

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

FERNANDA PALLADINO

**Estudo da síntese de enzimas por
Bacillus licheniformis E-44 em meio formulado
à base de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar**

Lorena – SP - Brasil

2008

FERNANDA PALLADINO

**Estudo da síntese de enzimas por
Bacillus licheniformis E-44 em meio formulado
à base de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Industrial

Área de Concentração: Microbiologia
Aplicada

Orientadora: Dr^a Maria das Graças de
Almeida Felipe

Lorena - SP

2008

Aos meus pais, Roberto e Maria de Lourdes, aos meus irmãos, Angela-Marcelo e Roberto-Joelma, ao meu sobrinho Lucas. Obrigada pela força, que vocês me deram durante toda esta etapa. Eu amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, luz e sabedoria em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis da minha vida.

A Dr^a Maria das Graças de Almeida Felipe, que durante o período do mestrado, me ajudou, orientou, ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e pessoal.

A Prof. Dr. Ismael Mancilha pelos ensinamentos durante o período que estive cursando o mestrado.

À Escola de Engenharia de Lorena e a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e concessão de bolsa durante um período para realização desta pesquisa.

Aos Professores Arnaldo Marcio, Adriane, João Batista, Walzinho, pelos ensinamentos.

Aos alunos de IC Gustavo e Karina pela ajuda e atenção. A Priscila, Luciane, Cláudia, Luis e Tais pela atenção, carinho e dedicação

A minha amiga e irmã, Juliana pela força e amizade durante todo o período do mestrado.

Aos queridos Nicamor, Paulinho, Djalma pelo auxílio das dificuldades laboratoriais e pelo carinho. Incluindo: André, Ismael, Lílian, Walkíria, Isanaldi, colegas da biblioteca e principalmente a Sandra Borges pelo carinho, atenção e boa vontade sempre.

A minha querida família de Lorena: Tia Ditinha, Lucia, Geraci, Tatiana, Rogério, Dania, Rodriguinho, Marcelo, D. Regina, pelo amor, carinho e dedicação

A Família Cardoso de Oliveira: Sr. Umberto, D. Araci, Rose e ao meu grande amor Umberto, obrigada pela amizade, carinho e dedicação.

A todos do Hotel Colonial, pelo carinho, amor, dedicação, principalmente Camila, Márcia, e Edson.

A Família Fumachi Franco: D. Otília, Silvana, Caiqui e Eduardo pelos conselhos e pela força transmitida durante todo o período.

Aos meus principais amigos: Jaqueline, Daniel, Fabinho, Cadú, Rodrigo pela amizade e dedicação.

As principais pessoas que estiveram sempre ao meu lado durante meu tratamento: Tia Maria (Baiana) , Dr. Ana Carolina Cavalga, Dr. Bianchi e Gláucia devo muito a vocês .

A empresa ATL por estar sempre me apoiando durante o período em que estive com eles, aos diretores D. Márcia e Sr. Raul e a todos os meus amigos que trabalham na empresa.

Nunca desista de seus sonhos.

Às vezes é preciso sonhar para que continuemos a viver e enfrentar as dificuldades do dia a dia. O sonho traz desilusão, é verdade, mas os momentos mais importantes e maravilhosos das nossas vidas são construídos por eles! Viver um sonho é uma experiência única que traz humildade e sempre tem uma lição que faz valer nossas vidas! Podemos viver momentos de extrema tristeza, em que encontramos nossa fé abalada, mas é nestas situações que o sonho sempre nos é confortável. O sonho nos ajuda a perceber pessoas que são de uma importância inestimável. Porém a angústia é convertida em felicidade quando descobrimos que entre aquelas pessoas existe ao menos uma que veio para abençoar nossas vidas, seja com uma palavra amiga, um abraço, ou mesmo um sorriso. Essa pessoa prefiro chamar de ANJO. Talvez esse seja o propósito de viver: Nascemos para sonhar, sonhamos para encontrar ANJOS, e ANJOS nos trazendo inspiração! Nunca deixe de Sonhar e jamais desista de seus sonhos.

BIOGRAFIA

FERNANDA PALLADINO, filha de Roberto Miguel Palladino e Maria de Lourdes Monte Palladino, nasceu em Itatiba – SP, a 23 de janeiro de 1979.

Em 1997, formou-se em técnico em Eletrônica, pela E.T.E. Rosa Perrone Scavone em Itatiba.

Em julho de 2005 graduou-se em Engenharia Industrial Química na FAENQUIL, (atual EEL-USP)

Em setembro de 2005, iniciou o curso de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, em nível de Mestrado, no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP.

RESUMO

PALLADINO, F. **Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2008.** 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

Hidrolisados obtidos de materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial para serem utilizados como meios de cultivo na produção de inúmeros metabólitos celulares de interesse comercial. Esta fonte orgânica de carbono, há anos tem sido utilizada para o cultivo de diferentes microrganismos, e recentemente para o crescimento de *Bacillus licheniformis*, uma bactéria Gram-positiva, utilizada na produção industrial de exoenzimas. Este projeto foi realizado com o objetivo de se desenvolver um meio de fermentação de baixo custo para o crescimento desta bactéria com vistas à síntese de proteases. Foi avaliado o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes farelo de arroz, caseína, extrato de levedura, extrato de carne e cloreto de sódio. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer em incubadora de movimento rotatório conforme planejamento experimental (2^{5-1}). Após o estabelecimento do meio que proporcionou maior crescimento celular este foi utilizado para avaliação da produção de proteases. De acordo com os resultados o *Bacillus licheniformis* E-44 foi capaz de crescer em meio formulado a base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar sendo necessário a sua suplementação com extrato de carne, extrato de levedura, farelo de arroz e NaCl e pH ajustado para 7,5 para a obtenção de máximo crescimento. De acordo com o planejamento estatístico, os nutrientes mais importantes na formulação do meio para crescimento de *B. licheniformis*, foram farelo de arroz e caseína, sendo necessárias suas máximas concentrações. Foram realizados experimentos comparando-se o crescimento de *Bacillus licheniformis* em meios semi-sintético contendo xilose ou glicose como fontes de carbono e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. De acordo com os resultados verificou-se que a glicose foi a melhor fonte de carbono para o crescimento desta bactéria e a xilose também foi assimilada. Não foi encontrada atividade de protease nas condições experimentais realizadas.

Palavras Chaves: *Bacillus licheniformis*, Fermentação, Hidrolisado de bagaço de cana, Proteases, Enzimas

ABSTRACT

PALLADINO, F. **Study of enzyme synthesis by *Bacillus licheniformis* E-44 in sugar cane bagasse hydrolysate medium.** 2008. 74f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

Hydrolysates obtained from lignocellulosic materials have a great potential for utilization as culture media in the production of numerous cell metabolites of commercial interest. For years, this organic carbon source has been used for the culture of different microorganisms, and recently for the growth of *Bacillus licheniformis*, a Gram-positive bacterium used in the industrial production of exoenzymes. This project was carried out with the objective of developing a low cost fermentation medium for growing this bacterium with a view to synthesizing proteases. An evaluation was made of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with nutrients, namely rice bran, casein, yeast extract, meat extract and sodium chloride. The assays were performed in Erlenmeyer flasks in rotary incubator according to an experimental design (2^{5-1}). The medium that provided the highest cell growth was used for evaluating the production of proteases. The results showed that *Bacillus licheniformis* E-44 was capable of growing in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate medium supplemented with meat extract, yeast extract, rice bran, and NaCl. For attainment of maximum growth, the pH had to be adjusted to 7.5. According to the statistical design, the most important nutrients in the formulation of a suitable medium to grow *B. licheniformis* were rice bran and casein at maximum concentrations. Assays were performed comparing the growth of *Bacillus licheniformis* in semi-synthetic media containing xilose or glucose as carbon source and in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. According to the results, the glucose was the best carbon source for the growth of this bacterium and the xilose was also assimilated. Protease activity was not found under the used experimental conditions.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Fermentation, Sugar Cane Bagasse Hydrolysate, Proteases, Enzymes

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 - Características Gerais das Bactérias do Gênero Bacillus	13
2.3 – Bacillus licheniformis	19
2.3.1 – Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de Enzimas	20
2.2.2.- Importância de Subprodutos Agroindustriais e Cervejeiros em Processos Fermentativos.	24
2.2.2.1. – Extrato de Levedura	24
2.2.2.2 – Farelo de Arroz.....	27
2.2.2.3 –Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar	28
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1- Microrganismo	32
3.2 – Meio de cultura para obtenção do inóculo	32
3.3 – Meio de Cultivo para a Fermentação	33
3.3.1 – Farelo de Arroz	33
3.3.2 - Preparo do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana	33
3.3.3 – Meio de Cultivo para crescimento de <i>B. licheniformis</i> e avaliação da produção de proteases	34
3.4 - Métodos Analíticos	36
3.4.1 - Determinação da concentração de açúcares e ácido acético	36
3.4.2 - Determinação da concentração de compostos fenólicos totais.....	37
3.4.3 - Determinação do pH.....	37
3.4.4 - Determinação de biomassa bacteriana	38
3.4.5 – Atividade Enzimática.....	38
3.4.5.1 – Preparação da Caseína desnaturada com uréia.	38
3.4.5.2– Curva padrão de Tirosina.....	39
3.4.5.3 – Determinação da Atividade Enzimática.....	39
3.4.5.4 – Cálculo da Unidade da Atividade Enzimática.....	40
3.5 - Metodologia Estatística	40
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 – Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço	41
4.2 – Avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana sobre o Crescimento de <i>B. licheniformis</i>.	41
4.2.1 Análise estatística e Modelagem Matemática para o crescimento celular de <i>B. licheniformis</i>	43
4.3 - Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Proteases por <i>B. licheniformis</i> em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana Sob Diferentes Valores de pH. __	52
4.4 - Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Proteases por <i>B. licheniformis</i> em Diferentes Fontes de Carbono em pH 7,5.	55
5 – CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 - INTRODUÇÃO

O Gênero *Bacillus* pertence a microrganismos Gram – positivos, saprófitos, aeróbicos ou facultativos, formadores de endósporos os quais podem ser isolados do solo e plantas de todo o mundo. Eles crescem bem em um meio simples e excretam enzimas hidrolíticas, como as proteases, mananases e glucanases. Dentre este gênero existe o *Bacillus licheniformis*, uma bactéria utilizada nas fermentações industriais para a síntese de proteases. Muitas espécies de *Bacillus* são versáteis capazes de utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os resíduos da agroindústria, como Torta de Soja, Bagaço de Cana, Farelo de Arroz e Farelo de Trigo. Recentemente tem sido conduzidas pesquisas que utilizam o melaço como meio alternativo para o cultivo de *Bacillus licheniformis*.

Várias espécies de *Bacillus* têm sido usadas como probióticos em animais e humanos devido a grande resistência aos antimicrobianos, sendo então propostos como uma alternativa no tratamento ou prevenção de desordens intestinais e como suplementos nutricionais.

O Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos da EEL - USP desenvolve projetos de caráter sustentável, baseado na Biotecnologia para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos que são fontes importantes de açúcares para a obtenção biotecnológica de diversos produtos de interesse econômico e social. Pesquisas para o desenvolvimento de meios de cultivo microbianos que sejam alternativos aos comercialmente utilizados e de baixo custo proporcionaria o aproveitamento de diferentes materiais lignocelulósicos na forma de hidrolisados, como o bagaço-de-cana. Estes meios poderiam ser utilizados para o crescimento de microrganismos

como *Bacillus licheniformis* de forma a se avaliar a capacidade desta bactéria em produzir proteases. A suplementação nutricional adequada destes hidrolisados é importante de forma a fornecer todos os nutrientes essenciais para o seu crescimento microbiano e síntese das enzimas.

É importante ressaltar que este projeto, que visa a avaliação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para o crescimento e síntese de proteases por *B. licheniformis* dará continuidade aos trabalhos de cooperação entre a Universidade de Matanzas em Cuba e a EEL - USP.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Características Gerais das Bactérias do Gênero Bacillus

O Gênero Bacillus pertence a microrganismos Gram – positivos, saprófitos, aeróbicos ou facultativos, formadores de endósporos que podem ser isolados do solo e plantas de todo o mundo (SNEATH, 1986), sendo capazes de sintetizar e excretar diversas enzimas proteolíticas durante sua fase de crescimento e esporulação (VITKOVIC; SADOFF, 1977). Eles crescem bem em um meio simples e produzem as enzimas hidrolíticas, como as proteases, mananases e glucanases, independente do meio de cultura usado (SAMANYA; YAMAUCHI, 2002; e SHUMI, TOWHID-HOSSAIN; ANWAR, 2004) . Nunca foi reportado sobre a patogenicidade dos microrganismos deste gênero, que tem sido utilizado extensivamente na produção industrial de exoenzimas. (VEITH et al., 2004).

Segundo Kenneth, 2005, a espécie Bacillus, tem atraído interesse desde 1872, pela extraordinária resistência de seus endósporos à agentes químicos e físicos, pelo ciclo de crescimento para formar esses endósporos e pela produção de antibióticos. Existem 77 espécies reconhecidas do gênero Bacillus (Tabela 2.1):

Tabela 2.1 - Espécies de *Bacillus* reconhecidas. De: www.bacterio.cict.fr, atualizada em Janeiro de 2007. As subespécies não estão incluídas.

