, A. Utilization of thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used x-ray film. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 72, n. 4, p. 306-308, 1991.

FURTADO, M. A. M.; GOMES, J. C.; SILVA, C. A. S. S.; ORNELLAS, C. B. D.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína Láctea co-precipitada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 625-639, jul./set. 2001.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp* produced by solid-state fermentation, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, Feb. 2003.

- GOBBETTI, M.; SMACCHI, E.; CORSETTI, A. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: Purification, and characterization of a Proteinase, a dipeptidase, and a aminopeptidase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3220-3226, Sept. 1996.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAÉZ, M. P. , GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins II. Molecular-weight range. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 44, n. 4, p. 529-532, Aug. 1994.
- GORBEL, B.; SELAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 513-518, Apr. 2003.
- GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos.** 1991. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 59, n. 1, p. 15-32, June 2002.
- HORIKOSHI, KORI Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, n. 4, p. 735-750, Dec. 1999.
- HUTADILOK-TOWATANA, N.; PAINUPONG, A.; SUNTINANALERT, P. Purification and characterization of extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp* PS719. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, n. 5, p. 581-587, May 1999.
- ISHIKAWA, H.; ISHIMI, K.; SUGUERA, M.; SOWA, A.; FUJIWARA, N. Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of x-ray film and release of silver particles. **Journal of Fermentation Bioengineering**, Osaka, v. 76, n. 4, p. 300-305, 1993.
- KILCAWLEY, K. L.; WILKINSON, M. G.; FOX, P. F. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 3, p. 310-320, Aug. 2002.

KITANO, H.; KATAOKA, K.; FURUKAWA, K.; HARA, S. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid protease-encoding gene (pep A) in *Aspergillus oryzae* in solid state culture (rice-koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93, n. 6, p. 563-567, June 2002.

KOELLER, K. M. ; WONG, C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature Insight**, London, v. 409, n. 6817, p. 232-240, Jan. 2001.

KOELSCH, G.; TANG, J.; LOY, J. A.; MONOD, M.; JACKSON, K.; FOUNDLING, X. L. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1480, n. 1/2, p. 117-131, July 2000.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Isolation and characterization of a protease form *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 280-288, Aug. 2000.

KUMAR, C. G.; TEWARE, M. P.; JANY, K. D. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic and some proprieties. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 441-449, July 1999.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1989. 725p.

LONGO, M. A.; NOVELLA, I. S.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as proteases producer under operating conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Oska, v. 88, n. 1, p. 35-40, July 1999.

LOZANO, P.; COMBES, D.; IBORRA, J. L. Food protein nutrient improvement by protease at reduced water activit. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 4, p. 876-880, July/Aug. 1994.

LU, S. F.; CHANG, P. P. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 5-9, Jan. 1996.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALVES DA SILVA, C. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Detecção do potencial biotecnológico em bactérias e leveduras isoladas de sedimentos de mangue. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos.... Brasília, DF, 2002.**

LYONS, T. P. Proteinases in industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 8 n. 2, p. 99-110, Feb. 1988.

MARQUART, M. M.; PAVAN, V.; GERMANI, J. C. Estudos de obtenção de proteases por *Bacillus cereus* em meio de proteína de soja. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos....** Brasília, DF, 2002.

MENDONÇA, A. L. L. ***Bacillus sp* produtores de proteases: isolamento, caracterização e melhoramento de *B. cereus***. 1995. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing, **Advances in Physics Lipids**, New York, v. 16, p. 181-189, 2000.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. A new developments in solid state fermentation II – Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, July 2000.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

MOON, S. H.; PARULEKAR, S. J. Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 41, n. 1, p. 43-54, Jan. 1993.

MOREIRA, K. A.; SILVA, A. C. J.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L. estudos preliminares das propriedades cinéticas da protease alcalina de *Nocardopsis sp* In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos....** Brasília, DF, 2002.

NC – IUBMB Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Recommendations of the nomenclature comitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of Enzyme-catalysed reactions**. Disponível em: <<http://www.chem.qmw.ac.uk/iumb/enzyme/>>. Acesso em: 31 jan. 2005.

NETO, J. A. Algumas aplicações de enzimas In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edigard Blucher, 2001, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial).

Novozymes. Disponível em: < <http://www.novozymes.com> >. Acesso em: 10 fev. 2005.

OGINO, H.; WATANABE, F.; YAMADA, M.; NAKAGAWA, S.; HIROSE, T. NOGUSHI. A purification and characterization of organic solvent stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, n. 5, p. 61-68, Nov. 1999.

OGINO, H.; YASUI, K. , SHIOTANI, T.; ISHIHARA, T.; ISIKAWA, T. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes na organic solvent stable proteolytic enzyme. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 12, p. 4258-4262, Dec. 1995.

OGRYDZIAK, D. M. Yeast extracellular proteases. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 13, n. 1, p. 1-55, Jan. 1993.

OH, Y. S.; SHIH, I. L.; TZENG, Y. M. , WANG, S. L. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the desproteinization of shrimp and crab shell wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1/2, p. 3-10, July 2000.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. . The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 29, n. 2, p. 119-131, Apr. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. A new developments in solid-state fermentation: bioprocess and bioproducts. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, July 2000.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and proprieties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 203-214, May 2001.