<i>B. agaradhaerens</i>	<i>B. alcalophilus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>B. atrophaeus</i>	<i>B. azotoformans</i>
<i>B. badius</i>	<i>B. benzoeverans</i>	<i>B. carboniphilus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>B. chitinolyticus</i>	<i>B. circulans</i>
<i>B. clarkii</i>	<i>B. clausii</i>	<i>B. coagulans</i>
<i>B. cohnii</i>	<i>B. edaphicus</i>	<i>B. ehimensis</i>
<i>B. fastidiosus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. flexus</i>
<i>B. fumarioli</i>	<i>B. fusiformis</i>	<i>B. gibsonii</i>
<i>B. globisporus</i>	<i>B. halmapalus</i>	<i>B. haloalkaliphilus</i>
<i>B. halodenitrificans</i>	<i>B. halodurans</i>	<i>B. halophilus</i>
<i>B. horikoshii</i>	<i>B. horti</i>	<i>B. infernos</i>
<i>B. insolitus</i>	<i>B. kaustophilus</i>	<i>B. laevolavtus</i>
<i>B. lentus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. marinus</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>B. methanolicus</i>	<i>B. mojavenensis</i>
<i>B. mucilaginosus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. naganoensis</i>
<i>B. niacini</i>	<i>B. oleronius</i>	<i>B. pallidus</i>
<i>B. pasteurii</i>	<i>B. pseudocaliphilus</i>	<i>B. pseudofirmus</i>
<i>B. pseudomycoides</i>	<i>B. psychrophilus</i>	<i>B. psychrosaccharolyticus</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>B. schlegelii</i>	<i>B. silvestris</i>
<i>B. simplex</i>	<i>B. siralis</i>	<i>B. smithii</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>B. sporothermodurans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>B. thermoamylovorans</i>	<i>B. thermocatenulatus</i>
<i>B. thermocloaceae</i>	<i>B. thermodenitrificans</i>	<i>B. thermoglucosidasius</i>
<i>B. thermoleovorans</i>	<i>B. thermosphaericus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
<i>B. tusciae</i>	<i>B. vallismortis</i>	<i>B. vedderi</i>
<i>B. vulcani</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	

Espécies de *Bacillus* geralmente crescem bem em meios definidos contendo várias fontes de carbono. Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídeos, permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons. Vários *Bacillus* produzem antibióticos como, por exemplo, a bacitracina, poliximina, tirocidina, gramicidina e circulina. Na maioria dos casos, a produção de antibióticos está relacionada ao processo de esporulação. Existe ampla diversidade na fisiologia deste gênero, no qual as características coletivas incluem a degradação de muitos substratos derivados de

plantas e animais como fontes de carbono, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas, hidrocarbonetos e outros (THE GENUS BACILLUS). Muitas espécies de *Bacillus* são versáteis, capazes de utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os subprodutos da agroindústria, Torta de Soja, Bagaço de Cana, Farelo de Arroz e Farelo de Trigo, (SOCCOL; VANDENBERGH, 2003) como substratos respiratórios. Em muitos casos, eles fermentam carboidratos e produzem glicerol e butanodiol. A maioria são mesófilos com temperaturas ótimas entre 30 e 45 °C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem à temperatura de 65°C ou mais altas (STAINER et al., 1986). O gênero *Bacillus* é amplamente utilizado na indústria, na manufatura de enzimas comerciais, principalmente amilases e proteases e também em bioinseticidas e no tratamento de água. (REIS, 2004).

2.2- Produção de Enzimas por *Bacillus*

A grande variedade de enzimas sintetizadas por *Bacillus* estão resumidas na Tabela 2.2. A amilase e a protease são provavelmente as mais comuns, e das 48 espécies de *Bacillus* listadas no Bergey's Manual Determinative Microbiology (GIBSON; GORDON, 1975) 32 degradam amido e a maioria degradam caseína. As proteases microbianas tem sido divididas em dois grupos (MORIHARA, 1974), sendo proteases serinas ou proteases metais (Tabela 2.2). As proteases ocupam 60% do mercado mundial de vendas em decorrência de sua ampla aplicação em diferentes atividades industriais

Tabela 2.2 - Enzimas extracelulares do Gênero *Bacillus*

Enzimas	Espécie	Comentários	Referências
α -amilase	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Endohidrólise das ligações glicosídeas α 1-4 em polissacarídeos; as diferentes espécies produzem enzimas com diferentes propriedades	WELKER; CAMPBELL, 1967
	<i>B. caldolyticus</i>		HEINEM; HEINEM, 1972
	<i>B. coagulans</i>		BLIESMER ; HARTMAN, 1973
	<i>B. licheniformis</i>		MEERS, 1972 e SAITO, 1973
	<i>B. macerans</i>		LANE; PIRT, 1973
	<i>B. stearothermophilus</i>		PFUELER; ELLIOT, 1969
	<i>B. subtilis</i>		MATSUZAKI et al., 1974
Aminopectidase	<i>B. licheniformis</i>		HALL; KUNKEL; PRESCOTT, 1966
	<i>B. subtilis</i>		RAY; WAGNER, 1972
Protease metais	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Enzimas exigem Ca^{2+} para a estabilidade e Zn^{+} para a atividade; pH ótimo perto da neutralidade	KEY ; WILDI, 1970
	<i>B. cereus</i>		FEDER et al, 1971
	<i>B. licheniformis</i>		HALL; KUNKEL; PRESCOTT, 1966
	<i>B. megaterium</i>		MILLET; ACHER, 1971
	<i>B. polymyxa</i>		FOGARTY ; GRIFFIN, 1973
	<i>B. subtilis</i>		MILLET, 1970
Proteases Serinas	<i>B. thermoproteolyticus</i>	pH ótimo alcalino, resíduos serina perto do sítio ativo	LEVY et al., 1975
	<i>B. thuringiensis</i>		LI ; YOSTEN, 1976
	<i>B. amyloliquefaciens</i>		KEY; MOSER, 1969
	<i>B. licheniformis</i>		KEY; MOSER; WILDI, 1970
	<i>B. pumilus</i>		KEY; MOSER; WILDI, 1970
	<i>B. subtilis</i>		MILLET, 1970
Proteases Serinas Metais	<i>B. licheniformis</i>	Enzimas com características de proteases serinas e proteases metais	VITKOVICK; SADOFF, 1977
	<i>B. pumilus</i>		CHAU; URBANEK, 1974
β - Lactamase	<i>B. anthracis</i>	Hidrólise da ligação amida do anel lactâmico de penicilinas e cefalosporina	FOGARTY; GRIFFIN; JOYCE, 1974
	<i>B. cereus</i>		DAVIES; ABRAHAM, 1974
	<i>B. licheniformis</i>		MEADWAY, 1969
	<i>B. megaterium</i>		FOGARTY; GRIFFIN; JOYCE, 1974
	<i>B. subtilis</i>		FOGARTY; GRIFFIN; JOYCE, 1974
Endo-N-acetilglucosaminidase	<i>B. licheniformis</i>		BROWN; YOUNG, 1970
	<i>B. subtilis</i>		FORSBERG; ROGERS, 1974
N- acetil- murami-L alanina amidase	<i>B. licheniformis</i>	Hidrolise do triacilglicerol para diacilglicerol e um ânion de ácido graxo	JONSSON; SNYGG, 1974
	<i>B. subtilis</i>		

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato (classificados como amino e carboxipeptidases, respectivamente), enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio envolvido com a catálise: em serina proteases, cisteína proteases, aspártico-proteases ou aspártico-endopeptidases e metaloproteases ou metaloendopeptidases (RAO et al., 1998),

Segundo o fato de serem as proteases pequenas enzimas monoméricas (com exceção das leucinas e aminopeptidases), estudos estruturais e cinéticos são facilitados. Embora as diferentes classes destas enzimas sejam catalisadoras das mesmas reações, elas utilizam diferentes mecanismos, sendo alguns melhores estudados do que outros. (FERSHT, 1985)

As proteases têm uma diversidade de aplicações, como na preparação de protoplastos, transformação de leveduras para isolamento de produtos de recombinação de DNA, no estudo da composição e mecanismo da síntese da parede celular, na digestão de polissacarídeos e proteínas da parede celular de leveduras para a obtenção de proteínas intracelulares e pigmentos, na obtenção de extrato de levedura, no tratamento de massa celular de levedura residual, para ração animal, no tratamento de doenças provocadas por leveduras e fungos (FLEURI;

SATO, 2005), na fabricação de detergentes (NASCIMENTO; MARTINS, 2006) e como probióticos em animais e humanos (PEREZ et al., 2007).

Os probióticos e prebióticos, considerados como estabilizantes da flora intestinal agem melhorando a saúde animal, aumentando o aproveitamento das proteínas e aminoácidos, reduzem a mortalidade embrionária e o colesterol, entre outras (MARTIN, 1994).

Originalmente, muitos produtos comerciais foram vendidos como produtos que contém esporos de *Bacillus subtilis*, mas estudos recentes têm mostrado que a maioria dos produtos são classificados e procedem de outras espécies de *Bacillus*, incluindo *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilis* e uma variedade de cepas de *Bacillus cereus* (GREEN et al, 1999; HOA, et al 2000). Por outro lado, as espécies de *Bacillus* formadores de endósporos, têm sido extensivamente estudadas desde que os mesmos tenham sido utilizados como agentes probióticos para eliminar bactérias enteropatogênicas em animais e seres humanos. (DUC, L.H.; HONG, H.A. e CUTTING, S.M., 2003) e (PEREZ et al., 2007).

Entre os prebióticos que têm sido mais estudados como aditivos em alimentação estão os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS) (ROBERFROID, 1996). Este conceito implica que alguns componentes da dieta resistem à hidrólise por enzimas digestivas e/ou não são absorvidas no trato gastrointestinal. Assim estes componentes passam para o intestino grosso onde a maior parte da microbiota intestinal está localizada. Uma grande variedade de carboidratos da dieta, especialmente amido resistente, fibras e oligossacarídeos não digeríveis têm tais características e servem como substrato para bactérias no cólon .Qualquer alimento que atinge o cólon, ou seja carboidratos

não digeríveis, alguns peptídeos e proteínas, bem como certos lipídeos, são candidatos a prebióticos. (WAITZBERG et al, 2001).

2.3 – *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis (uma bactéria de interesse no gênero, pelo caráter não patogênico) está amplamente distribuída na natureza, sendo uma bactéria do solo, encontrada principalmente associada com plantas e materiais de plantas bem como próxima a este local pela alta resistência de seus endósporos que são disseminados com a poeira (VEITH et al., 2004)

Por várias décadas o *B. licheniformis* vem sendo utilizado na produção industrial de alfa-amilase e várias proteases (Bio-Technical Resources). Ele é classificado como GRAS (Generally Reconized As Safe) por U.S. Food and Drug Administration na produção de alfa-amilase (BTR Bio-Technical Resources). Muitas das atividades das proteases extracelulares produzidas por *B. licheniformis* (ÇALIK, 1997) consistem em duas enzimas proteolíticas: proteases serina alcalina (SAP) e proteases naturais (NP) (ÇALIK, 1998).

Dentre as várias espécie de *Bacillus* adequadas para a produção de endósporos e enzimas destaca-se o *B. licheniformis*, *B. Subtilis*, *B. cereus* e *B. clausii*, sendo estes utilizados como probióticos em animais e humanos (CASULA, et al., 2002 e SLAPIKOFF, 1971).

O extrato enzimático obtido pela ação fermentativa do *B. licheniformis* pode ser utilizado na hidrólise da parede celular de levedura, como *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é um subproduto proveniente do processo cervejeiro. O hidrolisado da parede da levedura é rico em glicomananoproteínas, podendo ser utilizado como prebiótico ligando-se à fimbria de bactérias patogênicas inibindo

assim, sua colonização no trato gastrointestinal, podendo também ser utilizadas como nutrientes pelas bactérias do gênero *Bacillus*. (MAIORKA et al, 2001).

Segundo Flemming (2005), microrganismos capazes de se multiplicar e se adaptar rapidamente ao meio intestinal da maioria dos animais são os pertencentes ao grupo dos probióticos e prebióticos. Este autor realizou um trabalho com 2400 aves para comparar o efeito do uso de probióticos (*B. licheniformis* e *B. subtilis*), probiótico mais mananoligossacarídeos (MOS), promotor de crescimento (avilamicina) e uma dieta controle sem aditivos, e concluiu que na fase inicial, o probiótico apresentou resultados significativos para ganho de peso. Segundo estes autores os melhores resultados de ganho de peso e conversão alimentar apresentados pelo probiótico comparativamente aos grupos controle e antibiótico na fase inicial de vida, sugerem um melhor equilíbrio entre os microrganismos (*B. licheniformis* e *B. subtilis*) (FLEMMING, 2005).

2.3.1 – Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de Enzimas

Para o desenvolvimento de um eficiente processo de obtenção de enzimas pela indústria, é de fundamental importância conhecer os vários parâmetros de fermentação. A relação Carbono / Nitrogênio no meio de fermentação regula a produção de proteases e a variação desta razão pode ser alterada, sendo que seu aumento pode ser feito utilizando a alimentação contínua, permitindo assim prolongar a fase estacionária da cultura. Estes pesquisadores relatam ainda que este artifício, bem como as estratégias de purificação, dependem das propriedades da protease em questão (GUPTA et al., 2002). Além da importância da relação Carbono/ Nitrogênio no meio de cultivo para crescimento microbiano e produção de proteases (GUPTA et al., 2002), outros parâmetros fermentativos devem ser

destacados, como: natureza e concentração dos substratos (inclusive estudos de repressão e indução na produção de enzimas), pH ótimo para o crescimento microbiano, produção e atividade enzimática, temperatura e tempo de incubação.

Com relação a concentração de substratos, Ferrero et al. (1996), evidenciaram que a caseína foi a melhor fonte de carbono para a produção de protease termoestável por *Bacillus* sp e que a enzima permaneceu estável sem a adição de estabilizadores. Este substrato também pode ser utilizado na suplementação das fermentações de *B. licheniformis*, pois apresenta um elevado valor nutricional e alta susceptibilidade à ação catalítica de todas as proteases conhecidas (ADACHI et al., 1991). Outro substrato que pode ser utilizado no processo de fermentação para o crescimento microbiano e produção de proteases é o extrato de carne, este foi utilizado por PEREZ et al. (2007) para avaliar o crescimento microbiano e a produção de enzimas proteolíticas por *B. licheniformis* E-44 à uma concentração de 2g/L, enquanto Sayem, Alan, e Hoq (2006) utilizaram o extrato de carne à 5 g/L como nutriente durante a fermentação. Com relação à fonte de sais, PEREZ et al. (2007) utilizaram o NaCl (5g/L) como suplemento para crescimento microbiano e produção de enzimas proteolíticas por *B. licheniformis* E-44. Manachi e Fortina (1998), isolaram uma variedade de *B. licheniformis* halotolerante de sedimentos marinhos, com capacidade para produzir protease com alta atividade durante a breve fase estacionária de crescimento. Estes autores utilizaram água do mar no meio de fermentação e verificaram aumento da atividade enzimática em 150% mostrando particularidades em variedades específicas da bactéria.

Além da composição do meio de cultura, a temperatura é um dos mais importantes fatores que afetam o crescimento microbiano e a produção de

proteases, como constatado por Ferrero et al. (1996). Durante pesquisas com *B. licheniformis* MIR29, estes autores conseguiram melhores resultados em termos de atividade enzimática à 60°C, enquanto Al-Sheri, Mostafa e Yasser, (2004), em estudo com esta bactéria verificaram a existência de uma relação positiva entre produção de protease e incubação à temperaturas superiores a 50° C, sendo a temperatura ótima 55°C. Perez et al. (2007) também avaliaram o crescimento e produção de proteases por *B. licheniformis* E-44 e a atividade hidrolítica da preparação enzimática. Nestes experimentos foi utilizado um meio formulado a base de peptona bacteriológica, extrato de carne, extrato de levedura e NaCl, à um pH 7,4 e uma temperatura de 40°C por 28 horas. Estes autores concluíram que nestas condições é possível obter uma preparação enzimática de *B. licheniformis* E-44 com capacidade de hidrólise da parede celular de *S. cerevisiae* obtendo-se oligossacarídeos com atividade prebiótica. A produção de proteases extracelulares também foi avaliada durante a fermentação submersa e fermentação no estado sólido empregando-se *B. Subtilis* (SOARES, s.d.), encontrando-se os maiores níveis de enzimas à temperatura entre 37°C e 40°C, enquanto o aumento da temperatura para 45°C, reduziu a produção de enzimas, possivelmente devido à desnaturação da protease pela temperatura. Hameed et al (1996) descobriram que a temperatura à 36 ° C é considerada a temperatura ótima para crescimento e produção de proteases por *B. licheniformis*.

Assim como em relação à temperatura, a variação do pH também tem grande interferência no crescimento microbiano, produção e atividade enzimática. Ferrero et al. (1996) estudando a produção de proteases alcalinas em *B. licheniformis* MIR29, observaram maior crescimento em pH acima de 9,0, o que também foi observado por Manchini e Fortina (1998), em *B. licheniformis* haloterante, isolado de

sedimentos marinhos. A influência das condições de pH sobre a regulação metabólica na produção de protease serina alcalina por *B. licheniformis* foi determinada em estudos conduzido por Çalik et al. (2002). Estes autores investigaram uma faixa de pH entre 7,0 e 7,5, observando-se na primeira fase de crescimento (0-20 h), uma tendência significativa do pH para o consumo de glicose, o que foi ótimo em pH 7,5. Por outro lado, o decréscimo do pH para 7,25 favoreceu a produção de proteases na fase estacionária, enquanto pH 7,0, segundo estes autores, foi ótimo para a produção de biomassa nesta fase. Como o aumento na concentração de biomassa gera aumento na produção da fase estacionária, o pH inicial ótimo para a produção de proteases, deveria estar entre 7 e 7,25.

Trabalhos realizados por Al-Sheri e Mostafa (2004), analisando propriedades de proteases produzidas por *B. licheniformis* isolado na Arábia Saudita, concluíram que a produção de protease foi particularmente sensível ao pH ácido, sendo máxima em condições de pH inicial alcalino (mais especificamente, em pH=8,0). A produção da enzima teve diminuição gradual até 18,4% quando pH inicial foi de 11. A atividade máxima foi observada em pH=9,0, comprovando a possibilidade de utilização em detergentes. Patel e Singh (2005), observaram crescimento de *Bacillus* sp em pH entre 7,0 e 9,0, sendo ótimo em pH=8,0, sendo que o crescimento em pH 8,0 e 9,0 foi comparável e o crescimento em pH 7,0 foi significativamente reduzido. Este estudo mostrou também gradual aumento na produção de protease com o aumento do pH, onde o pH ótimo foi 9,0. Sayem et al. (2006) verificaram o efeito do pH na fermentação do *B. licheniformis*, em diferentes valores, tendo sido constatado que o pH ótimo para a produção de proteases alcalinas se deu em pH 8,5, porém em outra estirpe de *B. licheniformis*, o pH ideal foi 8,0. Em trabalho realizado por Perez et al. (2007), o *B. Licheniformis* foi capaz de produzir proteases com

capacidade de hidrólise das paredes celulares de *S. cerevisiae* em condições de pH 7,4.

O tempo de incubação é também um parâmetro importante a ser avaliado quando se deseja obter proteases por *B. licheniformis* conforme constatado por Perez et al. (2007). Estes autores encontraram máxima atividade da protease com *B. licheniformis* após 20 horas de cultivo, enquanto Silva, Delatore e Martins (2007), estudando a mesma espécie, obtiveram o máximo da produção de protease com apenas 14 horas de cultivo, o que pode ser explicado em função da variação dos nutrientes empregados e densidade do inoculo (PURI; BEG; GUPTA, 2002).

2.2.2.- Importância de Subprodutos Agroindustriais e Cervejeiros em Processos Fermentativos.

2.2.2.1. – Extrato de Levedura

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool etílico a partir da cana-de-açúcar, com uma produção estimada de mais de 12 bilhões de litros anuais. O processo de produção de etanol utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente de fermentação. A prática operacional, nas destilarias de álcool, gera um excedente de levedura da ordem de 20 à 30 Kg de biomassa por m³ de álcool produzido (LAHR; GHIRALDINI; ROSSEL, 1996). Todo esse “resíduo” era destinado à alimentação bovina, mas há alguns anos este quadro vem sendo revertido, pois a biomassa de levedura em sua forma íntegra além de apresentar um elevado valor nutritivo, apresenta baixo custo de produção e tem sido largamente utilizado não apenas na ração animal, mas também pode ser uma boa alternativa

para a alimentação humana (DZIEZAK, 1987^a; 1987b; HALASZ; LASZTITY, 1991; SGARBIERI, 2002). *S. cerevisiae* vem sendo utilizada na alimentação humana e animal para diversas finalidades, como: levedura de panificação, utilizada na fermentação de pães; levedura ativa, como catalisador biológico, nas indústrias cervejeiras, vinhos e álcool; levedura inativa, como fonte de nutrientes em alimentos naturais ou ingredientes nutritivos, em alimentação humana e animal; derivados de levedura, usados como ingredientes nutritivos e funcionais, em vários setores da indústria de alimentos (DZIEZAK, 1987a, 1987b; HALASZ; LASZTITY, 1991; SGARBIERI, 2002).).

O extrato de levedura contém todo o material solúvel do autolisado, incluindo proteínas, peptídeos, aminoácidos livres, nucleotídeos, oligossacarídeos e minerais (HALASZ; LASZTITY, 1991). A fração insolúvel composta principalmente de parede celular é rica em mananoproteínas, β -glicanas e mananas (SANTUCCI et al, 2003 b). Além de apresentar um elevado valor protéico, entre 45 e 65 %, os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B (B_1 , B_2 , B_6 , ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), minerais macro (Ca, P, Mg, K, Na, Al, Fe) e micronutrientes (Mn, Cu, B, Zn, Mo, Cd, Ni, Pb, Si e Se) além de carboidratos (HALASZ; LASZTITY, 1991).

Tem havido uma forte tendência de explorar comercialmente leveduras, através do isolamento de alguns de seus principais constituintes como enzimas (invertase, lactase), nucleotídeos, proteínas (mananoproteínas), polissacarídeos (glicana, manana) além de lipídeos como fosfolipídeos e ergosterol (BELÉM; LEE, 1998; CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; KOLLAR; STURDIK; SAJBIDOR, 1992). Esses componentes isolados apresentam propriedades específicas de grande interesse em Ciência de Alimentos e em Nutrição. Nas destilarias de álcool

(etanol) e nas cervejarias são gerados excedentes de células de levedura que, inativadas termicamente ou não, poderão ser usadas diretamente (células íntegras de levedura) ou ser processadas para obtenção de vários derivados (YAMADA et al, 2003)

Yamada et al (2003) avaliaram a composição centesimal e valor protéico (Tabela 2.3) de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados e adição desses componentes a ração de ratos Wistar. Estes autores verificaram que o concentrado protéico fosforilado promoveu maior crescimento dos ratos, seguido pelo extrato e autolisado de levedura e que as células íntegras apresentaram a menor capacidade de promoção de crescimento em ratos.

Tabela 2.3 - Composição centesimal da levedura íntegra e de derivados de levedura de destilaria de álcool.

Componente (% b.s.)	Extrato	Levedura íntegra	Autolisado	Concentrado Protéico Fosforilado
Proteína (Nx5,8)	50,7	39,6	40,4	62,4
Fibra alimentar				
total	3,3	31,4	31,2	6,2
solúvel	3,3	30,3	30,4	ND
insolúvel	0,0	1,1	1,0	ND
Cinzas	11,7	4,6	6,2	13,0
Lipídios totais	0,4	0,5	1,2	8,5
Ácido	8,3	9,0	5,6	9,8
ribonucléico				
Não	25,6	14,9	15,4	0,1
determinado				

% b.s. = % base seca

ND = não determinado

FONTE: YAMADA et al, 2003

Para atender ao setor industrial, a Biorigin desenvolveu extratos de levedura ricos em aminoácidos livres, minerais e vitaminas, sendo um complexo de nutrientes eficiente para ser utilizado em processos de fermentação industrial e meios de cultura (BIONIS).

2.2.2.2 – Farelo de Arroz

O farelo de arroz é o subproduto do polimento ou beneficiamento do arroz após a remoção da casca silícica e lignocelulósica, constituído da camada intermediária entre a casca e o endosperma. É constituído de pericarpo, testa, aleurona e gérmen, além de quantidade variável de amido, dependendo do grau de polimento. A operação de beneficiamento do arroz com casca para obtenção do arroz branco produz em média 8% de farelo de arroz (SCHOULTEN et al., 2003). O farelo é composto por uma mistura de substâncias, como proteínas, gorduras, cinzas, fibras, vitaminas e minerais (Tabela 2.4) e suas concentrações são largamente afetadas pelo tipo e/ou fase do beneficiamento (FREEMAN, s.d.). É rico em ácidos graxos insaturados, principalmente em ácido oléico e linoleico. Além disto contém outros componentes como α -orinazol, esteróis e tocoferol (BATISTA et al., 2004). Devido ao elevado teor de gorduras, pode sofrer reações de rancificação se armazenado por períodos prolongados. Alguns processos removem as gorduras até níveis de 1 a 2%, combatendo o potencial de rancificação, porém diminuindo seu valor energético. Como outros farelos, o de arroz é rico em fósforo e deficiente em cálcio (FREEMAN, s.d.).

Tabela 2.4 - Composição do farelo de arroz.

Componentes principais (%)		Aminoácidos (%)				Vitaminas (mg/Kg)		Minerais (g/Kg)	
Matéria seca*	91,0	Arginina*	0,5	Lisina*	0,5	Colina*	1,25	Ca [□]	0,57
Proteínas*	13,0	Cisteína*	0,1	Metionina*	0,2	Niacina*	297	Fe [□]	0,19
Carboidratos*	45,0	Glicina*	0,9	Fenilalanina*	0,4	Ác. Pantotênico*	23,1	Mg [□]	7,81
Gorduras*	13,0	Histidina*	0,2	Treonina*	0,4	Riboflavina*	2,64	P [□]	16,8
Fibras*	14,0	Isoleucina*	0,4	Triptofano*	0,1	Tiamina*	22,0	K [□]	14,9
Cinzas*	16,0	Leucina*	0,6	Valina*	0,6	Vitamina E [□]	49,2	Na [□]	0,05
Celulose*	24,4	Cistina [□]	0,3	Tirosina [□]	0,4	Vitamina B ₆ [□]	41,0	Zn [□]	0,06
Hemicelulose*	31,6	Alanina [□]	1,0	Aspartato [□]	1,3	Folatos [□]	0,63	Mn [□]	0,14
Lignina*	18,4	Glutamato [□]	1,9	Prolina [□]	0,7	Vitamina K [□]	0,02	Se [□]	0,16

* MILLER, CHURCHILL, 1986.

□ Nutrition Facts for Rice Bran - Crude, 2004.

♦ CLAYE et al., 1996.

O farelo de arroz vem sendo avaliado como aditivo ou substituto de certos componentes de rações animais (LEKULE; SARWATT; MUNISI, 2001; SCHOULTEN et al., 2003), como substrato para crescimento de fungos (WANG et al., 2003) e como substituto, ao menos em parte, da farinha de trigo na fabricação de pães e outros alimentos (LIMA et al., 2004). Também o farelo de arroz vem sendo empregado em substituição do extrato de levedura na suplementação dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar (LIMA et al., 2004), resíduos de eucalipto (CANETTIERI, et al., 2001), palha de arroz (MUSSATO, et al., 2002), casca de aveia (FELIPE, et al., 2003), palha de trigo (CANILHA, 2003), para a produção de xilitol nas pesquisas realizadas há vários anos por pesquisadores do Grupo de Microbiologia Aplicada e de Bioprocessos (GMBio) da EEL - USP.

2.2.2.3 –Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar

No Brasil, o mais abundante subproduto lignocelulósico é o bagaço de cana-de-açúcar, material fibroso obtido após a moagem da cana para extração do caldo. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a safra de

açúcar para 2007/08 está estimada em 475,07 milhões de toneladas, das quais 47,0% (223,48 milhões de toneladas) são para a fabricação de açúcar e 53,0% são para a produção de álcool. Quando comparado com a safra de 2006/2007, verifica-se um crescimento de 10,62% (45,60 milhões de toneladas). Este aumento se deu em função das boas condições climáticas, dos bons tratos culturais, da irrigação e da introdução de novas variedades mais produtivas (CONAB, 2007).

O bagaço de cana apresenta em sua composição 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000), constituindo um importante subproduto da indústria sucroalcooleira. Por hidrólise ácida, a fração hemicelulósica é separada e o hidrolisado rico em açúcares prioritariamente rico em xilose seguido de glicose e arabinose, pode ser utilizado em diversos processos biotecnológicos (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER, et al., 2005; PANDEY et al., 2000)

Cerca de 60 a 90% deste bagaço são utilizados como fonte energética substituindo o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras e para a geração de energia elétrica (NOTÍCIAS FAPESP, 1998; GODOY; ALVES, 2007). Além disto, outras formas de utilização do bagaço de cana-de-açúcar têm sido empregados como matéria-prima na indústria de papel e papelão, fabricação de aglomerados, material alternativo na construção civil, ração animal e na produção de biomassa microbiana, revestimentos acústicos, forragem para agricultura, álcool, alcalóides e enzimas (DOMINGUEZ et al., 1996; LACÔRTE et al., 1986; NOTÍCIAS FAPESP, 1998, PANDEY et al, 2000)

Devido ao alto teor de hemicelulose no bagaço, pesquisas tem sido feitas quanto ao seu aproveitamento alternativo na formulação de meio para produção

microbiológica de xilitol (FELIPE et al., 1997a, RODRIGUES, 2001, SILVA et al., 2004, SANTOS, 2005).