- PAPAGIANI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. Production of phytases by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 3/4, p. 397-402, Nov. 1999.
- PASTORE, G. M. Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Anais...** Brasília, DF, 2002.
- PEREIRA, C. I.; CRESPO, M. T. B.; ROMÃO, M. V. S. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 211-216, Sept. 2001
- PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86. 8. 20). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 72-76, 1993.
- PONEZI, A. N. **Proteases de levedura de cervejaria *Saccharomyces cerevisiae*, obtenção, caracterização e aplicação em panificação.** 1997. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916-921, Nov. 2001.
- RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.
- RAMAKRISHNA, T.; PANDIT, M. W. Self-association of α -chymotrypsin: effect of amino acids. **Journal of Bioscience**, Bangalore, v. 13, n. 3, p. 215-222, Sept. 1988.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.
- SAID, S. Aplicação de enzimas em medicamentos e análises clínicas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITUOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, London, v. 409, n. 6817, p. 258-268, Jan. 2001.

SANT ANNA JR. , G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A. , AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edigard Blucher, 2001, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial).

SANT ANNA JR. , G. L.; FRIERE, D. M. G. Aplicações de enzimas em tecnologia ambiental. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grão de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG**. 2004. 143 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, R. PCR induzido e recombinação in vivo e mutação sítio dirigida para melhorar termoestabilidade de glucoamilase de *A. awamori*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

SOCCOL, C. R.; KRIEGER, N. brazilian experiments for the valorization of agro-industrial water by solid state fermentation. **Advances in Biotechnology**, New York, v. 8, p. 25-40, 1998.

STECHE, E. E.; STOCKER, W. **Proteolytic enzymes tools and targets**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. 366 p.

STONER, M. R.; DALE, D. A.; GUALFETTI, P. J.; BECKER, T.; MANNING, M. C.; CARPENTER; RANDOLPH, W. Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 2, p. 114-125, Feb. 2004.

SZCZESNA-ANTCZAK; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in pVA-cryogel. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 2, p. 168-176, Feb. 2004.

THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation process. **Trends Biotechnology**, New York, v. 20, p. 103-105, Feb. 2002.

TSUJIBO, H.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, T.; INAMORI, Y. Purification and characterization of two types dealkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomycete. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 520-529, Oct. 1990.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 12, p.1893-1898, Oct. 2004.

VERMELHO, A. B.; MEIRELLES, M. N. L.; LOPES, A.; PETINATE, S. D. G.; CHAIA, A. A.; BRANQUINHA, M. H. Detection of extracellular proteases from microorganisms on Agar plates. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, Nov./Dec. 1996.

VERMELHO, A. B. , MELO, A. C. N.; SALVADOR, V. R. O.; SIMONE, G.; BRANQUINHA, M. H. Purificação de uma metaloproteinase extracelular de *Crithidia guilhermei*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

YANG, F.; LIN, I. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger* **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 23, p. 397-402, 1998.

ANEXOS

	Página
TABELA 1 Valores de pH no final da fermentação de isolados de bactérias.....	89
TABELA 2 Valores de pH no final da fermentação de isolados de leveduras e fungos filamentosos.....	90

TABELA 1 Valores de pH no final da fermentação de isolados de bactérias

Espécie	Isolado	pH final
<i>Acinetobacter sp</i>	378	8,22
	500	8,45
<i>Bacillus macerans</i>	376	8,52
<i>Bacillus megaterium</i>	749b	8,43
	817	8,47
<i>Bacillus polymyxa</i>	345	8,35
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1068	8,62
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1037	8,55
<i>Kurthia sp</i>	1044	8,46
	1080	8,43
	1095	8,33
<i>Providencia rettigeri</i>	1086	8,3
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	536	8,26
	1046	8,47
<i>Serratia plymutica</i>	719	8,25
	816	8,42
<i>Tatumella tyseos</i>	699	8,42
	804	8,24
	1093	8,32

pH do meio de cultivo para produção de proteases: 7,20

TABELA 2 Valores de pH no final da fermentação de isolados de leveduras e fungos filamentosos

Espécie	Isolado	pH final
Levedura		
<i>Cyteromyces matritensis</i>	567	3,94
Fungos		
<i>Aspergillus dimorphicus</i>	670	8,66
	671	8,15
<i>Aspergillus ochraceus</i>	418	8,32
<i>Fusarium illudens</i>	358	8,63
<i>Fusarium lateritium</i>	224	8,32
<i>Fusarium moniliforme</i>	221	8,66
<i>Fusarium solani</i>	237	8,81
	359	8,47
<i>Paecilomyces sp</i>	321	8,67
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	526	7,99
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	439	7,84
<i>Penicillium brevicompactum</i>	243	8,18
	479	7,7

...continua...

TABELA 2, cont.

Espécie	Isolado	pH final
<i>Penicillium citrinum</i>	391	8,42
	723	8,29
	725	8,47
<i>Penicillium chrysogenum</i>	251	8,41
	351	8,09
	578	7,99
<i>Penicillium corylophilum</i>	584	8,15
<i>Penicillium crustosum</i>	261	6,56
	388	7,39
<i>Penicillium expansum</i>	356	8,52
<i>Penicillium fellutanum</i>	309	8,4
<i>Penicillium implicatum</i>	660	8,64
<i>Penicillium roqueforti</i>	393	7,96
	397	8,06
	425	6,18
<i>Penicillium solitum</i>	324	8,34
	482	8,18
	637	6,77
<i>Penicillium waksmanii</i>	449	8,73
	668	8,22

pH do meio de cultivo para produção de proteases

levedura: 5,67

fungos: 6,29