Segundo Pandey et al. (2000), o bagaço de cana, foi utilizado em diversos processos microbianos tanto em fermentação submersa quanto sólida onde este pode servir tanto como nutrientes ou suporte inerte para o crescimento microbiano. Os autores concluem que a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar pode ser economicamente vantajoso.

Para o aproveitamento do bagaço de cana como hidrolisado é necessário a hidrólise para a liberação dos açúcares componentes de suas frações celulósicas e hemicelulósicas. Vários procedimentos de hidrólise podem ser utilizados como hidrólise enzimática, alcalina e ácida. A hidrólise ácida vem sendo bastante empregada como forma de obtenção de hidrolisados hemicelulósicos para a utilização destes em diferentes bioprocessos. Entretanto, durante o procedimento de hidrólise são liberados além dos açúcares compostos tóxicos dos microrganismos como ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural. Metodologias de redução da concentração destes compostos têm sido empregadas como tratamento prévio do hidrolisado pelo ajuste de seu pH, resinas de troca iônica e/ou adsorção em carvão vegetal ativado (FELIPE, 2004). De acordo com trabalhos da literatura não é necessário a redução de todos estes compostos do meio uma vez que quando estes estavam presentes no meio em baixas concentrações, como no caso do ácido acético, verificou-se o favorecimento da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (SILVA et. al, 2004).

Rodrigues, et al. (2001) caracterizaram o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida conforme apresentado na Tabela 2.5:

Tabela 2.5 - Concentração de açúcares, compostos tóxicos e metais do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Açúcares (g/L)	Xilose	18,2400
	Glicose	1,2000
	Arabinose	1,7100
Compostos Tóxicos (g/L)	Ácido Acético	3,3800
	Fenóis Totais	0,0420
	Furfural	0,0840
	Hidroximetilfurfural	0,0030
	ρ -Ácido hidroxibenzóico	0,0020
	Ácido Vanílico	0,0042
	Ácido Siringico	0,0050
	Vanilina	0,0006
	ρ -Ácido Coumarílico	0,0001
Metais (g/L)	Ácido Feurílico	0,0001
	Alumínio	0,0623
	Boro	0,0005
	Bário	0,0002
	Cálcio	0,1901
	Cromo	0,3865
	Ferro	0,4278
	Potássio	0,2449
	Magnésio	0,0549
	Manganês	0,0101
	Sódio	0,0040
	Níquel	0,0293
	Fósforo	0,0344
	Enxofre	3,4336
	Sílica	0,1019
	Estrôncio	0,0009
	Zinco	0,0226

Diferentes métodos de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana tem sido empregados, para a sua destoxificação como a utilização do carvão ativo e resinas trocadoras de íons (CARVALHO et al., 2005, MARTON et al., 2006), além de polímeros vegetais (SILVA, 2006).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios do grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP.

3.1- Microrganismo

Os experimentos foram realizados com a bactéria *B. licheniformis* E – 44 proveniente da Universidade de Matanzas / Cuba. A cultura foi mantida em meio contendo 10 g/L de Glicose, 10 g/L de Peptona, 6 g/L de Cloreto de Sódio, 2 g/L de Caseína, 2 g/L de Extrato de Levedura e 15 g/L de ágar, em pH 8, sob refrigeração à 4 ° C.

3.2 – Meio de Cultura para Obtenção do Inóculo

Os inóculos foram obtidos a partir de alçadas de *B. licheniformis* transferidas da cultura estoque citada no item 3.1, para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio com os seguintes nutrientes: 5g/L de Peptona Bacteriológica, 1 g/L de Extrato de Carne, 2 g/L Extrato de Levedura, 10 g/L de Caseína, 5 g/L de Cloreto de Sódio e completou-se o volume com Tris-HCL pH 8,5. O cultivo ocorreu em Shaker à 40°C por 15 horas. As soluções de nutrientes (Tabela 3.1), bem como de Tris-HCL foram autoclavados separadamente à 0,5 atm por 15 minutos.

Tabela 3.1 - Tabela de nutrientes utilizada no preparo do inóculo.

Nutrientes	Solução Estoque	Concentração no meio
Peptona Bacteriológica	100 g/L	5 g/L
Extrato de Carne	50 g/L	1 g/L
Extrato de Levedura	50 g/L	2 g/L
NaCL	100 g/L	5 g/L
Caseína	100 g/L	10 g/L

3.3 – Meio de Cultivo para a Fermentação

3.3.1 – Farelo de Arroz

O farelo de arroz foi fornecido pela Beneficiadora São José situada em Canas. A obtenção da solução de farelo foi feita conforme metodologia que vem sendo utilizada no GMBio a qual consiste da preparação de uma solução estoque de extrato de farelo (200 g/L), obtida da autoclavagem a 0,5 atm por 15 minutos, após a centrifugação em condições assépticas descartando-se o precipitado e utilizando-se o sobrenadante como nutriente.

3.3.2 - Preparo do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana

Foi utilizado o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida o qual já havia sido previamente concentrado à vácuo (2 vezes) e armazenado em câmara fria à 4°C. Este hidrolisado foi primeiramente diluído com água (1/3) de forma a reduzir a concentração inicial de açúcares para favorecer o crescimento da bactéria. Em seguida este foi tratado com vistas a reduzir a concentração de compostos tóxicos, como o ácido acético e fenólicos os quais são tóxicos aos microrganismos (MARTON et al., 2006). O tratamento constituiu em elevação do pH para 7,0 com CaO, seguido da redução para pH 2,5 com ácido

fosfórico sob agitação. Foi realizado uma filtração à vácuo. Com o volume filtrado foi adicionado 1% m/v de carvão ativo, levando para o Shaker à 60°C por 30 minutos à 200 rpm. Foi realizado outra filtração à vácuo e após esta filtração o hidrolisado foi diluído (1/3).

3.3.3 – Meio de Cultivo para Crescimento de *B. licheniformis* e Avaliação da Produção de Proteases

O meio de cultivo foi formulado a partir do hidrolisado autoclavado a 0,5 atm por 15 minutos e suplementado com os diferentes nutrientes de acordo com o Planejamento Estatístico, conforme apresentado nas Tabelas 3.2 e 3.3 para o caso das fermentações em que se estabeleceu a formulação do meio inicialmente para o crescimento da bactéria.

O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio a pH 7,5, em duplicata, à 40°C sob agitação de 200 rpm em incubadora tipo Shaker rotatório (New Brunswick, Científico). Após 26 horas de fermentação, foi determinado o crescimento celular e o pH foi avaliado após centrifugação das amostras sendo o volume restante de cada frasco armazenado em tubos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para a determinação da concentração de xilose.

Na Tabela 3.2 estão apresentados os fatores e os níveis das variáveis analisadas, enquanto na Tabela 3.3 a matriz de planejamento experimental (fatorial completo 2^{5-1} com triplicata no ponto central), contendo os fatores e os níveis codificados.

Tabela 3.2 - Fatores e níveis do planejamento fatorial.

FATORES	NÍVEIS		
	[-]	[0]	[+]
Farelo de Arroz (FA)	5,0 g/L	7,5 g/L	10 g/L
Extrato de Carne (EC)	0,5 g /L	0,75 g/L	1,0 g/L
Extrato de Levedura (EL)	1,0 g/L	1,5 g/L	2,0 g/L
Caseína (C)	5,0 g/L	7,5 g/L	10,0 g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	3,0 g/L	4,5 g/L	6,0 g/L

Nível superior: +1; Nível inferior: -1, Nível Central: 0

Tabela 3.3 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^{5-1} com ponto central

Ensaio	Fatores									
	FA		EC		EL		C		NaCl	
01	-	5,0	-	0,5	-	1,0	-	5,0	+	6,0
02	+	10	-	0,5	-	1,0	-	5,0	-	3,0
03	-	5,0	+	1,0	-	1,0	-	5,0	-	3,0
04	+	10	+	1,0	-	1,0	-	5,0	+	6,0
05	-	5,0	-	0,5	+	2,0	-	5,0	-	3,0
06	+	10	-	0,5	+	2,0	-	5,0	+	6,0
07	-	5,0	+	1,0	+	2,0	-	5,0	+	6,0
08	+	10	+	1,0	+	2,0	-	5,0	-	3,0
09	-	5,0	-	0,5	-	1,0	+	10	-	3,0
10	+	10	-	0,5	-	1,0	+	10	+	6,0
11	-	5,0	+	1,0	-	1,0	+	10	+	6,0
12	+	10	+	1,0	-	1,0	+	10	-	3,0
13	-	5,0	-	0,5	+	2,0	+	10	+	6,0
14	+	10	-	0,5	+	2,0	+	10	-	3,0
15	-	5,0	+	1,0	+	2,0	+	10	-	3,0
16	+	10	+	1,0	+	2,0	+	10	+	6,0
17	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5
18	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5
19	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5

Após a definição da formulação do meio que favoreceu o crescimento celular que foi suplementação do hidrolisado com as máximas concentrações de Farelo de Arroz (10g/L) e de Caseína (0g/L) e os mínimos de Extrato de Carne (0,5 g/L), Extrato de Levedura (1,0 g/L) e NaCL (3,0 g/L). A partir do meio otimizado, foram realizados novos experimentos para se avaliar o efeito do pH (6,5, 7,5 e 8,5), sobre o crescimento e produção de proteases por *B. licheniformis*. Além destes experimentos foram realizados experimentos controles utilizando meios semi-sintético contendo glicose (10 g/L) ou xilose (10 g/L) como fontes de carbono e hidrolisado hemicelulósico de bagaço. Estes meios foram suplementados com os mesmos nutrientes e concentrações estabelecidas na formulação do meio otimizado a base de hidrolisado, sendo o pH inicial igual a 7,5.

Tanto nos experimentos para a avaliação do pH bem como nos controles, amostras (correspondentes a 2 frascos Erlenmeyer para cada tempo) foram retiradas no início, após 9, 18 e 26 horas. Após cada tempo de cultivo foi determinado o crescimento celular e em seguida os volumes restantes de cada frasco foram centrifugados para determinação do pH e armazenados em tubos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para a determinação da concentração de açúcares para determinação da atividade de protease..

3.4 - Métodos Analíticos

3.4.1 - Determinação da Concentração de Açúcares e Ácido Acético

As concentrações dos açúcares D-xilos, D- glicose e L-arabinose e bem como de ácido acético foram determinadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (SHIMADZU – LC-10 AD), empregando-se as seguintes condições: coluna BIO RAD

Aminex HPX-87H(370 x 7,8mm); temperatura da coluna, 45°C; detector de índice de refração RID-6^A; eluente, solução de H₂SO₄ 0,01N; fluxo de 0,6mL/min; sendo 20µL o volume da amostra volume da amostra injetada. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro SEP PAK C18 (*MILIPORE*) e o eluente foi filtrado a vácuo em membrana HAWP e em seguida degaseificado em banho de ultra-som (*THORTON*) por 25 minutos.

3.4.2 - Determinação da Concentração de Compostos Fenólicos Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada utilizando-se o método colorimétrico de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999). Foi adicionado 0,2 mL do reagente de Folin Ciocalteu em 3 mL de amostra diluída e em seguida esta mistura foi mantida sob agitação constante com auxílio de um vórtex, por alguns segundos. Logo após, foi adicionado ao sistema 0,8 mL de Na₂CO₃ (150 g/L), e realizou-se nova agitação para homogeneização do meio reacional. Após a completa homogeneização, a amostra foi mantida na ausência de luz por 30 minutos e transferida para uma cubeta (vidro) de 1 cm de percurso ótico. A absorbância da solução resultante foi lida a 760 nm em um espectrofotômetro computadorizado BECKMAN DU640B e comparada com uma curva de calibração empregando-se vanilina (1 a 13 mg) como padrão.

3.4.3 - Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em pH-metro *MICRONAL* modelo B-474, o qual executa leituras de temperatura através de uma sonda apropriada (tipo Pt100) e tem uma faixa de trabalho que vai de $-5,0$ a $+105^{\circ}\text{C}$.

3.4.4 - Determinação de Biomassa Bacteriana

A biomassa foi determinada através da leitura da absorbância (560 nm) em Espectrofotômetro (Beeckman DU-640B). Foi realizada curva padrão correlacionando a biomassa (0-0,5 mg/mL) com a leitura em absorbância (540 nm), sendo esta utilizada para comparar com as leituras em absorbância nos diferentes tempos de crescimento.

3.4.5 – Atividade Enzimática.

O método para determinação da atividade da protease foi realizado de acordo com Perez et al. (2007).

3.4.5.1 – Preparação da Caseína Desnaturada Com Uréia.

A caseína foi preparada pesando-se 2,2 g de caseína a qual foi dissolvida em 16 mL de solução de NaOH (0,5N), 50 mL de água destilada e 36 g de uréia. Esta solução foi colocada sob agitação durante 1h para solubilização da caseína, após esta solubilização foi adicionado 4 gramas de uréia. O pH foi ajustado para 7,5 com ácido fosfórico em solução 1mol/L.

3.4.5.2– Curva Padrão de Tirosina

A curva padrão de tirosina foi preparada a partir de uma solução de Tirosina à 0,181% em HCl 0,5N. Esta solução foi diluída com HCl 0,5N nas seguintes proporções: 1/200, 1/150, 1/100, 1/75, 1/50, 1/20, 1/15, 1/10 e 1/5. Pipetou-se 0,5 mL de cada diluição e adicionou-se em tubos de ensaios: 1,5mL de NaOH 1N, 0,5mL do reagente de Folin diluído 1/3 e 1,5 mL de água destilada. Esta solução foi mantida em repouso por 30 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 650 nm contra um branco sem tirosina.

Com os valores de absorbância de cada ponto traçou-se uma curva de absorbância por concentração de tirosina, extrapolou-se em um sistema de eixos cartesianos mediante à um sistema de computação (Excel). Traçou-se uma reta linear e determinou-se a equação ($y = m \cdot x + b$).

3.4.5.3 – Determinação da Atividade Enzimática.

Para determinação da atividade enzimática foi pipetado 2,5 mL da caseína desnaturada (item 3.6.5.1) e foi colocado em tubo de ensaio. Estas amostras foram deixadas em banho termostato à 50° C. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do extrato enzimático e incubou-se por 30 minutos em banho à 50° C. Para interromper a reação foi adicionado 5 mL de Ácido Tricloro Acético à 5%. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do sobrenadante.

Um volume de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado em um tubo de ensaio Juntamente com 1,5 mL de NaOH (1N), 0,5mL do Reagente de Folin (1/3) e 1,5mL de água destilada. Esta mistura foi utilizada para a determinação da absorbância

em Espectrofotômetro à 650 nm contra um branco. Este branco foi preparado da mesma forma que o extrato enzimático, porém o extrato enzimático foi adicionado depois do TCA para que não ocorresse a reação.

O valor da absorbância foi calculado através da curva padrão para determinação do μ moles de tirosina.

3.4.5.4 – Cálculo da Unidade da Atividade Enzimática.

A atividade enzimática de tirosina foi calculada através da equação 1, apresentada abaixo;

$$U/mL = \frac{\mu \text{ moles de tirosina} \times D \times 8}{\text{Tempo de incubação} \times D \times 0,5 \text{ mL}} \quad \text{Equação (1)}$$

D = Diluição do Extrato Enzimático

8 = Diluição da enzima na análise

0,5 = Volume da enzima na análise

Tempo de incubação = 30 minutos

3.5 - Metodologia Estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando-se os programas Statistica 5.0 e Design- Expert

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço

A Tabela 4.1 apresenta as características do hidrolisado ácido (pH ~1,0) diluído (1/3).

Tabela 4.1 - Características do hidrolisado utilizado nos experimentos

Componentes	Concentrações (g/L)
Glicose	0,392
Xilose	11,80
Arabinose	0,8806
Fenóis Totais	1,544
Ácido Acético	2,117

Como pode ser observado na Tabela 4.1 a xilose (11,80 g/L) é o açúcar predominante no hidrolisado hemicelulósico, seguida dos açúcares arabinose (0,8806 g/L) e glicose (0,392 g/L) em baixíssimas concentrações. Os compostos considerados tóxicos aos microrganismos presentes também no hidrolisado, são o ácido acético (2,117 g/L) e os fenólicos (1,544 g/L). Não há relatos na literatura referente a interferência destes compostos sobre a atividade metabólica de *B. licheniformis*.

4.2 – Avaliação do Efeito da Suplementação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana Sobre o Crescimento de *B. licheniformis*.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com os nutrientes Farelo de Arroz (FA), Extrato de Carne (EC), Extrato de Levedura (EL), Caseína (C) e Cloreto de Sódio (NaCl),

foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} tendo como resposta o crescimento de *B. Licheniformis*, mantendo-se o pH inicial à 7,5.

Tabela 4.2 - Fatores do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

FATORES	NÍVEIS		
	[-]	[0]	[+]
Farelo de Arroz (FA)	5,0 g/L	7,5 g/L	10 g/L
Extrato de Carne (EC)	0,5 g /L	0,75 g/L	1,0 g/L
Extrato de Levedura (EL)	1,0 g/L	1,5 g/L	2,0 g/L
Caseína (C)	5,0 g/L	7,5 g/L	10,0 g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	3,0 g/L	4,5 g/L	6,0 g/L

Nível superior: +1; Nível inferior: -1, Nível Central: 0

Tabela 4.3 – Matriz e resultados do planejamento experimental fatorial 2^{5-1} com ponto central

Ensaio	Fatores										Variáveis Resposta		
	FA	EC	EL	C	NaCl	pHf ¹	Δ ABS ²	Consumo de Xilose (%)					
01	-	5,0	-	0,5	-	1,0	-	5,0	+	6,0	7,97	0,9795	24,451
02	+	10	-	0,5	-	1,0	-	5,0	-	3,0	7,95	1,0376	29,069
03	-	5,0	+	1,0	-	1,0	-	5,0	-	3,0	8,09	0,9367	10,618
04	+	10	+	1,0	-	1,0	-	5,0	+	6,0	7,99	1,0564	24,731
05	-	5,0	-	0,5	+	2,0	-	5,0	-	3,0	8,11	0,9857	46,466
06	+	10	-	0,5	+	2,0	-	5,0	+	6,0	7,95	1,080	7,944
07	-	5,0	+	1,0	+	2,0	-	5,0	+	6,0	8,10	0,9866	7,164
08	+	10	+	1,0	+	2,0	-	5,0	-	3,0	7,96	1,0776	34,242
09	-	5,0	-	0,5	-	1,0	+	10	-	3,0	7,95	1,0993	22,857
10	+	10	-	0,5	-	1,0	+	10	+	6,0	7,92	1,2089	14,169
11	-	5,0	+	1,0	-	1,0	+	10	+	6,0	7,98	1,0961	11,146
12	+	10	+	1,0	-	1,0	+	10	-	3,0	7,87	1,1654	2,6856
13	-	5,0	-	0,5	+	2,0	+	10	+	6,0	7,99	1,0937	30,995
14	+	10	-	0,5	+	2,0	+	10	-	3,0	7,91	1,1984	16,693
15	-	5,0	+	1,0	+	2,0	+	10	-	3,0	7,92	1,0282	24,960
16	+	10	+	1,0	+	2,0	+	10	+	6,0	7,94	1,1461	9,9378
17	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5	7,95	1,0566	23,728
18	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5	7,98	1,0828	6,7796
19	0	7,5	0	0,75	0	1,5	0	5,0	0	4,5	7,95	1,0979	15,870

pH^{f1} = pH final

Δ ABS² = Absorbância à 540 nm (Valores resultantes da diferença entre Absorbância inicial e Absorbância final)

Com o auxílio dos programas Statistica 5.0 e Design- Expert foram calculados as estimativas dos efeitos, análise da variância e análise da curvatura para os fatores estudados segundo o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com triplicata no ponto central. A partir do teste t de “student”, foi feita uma triagem inicial permanecendo no modelo somente os fatores que apresentaram efeito significativo à 95% de confiança ($p < 0,05$).

4.2.1 Análise Estatística e Modelagem Matemática Para o Crescimento Celular de *B. licheniformis*

As estimativas, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para o crescimento celular encontram-se na Tabela 4.4, no qual pode se verificar que os fatores Caseína (C) e o Farelo de Arroz (FA) (apresentaram efeito significativo ao nível de 95% ($p < 0,05$) de confiança, enquanto o Extrato de Levedura (EL), Extrato de Carne (EC) e o NaCl, não apresentaram significância ao nível de 95% de confiança.

Tabela 4.4 - Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “ Student” e níveis de significância para o crescimento celular segundo um planejamento fatorial 2^{5-1} com mais 3 ensaios no ponto central.

Fator	Efeito	Erro-padrão	t	p
Média	1,073513	0,005224	205,4852	0,000024
Curvatura	0,011175	0,026295	0,4250	0,712204
FA	0,095575	0,010449	9,1472	0,011741
EC	-0,023750	0,010449	-2,2730	0,150923
EL	0,002050	0,010449	0,1962	0,862582
C	0,112000	0,010449	10,7192	0,008591
NACL	0,014800	0,010449	1,4165	0,292332

Tabela 4.5 - Análise da variância para os fatores estudados, segundo planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com triplicata no ponto central.

Fonte	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Curvatura	0,000079	1	0,000079	0,1806	0,712204
FA	0,036538	1	0,036538	83,6711	0,011741
EC	0,002256	1	0,002256	5,1667	0,150923
EL	0,000017	1	0,000017	0,0385	0,862582
C	0,050176	1	0,050176	114,9007	0,008591
NACL	0,000876	1	0,000876	2,0064	0,292332

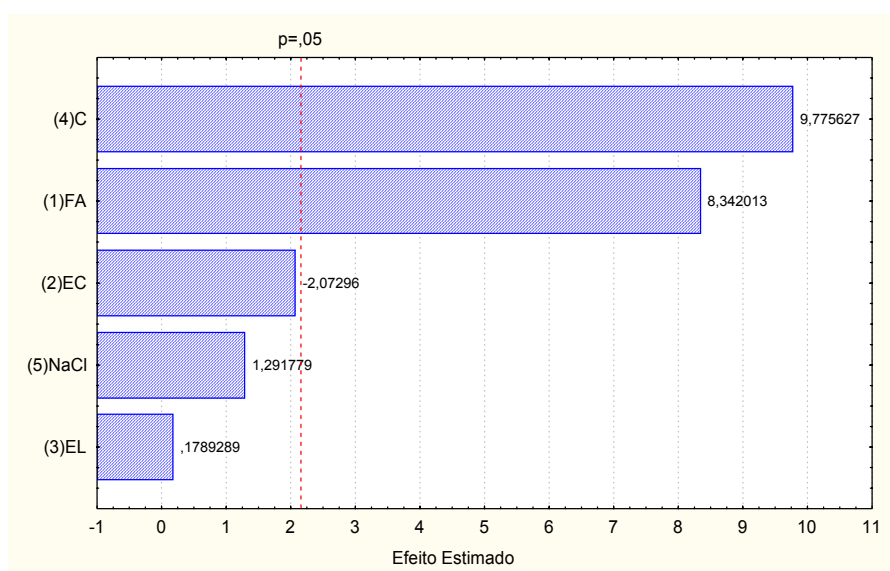


Figura 4.1: Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a variável resposta Crescimento Celular.

Verifica-se pela Figura 4.1 que a variação da Caseína (C) e do Farelo de Arroz (FA) exerce maior efeito sobre o crescimento celular. Enquanto que o Extrato de Carne (EC), o Extrato de Levedura (EL) e o NaCl não exerceu influência significativa sobre a variável resposta.

Tabela 4.6 - Estimativa de Efeito (EE), erros-padrão (E), teste t de Student (t) e Nível de Confiança (p) para o crescimento celular de *B. licheniformis*.

Fator	Efeito	Erro-padrão	t	p
Média	1,074395	0,005728	187,5620	0,000000
FA	0,095575	0,012484	7,6556	0,000001
C	0,112000	0,012484	8,9712	0,000000

Com base nos dados citados acima (Tabela 4.6) a curvatura provavelmente não se ajusta ao modelo quadrático, com isso os dados foi ajustado ao modelo linear e foi retirado o que não era significativo como Extrato de Carne (EC), Extrato de Levedura (EL) e NaCl, permanecendo apenas a Caseína (C) e o Farelo de Arroz (FA).

Os modelos empíricos e as análises estatísticas desempenham um papel extremamente importante na elucidação dos mecanismos básicos em situações complexas, providenciando uma melhor compreensão e controle do processo. A metodologia da superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização baseada no emprego de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. Se a resposta for bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, então a função de aproximação é um modelo de primeira ordem, se existir curvatura no sistema, um polinômio de grau superior, como um modelo de segunda ordem, deverá ser usado para aproximar a resposta. (SEM; SWAMINATHAN, 1997; ALVES et al., 1997). O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. Segundo Moldavsky e Cohen (1996) existem três critérios principais para a validação de modelos:

1- Análise da variância para determinar a significância de cada termo ajustado na equação ajustada e para determinar a qualidade de ajuste em cada caso. O valor de

F de Fischer calculado é comparado com o valor de F teórico ($F_{\alpha, p-1, n-p}$) onde α é o risco escolhido, sendo normalmente 0,05; n é o número total de ensaios e p o número de termos do modelo.

2- Coeficiente de correlação múltipla ou de determinação (R^2)

3- Teste da falta de ajuste, que indica se a falta de ajuste entre os valores experimentais e calculados pelas equações de modelo pode ser explicada pelo erro experimental. Os critérios para a validação do modelo podem ser resumidos, conforme consta na Tabela 4.7:

Tabela 4.7 – Critérios para validação de diferentes modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).

Análise da variância	Coeficiente de correlação	Falta de ajuste	Validação do modelo
$p < 0,1$	$R^2 > 0,9$	_____	Sim
	$0,7 < R^2 < 0,9$	$p > 0,01$	Sim
		$p < 0,01$	Não
$p > 0,1$	$R^2 < 0,7$	_____	Não
	_____	_____	Não

O ajuste do modelo linear aos dados experimentais foi testado segundo critérios apresentados na Tabela 4.7 e a análise da variância para os possíveis modelos está apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Análise da variância para o modelo estudado segundo Planejamento Estatístico Fatorial fracionado 2^{5-1} com triplicata no ponto central

Fonte	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	0,086	2	0,043	65,54	< 0,0001	0,89
Curvatura	0,000079	1	0,000079	0,1806	0,712204	-
Falta de ajuste (linear)	0,009102	14	0,000650	1,4887	0,473450	-

Observa-se que o modelo linear é significativo ao nível de 95% de confiança, e portanto pode ser utilizado para descrever o comportamento da variável resposta em função dos fatores analisados. Verifica-se que o modelo linear é o mais adequado para o ajuste, o valor do coeficiente de determinação R^2 0,89 e não há indícios de falta de ajuste ao modelo testado considerando a condições de validação segundo Moldavsky e Cohen (1996).

Tabela 4.9 - Estimativa de Efeito (EE), erros-padrão (E), teste t de Student (t) e Nível de Confiança (p) para o crescimento celular de *B. licheniformis* nas condições ótimas

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t	p
Média	1,074395	0,005728	187,5620	0,000000
FA	0,047788	0,006242	7,6556	0,000001
C	0,056000	0,006242	8,9712	0,000000

O modelo matemático restante que descreve o crescimento celular *B. licheniformis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana é definido pela seguinte equação:

$$Y = 1,07 + 0,048 \text{ FA} + 0,056 \text{ C} \quad (\text{equação 2})$$

Sendo Y = Crescimento celular

Este modelo prevê o favorecimento do crescimento celular do *B. licheniformis*, trabalhando com o nível máximo de +1 (10g/L) de Caseína e nível máximo de +1 (10 g/L) de Farelo de Arroz.

A Figura 4.2 demonstra que os valores preditos pelo modelo são próximos aos observados.

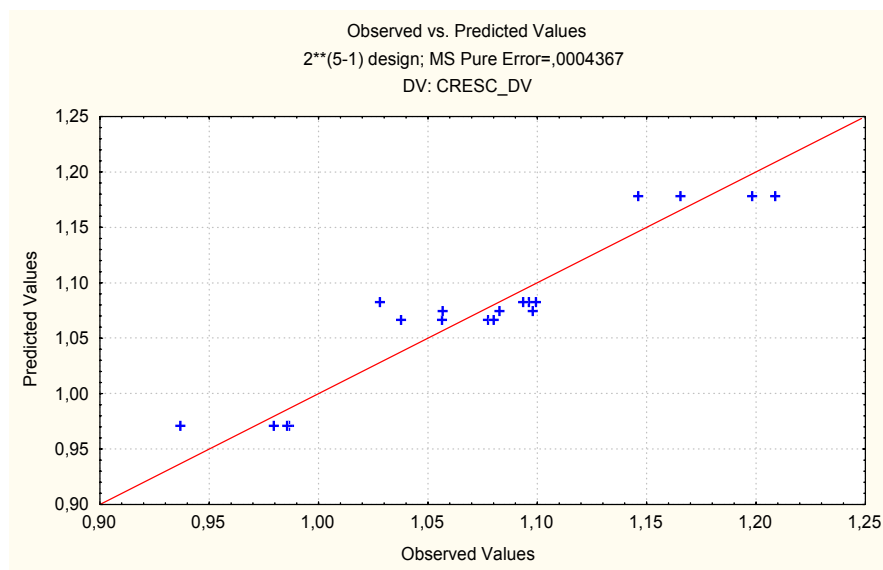


Figura 4.2: Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para crescimento microbiano.

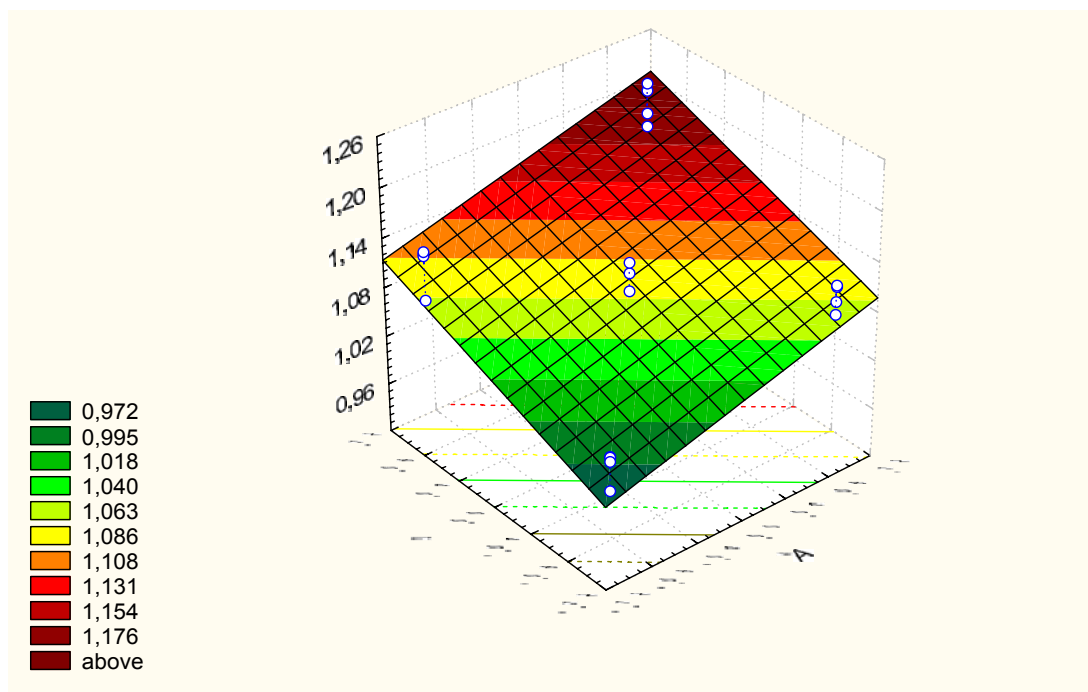


Figura 4.3: Superfície de resposta e curvas de nível do modelo linear proposto para o crescimento bacteriano de *B. licheniformis*

Neste gráfico de superfície (Figura 4.3) podemos observar que em maiores valores há uma influência significativa no crescimento microbiano de *B. licheniformis* quando temos níveis superiores de Caseína (C) e Farelo de Arroz (FA).

De acordo com os resultados encontrados no Planejamento Experimental, foi verificado uma melhor condição com máximo de Caseína (10g/L) e Farelo de Arroz (10g/L) e o mínimo dos outros nutrientes. Com esta resposta foram feitos experimentos variando o pH 6,5, 7,5 e 8,5, a fonte de carbono e foi retiradas amostras em diferentes tempos (inicial, 9, 18 e 26 horas).

A Figura 4.4 apresenta os valores de Absorbâncias finais após o cultivo de *B. licheniformis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com diferentes nutrientes e concentrações, mostrando a diferença de comportamento da bactéria em função das condições utilizadas. Verificou-se que no Experimento 10 correspondente ao meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com os níveis máximos de Farelo de Arroz (10g/L), Caseína (10g/L) e NaCl (6,0 g/L), e os níveis mínimos de Extrato de Levedura (1,0g/L) e Extrato de Carne (0,5 g/L), foi constatado um maior crescimento celular (1,8878). Observamos também que o mínimo de crescimento celular (1,6156) foi obtido no Experimento 3, porém quando o hidrolisado foi suplementado com os níveis máximos de Extrato de Carne (1,0g/L) e os níveis mínimos de Caseína (5,0g/L), Farelo de Arroz (5,0 g/L), extrato de levedura (1,0g/L) e NaCl (3,0 g/L). (Figura 4.4).

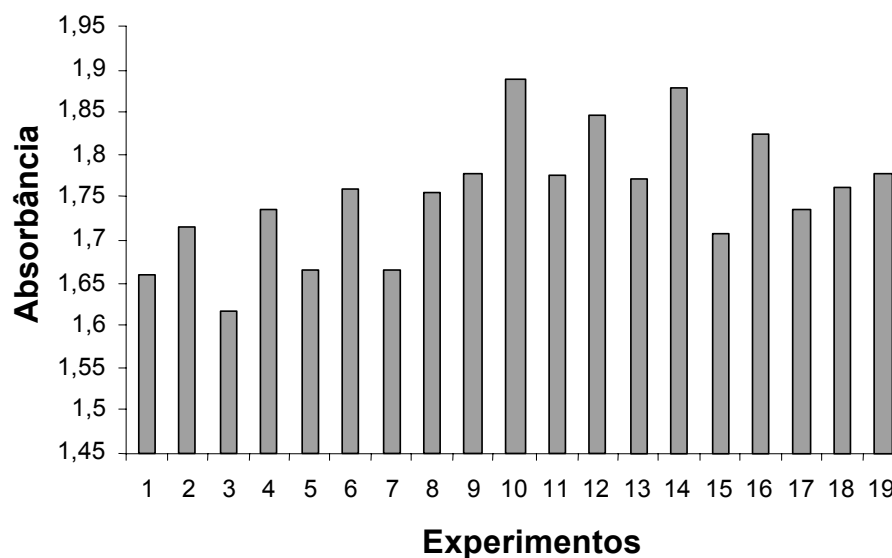


Figura 4.4 - Crescimento celular (Absorbância final) de *B. licheniformis* após 26 horas de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com nutrientes.

Na Figura 4.5 podemos constatar o efeito marcante da suplementação do hidrolisado sobre o consumo de xilose pela bactéria, encontrando-se que a condição em que foi favorecido o crescimento (Experimento 10) não coincidiu com a de maior consumo de xilose (Experimento 5). É importante lembrar que além da xilose o hidrolisado hemicelulósico continha também a glicose como fonte de carbono para a bactéria, porém em baixa concentração (0,392 g/L), sendo que esta já havia sido totalmente consumida no final da fermentação. Podemos observar também que no Experimento 12 houve o menor consumo de xilose em relação aos outros experimentos.

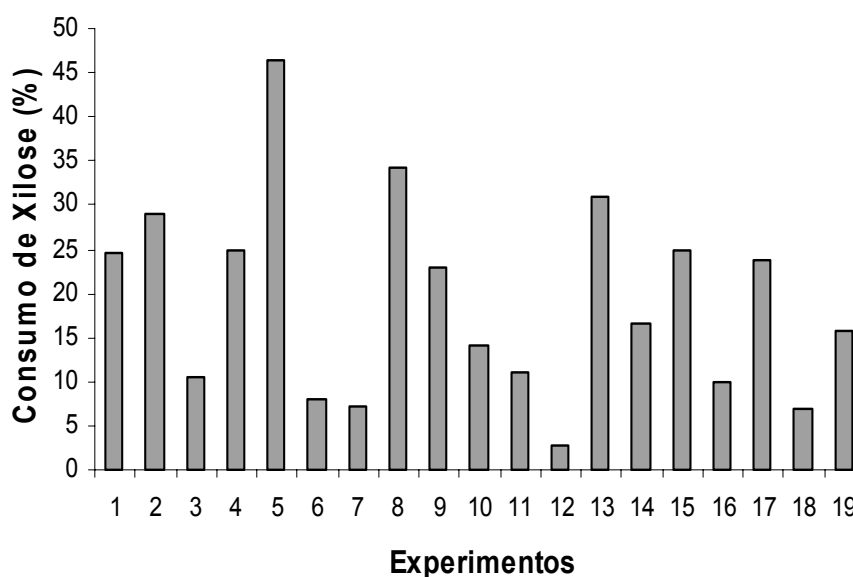


Figura 4.5 - Consumo de xilose por *B. licheniformis* após 26 horas de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com nutrientes .

Durante as fermentações do hidrolisado foi também verificado o aumento de pH (variação entre 7,87 - 8,11) para todas as condições de meios avaliados (Figura 4.6). Verifica-se nesta Figura que o menor valor de pH (7,87) ocorreu no Experimento 12, correspondente ao menor consumo de xilose, conforme já mencionado acima. A partir destes resultados podemos constatar que quanto menor o valor final de pH (mais próximo de 7,5), maior o crescimento celular (Figura 4.4). Segundo Perez et al. (2007), a melhor condição de crescimento para esta bactéria foi a utilização de pH 7,4.

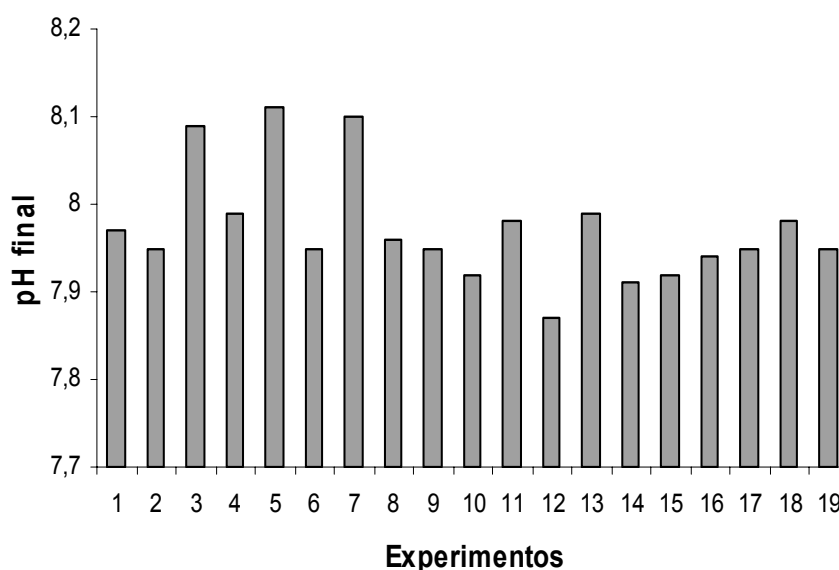


Figura 4.6 - Valores de pH após 26 horas de fermentação por *B. licheniformis* cultivado em o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com nutrientes.

4.3 - Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Protease por *B. licheniformis* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana Sob Diferentes Valores de pH.

Após a definição da suplementação do hidrolisado de forma a favorecer o crescimento bacteriano, experimentos foram realizados avaliando-se diferentes valores de pH. A Figura 4.7 apresenta os valores de Absorbância (diferença entre Absorbância final e Absorbância inicial) após o cultivo de *B. licheniformis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementado com níveis máximos de caseína e farelo de arroz e mínimos de extrato de levedura, extrato de carne e NaCl, conforme estabelecido no planejamento, em função de diferentes valores de pH.

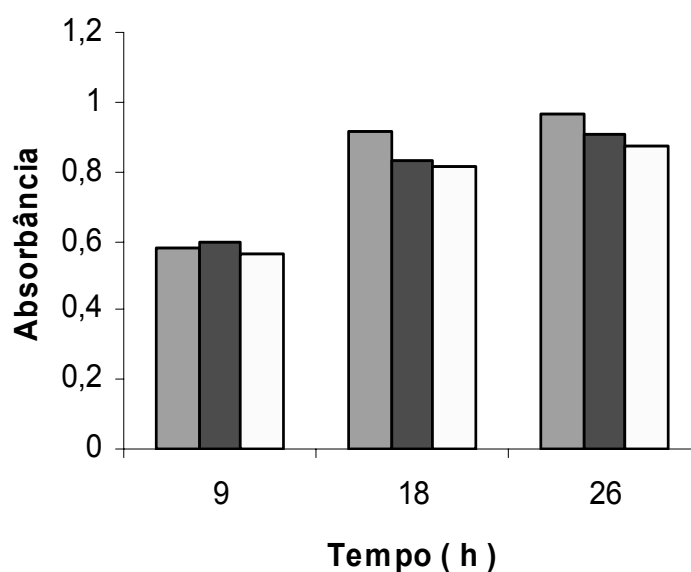


Figura 4.7: Crescimento celular de *B. licheniformis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana sob diferentes valores de pH (6,5  , 7,5  , 8,5 )

Observa-se na Figura 4.7, pequena variação no crescimento de *B. licheniformis* em função dos diferentes valores de pH avaliados. Verifica-se maior diferença após 26 horas, aonde notou-se maior crescimento em pH inicial 6,5. Perez et al., empregou o pH 7,4 para o cultivo desta mesma bactéria em meio semi-sintético.

Semelhante ao observado durante as fermentações para a avaliação da suplementação do hidrolisado, o aumento do pH durante as fermentações também foi verificado em experimentos em que se avaliou o crescimento de *B. licheniformis* em diferentes valores de pH (Figura 4.8). Nota-se nesta Figura que a utilização de pH 6,5 para o cultivo de bactéria resultou em maior aumento do pH (7,61) após 26 horas. Esta condição (pH 6,5) coincidiu com a de maior crescimento (Figura 4.7). Por outro lado em pesquisas com a cepa halotolerante de *B. licheniformis*, isolada

de sedimentos marinhos, foi constatado a necessidade de maior pH para o máximo de crescimento (MANCHINI; FORTINA, 1998). Estes autores encontraram o favorecimento do crescimento desta bactéria com a utilização de pH 9,0. É importante ressaltar as diferenças quanto ao meio de cultivo uma vez que no trabalho com a cepa halotolerante foi utilizado água do mar.

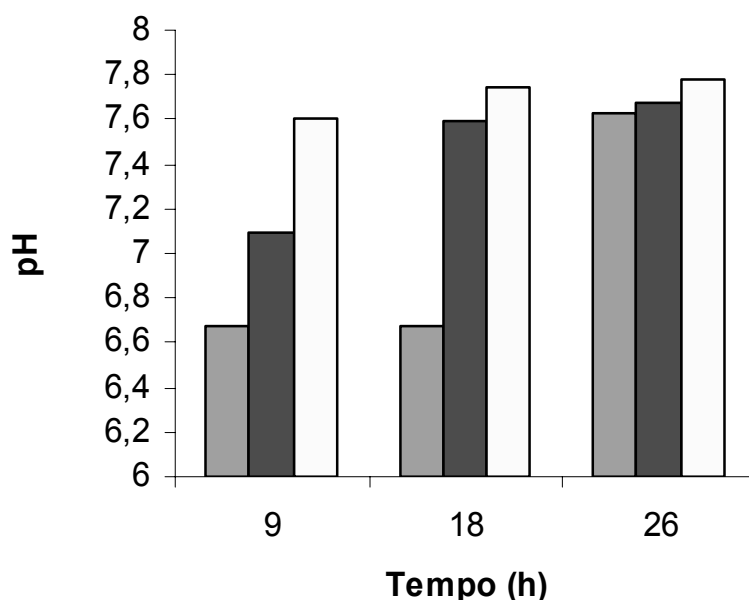


Figura 4.8 - Variação do pH durante fermentação por *B. licheniformis* cultivado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em função de diferentes valores de pH (6,5  , 7,5  , 8,5 ).

Na Figura 4.9 podemos constatar o efeito marcante do pH de fermentação sobre o consumo de xilose pela bactéria. Verifica-se que ocorreu maior consumo de xilose (20,91%) após 18 horas de fermentação, observando-se um decréscimo após este período. A literatura não apresenta dados a respeito de assimilação desta pentose por esta bactéria. Conforme mencionado anteriormente, a glicose, em

função da sua baixa concentração no meio, foi assimilada nas primeiras horas de fermentação.

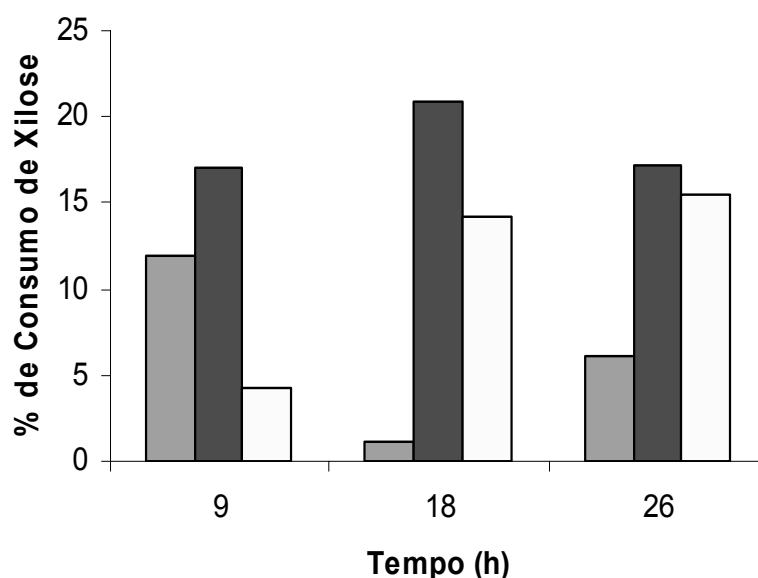


Figura 4.9 - Consumo de xilose por *B. licheniformis* cultivado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em função do pH (6,5  , 7,5  , 8,5 )

Em relação à determinação de atividade de protease esta não foi detectada nas condições avaliadas.

4.4 - Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Protease por *B. licheniformis* em Diferentes Fontes de Carbono.

Após a definição da suplementação do hidrolisado de forma a favorecer o crescimento bacteriano, bem como do pH (pH 7,5), experimentos foram realizados avaliando-se fermentações em meios semi-sintéticos contendo xilose ou glicose como fontes de carbono e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço.

Conforme se observa na Figura 4.10, o maior valor de absorbância (1,482) para crescimento da bactéria, foi encontrado após 9 horas, em meio de fermentação contendo glicose como fonte de carbono. Verifica-se um decréscimo do crescimento após este período. Enquanto ao se empregar a xilose como fonte de carbono, verificou-se uma redução deste crescimento, sendo o maior valor (1,061) após 26 horas de fermentação. Também foram necessárias 26 horas para o máximo deste crescimento (0,9076), quando se empregou o hidrolisado hemicelulósico. O favorecimento do crescimento da bactéria com a utilização de glicose é evidenciado pelo maior consumo em relação as demais fontes, pois enquanto a glicose foi 100% consumida já nas primeiras horas, o consumo de xilose em meio semi-sintético e em hidrolisado hemicelulósico foi de 15,390% e de 17,097% respectivamente. (Figura 4.11)

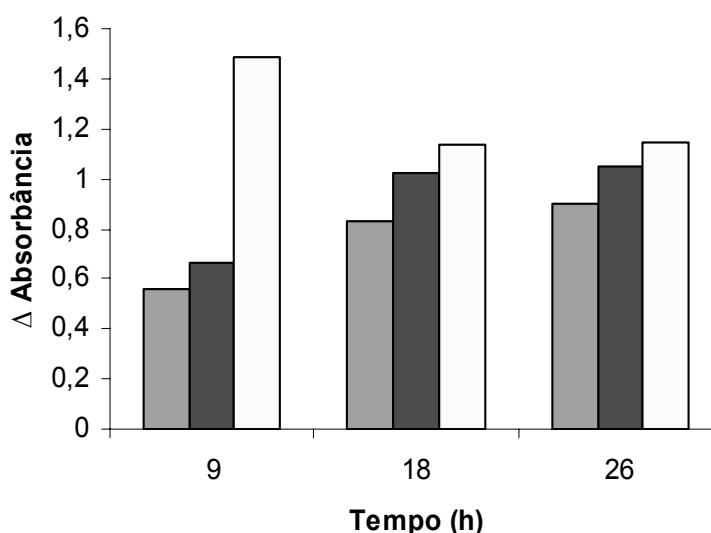


Figura 4.10 - Crescimento celular de *B. licheniformis* utilizando diferentes meios de fermentação (Hidrolisado  Xilose  Glicose ).

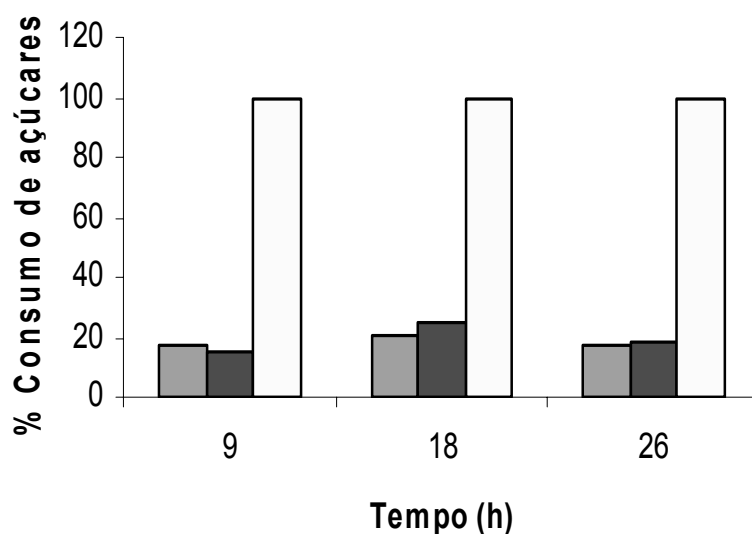


Figura 4.11: Consumo de açúcares (%) por *B. licheniformis*, em diferentes meios de fermentação. (Hidrolisado , Xilose  e Glicose ).

O aumento de pH durante as fermentações, já constatado anteriormente, foi também verificado nos experimentos em que se avaliou as diferentes fontes de carbono (Figura 4.12) . Nota-se nesta Figura que nas fermentações realizadas em hidrolisado e meio semi-sintético contendo xilose, ocorreu pequena variação do pH, enquanto em meio contendo glicose esta variação foi nítida em função do decréscimo deste pH diferente ao observado em todos os experimentos anteriormente.

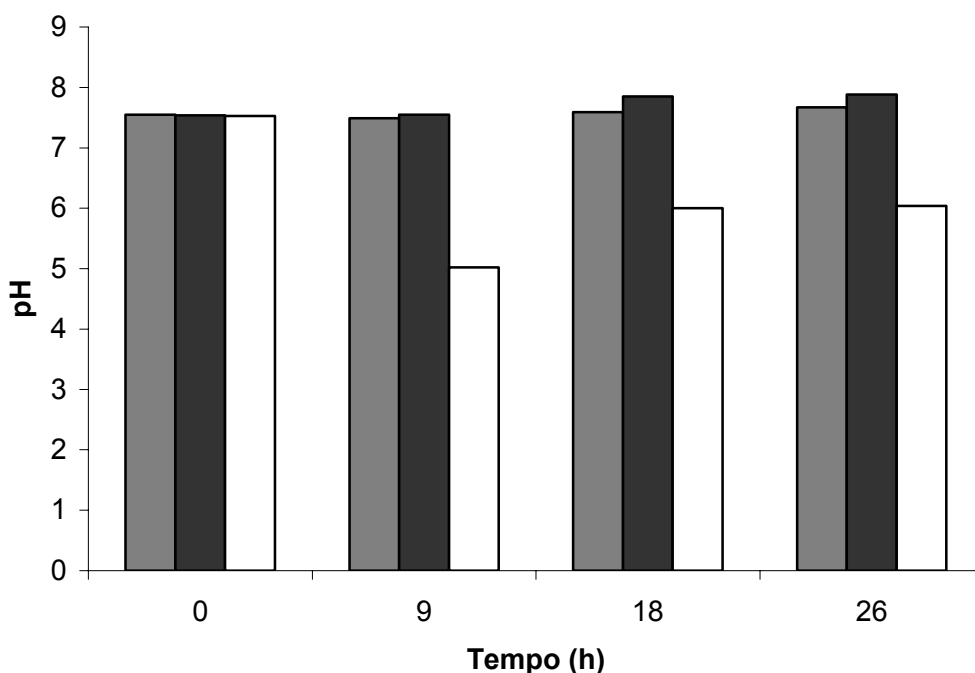


Figura 4.12 - Variação do pH durante fermentação por *B. licheniformis* cultivado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em função do pH (6,5 ■, 7,5 ■ , 8,5 □).

Quanto à atividade de protease não constatada no presente trabalho, ressalta-se que as condições iniciais de experimento, como a temperatura utilizada à 40°C e nutrientes bem como metodologia de análise da enzima foram estabelecidas a partir do no trabalho de Perez, et al. (2007), o qual foi precursor nas pesquisas com esta cepa. Segundo Chaud, Vaz e Felipe (2007), as condições de crescimento e produção de protease por bactérias do gênero *Bacillus*, são dependentes da stirpe a que pertence a bactéria e podem variar de acordo com as condições nutricionais do meio, juntamente com a faixa de pH, temperatura e tempo de incubação. Segundo estes autores, pode-se extrapolar uma faixa de pH (7,0 - 9,0), temperatura (40 - 70°C) e tempo de incubação (14-96 hs), para planejamento de protocolos experimentais envolvendo o gênero *Bacillus*.

5 – CONCLUSÃO

- Este trabalho revelou que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pode ser utilizado para o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 em pH 7,5 à 40° C após a sua suplementação com nutrientes, sendo a caseína e o farelo de arroz os mais importantes nutricionalmente.
- Comparando-se o crescimento de *B. licheniformis* E-44 em meios semi-sintético, contendo xilose ou glicose como fontes de carbono e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana verificou-se que a glicose foi a melhor fonte.
- É importante ressaltar que o trabalho com *B. licheniformis* E-44 é pioneiro na EEL-USP, bem como a utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para o crescimento desta bactéria, uma vez que não há na literatura pesquisas referentes à esta utilização. Considerando ainda que o hidrolisado é um meio complexo, justifica a continuação das pesquisas com vistas à obtenção de condições adequadas não só para crescimento desta bactéria, mas também para a produção de protease a qual não foi detectada nas condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 925-932, 1991.
- AL-SHEHRI; ABDULRAHAMAN, MOSTAFA, M.; YASSER, S. Production and Some Properties of Protease Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Tihamet aseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Science**. v. 7, n. 9, p. 1631 – 163, 2004.
- BATISTA, A.; CALGAROTO, C.; KLUG, T.; ZAMBIAZI Ação antioxidante de extratos de farelo de arroz com diferentes níveis de polaridades I Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel, I Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do MERCOSUL, UNIOESTE (Univ est do oeste do Paraná) anais, p. 59, 2004.
- BELEM, M.A.F; LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.7, p.565-598,1998.
- BIONIS. Disponível em : <http://www.biorigin.com.br/IndustrialPor.asp>. Acessado em: 02/ jan/ 2008.
- Bio- Technical Resources. **Bacillus licheniformis**: The High Expression System. Disponível em: www.biotechresources.com/bacillus_intro.html. Acessado em: 20/04/2006.
- BLIESMER, B. O.; HARTMAN, P.A. Differential heat stabilities of *Bacillus* amylases. **J. Bacteriol.** v. 113, p. 526-528, 1973.
- BROWN, W.C.; YOUNG, F.E. Dynamic interaction between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 38, p. 564-568, 1970.

ÇALIK, P.; ÇALIK, G.; OZDAMAR, T.H. Effect of oxygen transfer strategy on product distribution of serine alkaline protease fermentation. PROCEEDING EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY 8. v. 1, p. 289, 1997.

ÇALIK, P.; ÇALIK, G.; OZDAMAR, T.H. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 23, p. 451-461, 1998.

ÇALICK, P. et al. Influence of pH conditions metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 13, p. 685-697, 2002.

CAMERON, D.R., COOPER, D.G., NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.

CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A., CANETTIERI, E. V, SOLENZAL, A. I. N. Use of Response Methodology to Evaluate the Optimum environmental Conditions for the Bioconversion of xylose into xylitol in Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 945-948, 2003.

CANNETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Application of factorial design to the study of xylitol production from Eucalyptus hemicellulosic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 159-168, 2001.

CARVALHO, JUNIOR R.; MARTON, J. M.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of the *Candida guilliermondii* cell growth in cane bagasse hemicellulosic hydrolysis treated with active charcoal and this combination with ion exchange resins. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES Y LEVADURAS**, 5., Mar, 2005.

CASULA, G.; CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2344-2352, 2002.

CHAU, P.T.T.; URBANEK. Serine neutral proteinase from *Bacillus pumilus* as metalloenzyme. **Acta. Microbiol. Pol. Ser. B.**, v. 6, p. 21-25, 1974.

CHAUD, L. S.; VAZ, P. ; FELIPE, M. D. A. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v. 4, n. 1-2, set. 2007.

CLAYE, S. S., IDOURAINE, A. E WEBER, C. W. Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. **Food Chemistry**, v.57, n.2, p.305-310, 1996.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em :<
<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3lev-cana.pdf>> Acesso em: 02 Jan. 2008.

DAVIES, R.B.; ABRAHAM, E.P. Separation, purification and properties of β -lactamase I and β -lactamase II from *Bacillus cereus* 569/h/9. *Biochem. J.*, v. 143, p. 115-127, 1974.

DIZIEZAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: applications. **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 122 – 125, 1987a.

DIZIEZAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 104 - 112, 1987b.

DOMINGUEZ, JM., CHENG S.G., TSAO, GT. Pretreatmente of sugar cane bagasse hemicellulosic hidrolisate for xilitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p. 49-56, 1996.

DUC, L.H.; HONG, H.A.; CUTTING, S.M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel for heterologous antigen presentation. **Vaccine**. v. 21, p. 4215-4224, 2003.

FEDER, J.L.; KEAY, L.; GARRET, L.R.; CIRULIS, N.; MOSELY, M.H.; WILDI, B.S. *Bacillus cereus* neutral protease. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 251, p. 74-75, 1971.

FELIPE, M. G. A. Xilitol: Uma abordagem enzimática no metabolismo de xilose durante fermentações do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. 6 **Anais** p. 143, 2004.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V; CÂNDIDO, E. J; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SINAFERM – SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 14., **Anais**, CD-ROM, v. 1, p 1-7, 2003.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA,M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1/2, p. 11-14, 1997 a.

FERSHT, A. **Enzyme structure and mechanism**. New York: Freeman, p. 405-426, 1985.

FERRERO, M.A.; CASTRO, G.R.; ABATE, C.M. BAIGORI, M.D.; SINERK, F. Thermo stable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotech*, v. 45, p. 327-332, 1996.

FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n. 2, p.41-47, 2005.

FLEURI, L. F. ; SATO, H. H. . Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, n. 28, p. 871-879, 2005.

FORGATY, W.M.; GRIFFIN, P.J. Physiochemical properties of the native zinc and manganese-prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. **Appl. Microbiol**, v. 26, p. 191-195, 1973.

FORGATY, W.M.; GRIFFIN, P.J.; JOYCE, A.M. Enzymes of *Bacillus* species. **Process Biochem.**, v. 9, p. 11-24, 1974.

FORSBERG., C.W.; ROGERS, H.J. Characterization of *Bacillus licheniformis* 6346 mutants which have altered lytic enzyme activities. **J. Bacteriol.**, v. 118, p. 359-368, 1974.

FREEMAN, D. W. Use of by-product and nontraditional feeds for horses. Disponível em: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>. Acesso em: 20/ jan. /2006.

GIBSON, T.; GORDON, R.E. Endospore-forming rods and cocci. In Buchanan, R.E.. Gibbons, N.E. 9th ed), **Bergey's manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. The Williams & wilkins Co., Baltimore, p. 529-575, 1975.

GODOY, G.; ALVES, F.J.C. A utilização do bagaço da cana para a cogeração de energia, a auto-suficiência e a transmissão da energia produzida pelo complexo agroindustrial canavieiro à população. CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., **Anais de Eventos da UFSCar**, v. 3, p. 477, 2007.

GREEN, D.H.; WAKELEY, P.R.; PAGE, A.; BARNES, S.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E. ANMD CUTTING, S.M.; Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Appl. Environ. Microbial**. v. 65, pg. 7288-4291, 1999.

GUPTA R., BEG O.K., KHAN S., CHAHUAN B. Na overviews on fermentation, downstream processing and propeties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbial biotechnol**, v. 60, . 381-395, 2002.

HALASZ, A.; LÁSZTITY R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press; p. 312, 1991.

HALL, F.M.; KUNKEL, H.O.; PRESCOTT, J.M. Multiple proteolytic enzyme of *Bacillus licheniformis*. **Arch Biochem. Biophys.** v. 114. p. 145-153, 1966.

HAMEED, A.C.; NATT, M.A.; AND EVANS, C.S. Production of alkaline protease a new *Bacillus subtilis* for use as a bating enzyme in leather treatment. **World J. Microbiol Biotech.** v. 12, p 289-291, 1996.

HEINEN, U.J.; HEINEN, W. Characteristics and properties of a caldo-active bacterium producing extracellular enzyme and two related strain. *Arch. Microbiol*, v. 82, p. 1-23, 1972.

HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P.H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, A.S. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66: 5241-5247, 2000.

JONSSON, V.; SNYGG, B.G. Lipase production and activity as a function of incubation time, pH and temperature of four lipolytic microorganisms. **J. Appl. Bacteriol**, v. 37, p. 571-584, 1974

KEAY, L.; MOSER, P.W. Differentiation of alkaline proteases from different *Bacillus* species. **Biochem Biophys. Res. Commun.** v. 30, p. 600-604, 1969.

KEAY, L.; MOSER, P.W.; WILDI, B.S. Proteases of the genus *Bacillus* II. Alkaline proteases. *Biotechnol. Bioeng.* v. 12, p. 213-249, 1970.

KEAVY, L.; WILDI, B.S. proteases of the genus *Bacillus* I. Neutral proteases. **Biotechnol. Bioeng.** v.12, 179-212, 1970.

KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fraction of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v 6, n 3, p. 225-237, 1992.

LACÔRTE, M.C.G., BURGE, R. LAC6ORTE, A.J.F. Bagaço de cana hidrolisado já utilizado em larga escala em confinamento. **STAB, Açúcar, Álcool e Subproduto.** , n. 2, p. 43-52, 1986.

LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J. A.; ROSSEL, C. E. V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: “WORKSHOP” SOBRE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, p. 387, 1996.

LANE A.G.; PIRT, S.J. production of cyclodextrin glycosyltransferase by batch and chemostat cultures of bacillus macerans in chemically defined medium J. **Appl. Chem. Biotechnol.** v. 23, p. 309-321, 1973.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367 – 380, 2002.

LEKULE, F. P.; SARWATT, S. V.; MUNISI, W. G. Effect of Supplementation of Rice Bran on Growth Performance and Carcass Quality of Growing Finishing Pigs. **Tsap Proceedings**, v.28. 2001.

LEVY, P.L.; OANGBORN, H.K.; BERNSTEIN, Y.; ERCSSON, L.H.; NEURATH, H.; WALSH, K.A. Evidence of a homologous relationship between thermolysin and neutral protease A of Bacillus subtilis. Proc. Nat. Acad. Sci, v. 72, p. 4341-4345, 1975.

LI, Y.; YOUSTEN, A.A. Metalloprotease from Bacillus thuringiensis. **Appl. Microbiol.** v. 30. p. 352-361, 1976.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M.; ALMEIDA, J.G.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, 2001

MANCHINI, P.L.; FORTINA, M.G. Production sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Journal of Microbiology**. v.20, p.565-568, 1998.

MARTIN, S.C. Potential for manipulating the gastrointestinal microflora. A review of recent progress. In: BIOTECNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 10., London: Nottingham University Press, p 155-166, 1994.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A., SILVA, J.B.A.; PESSOA JR.; A. Evaluation of activated chacoals and adsorption conditions useal in the treatmente of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. Journal of Chemical Engineering Barsil, v. 23, n. 01, p. 9-21, 2006.

MATSUZAKI, H.; YAMANE, K.; YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y.; MARUO, B. Hybrid α -amylases produced by transformants of *Bacillus subtilis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 356, p. 235-247, 1974.

MEADWAY, R.J. The amino acid sequence of penicillinase from *Bcillus licheniformis*. **Biochem. J.** v. 115, p. 12-13, 1969.

MILLET, J. Characterization of proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marburg strain during sporulation. **J. Appl. Bacterial**. v. 33, p. 207-219, 1970.

MILLET, J.; ACHER, R. Spécifieté de la mégatéropeptidase: ene amino-endopeptidase á caractere hydrophobe. **Eur. J. Biochem**. v. 9, p. 456-462, 1969.

MORIHARA, K. Comparative specificity of microbial proteases. **Adv Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol**. v. 41, p.179 – 243, 1974.

MUSSATO, S; ROBERTI, I.C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência e desenvolvimento*, n. 28, p. 34-39, 2002.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Studies on stability of protease from *Bacillus* sp. And its compatibility with commercial detergent. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 20, p. 565-568, 1998.

NOTÍCIA FAPESP. Produção de etanol utilizando bactéria recombinante. Disponível na internet: [Http:// www.fapesp.br/energia.htm](http://www.fapesp.br/energia.htm), 1998. Acessado em 05 de maio de 2006.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V,T,. Biotechnological potencial of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** ,74, p.69-80, 2000.

PEREZ, M.; PIAD, R.; MILIAN, G.; FELIPE, M.G.; FERREIRA, A.; MANCILHA, I. M.; LAURÊNCIO, M.; SILVA, J. B. A. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformis* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 452-455, 2006.

PURI, D.; BEG, Q.K.; GUPTA, R., Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. By response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 286-290, 2002.

RAY, L.E.; WAGNER, F.W. Characteristics of an aminopeptidase activity from the culture fluid *Bacillus subtilis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 18, p. 853-859, 1972.

RAO, M.B.; TANKSALE, A .P.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE,V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.62, n. 3, p. 597-635, 1998.

ROBERFROID, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. **Nutr. Rev.**, v. 54, p. S38-S42, 1996.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse

hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, p.299-311, 2001.

SAITO, N.A thermophilic extracellular α -amilase from *Bacillus Licheniformis*. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 155, p. 290-298, 1973

SAMANYA, M.; YAMAUCHI K. Histological alterations of intestinal bile in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. **Natto. Comp. Biochem Physiol** , v. 133, p. 95-104, 2002.

SANTOS, J.C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leite fluidizado: Avaliação das condições operacionais**. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena (EEL), p. 7, 2005.

SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D.; FARIA, E. V.; SGARBIERI, V. C. Enriquecimento de biscoitos tipo água e sal com extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 441-446, set/dez 2003b.

SAYEM, S.M.A.; ALAM, M. J. e HOQ, M. M. Effect of temperature, pH and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK 03. **Proc. Pkistan Acad. Sci, Bangladesh**, v. 43, n.4, p. 257-262, 2006

SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Desempenho de frangos de corte alimentados com ração contendo farelo de arroz e enzimas. **Ciências Agrotécnicas**, v. 27, n. 6, p. 1380-1387, nov./dez., 2003.

SGARBIERI, V. C. Riqueza nas sobras da industria. **Pesquisa Fapesp**. p. 80-81, 2002.

SHUMI, W. ; TOWHID-HOSSAIN, M. ANWAR, M.N. Proteolytic activity of a bacterial Isolate *Bacillus fastidiosus* den Dooren de Jong. **J. Biol. Rev.** v. 4, n.3, p. 370-374, 2004.

SILVA, C.R.; DELATORE, A.B.; MARTINS, M.L.L. Effect of the culture cditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. **Barzilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 253-258, 2007.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M., FARIA, F. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. *Bioforum Europe*, Darmstadt, v. 8, n. 3, 2004.

SILVA, T.F.M. Avaliação de polímeros de origem vegetal na destoxificação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de xilitol, 2006 Dissertação (Mestrado). EEL – Lorena.

SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Md.: William & Wilkins Co. v. 2, p. 1104, 1986.

SOARES, V.F.; CASTILHO, L.R.; BOM, E.P.S.; FREIRE, D.M.G. Análise Comparativa da produção de protease por *Bacillus subtilis* por fermentação submersa e no estado sólido. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t285.doc. Acesso em: 12 agosto 2007.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

STAINER, R.Y. et al. *The Microbial World*. Ed. Prentice Hall Fth ed. P. 482-487, 1986.

The Genus *Bacillus*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*., 2005. Disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>. Acesso em: 20/set./2007.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL,S.; FEESCHE,J.; MAURER,K.H.; EHRENREICH, P.; BÄUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v. 7, n. 4, p. 204-211, 2004.

VITKOVIC, L.; SADOFF, H.L. Purification of extracellular protease of *Bacillus licheniformis* and its inhibition by bacitracina. **Journal of Bacteriology**, v. 131, n. 3, p. 891-896, 1977.

WANG, S. L.; YEN, Y. H.; SHIH, I. L.; CHANG, A. C.; CHANG, W. T.; WU, W. C.; CHAI, Y. D. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme and Microbial Technology**, v 33, p. 917-925, 2003.

WELKER, N.E.; CAMPBELL, L.L.. Crystallization of the α -amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biochemistry**, v. 6, p. 3681-3689, 1967.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Centesimal composition and protein nutritive value of yeast from ethanol fermentation and of yeast derivatives. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, out./dez., 2003.

APÊNDICE A

Determinação da Curva Padrão de Tirosina

Para determinação da curva padrão de tirosina foi feito a leitura no espectrofotômetro à 650 nm e obtido a seguinte curva padrão: $Y = 0,0041x + 0,0218$ com $R^2 = 0,9965$

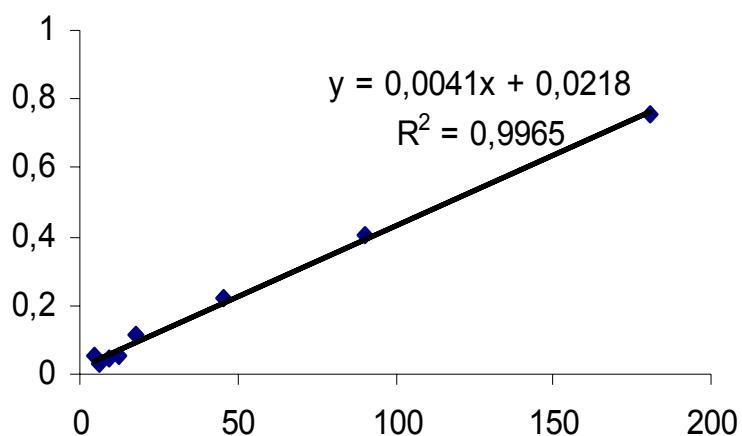


Figura 1: Curva padrão de Tirosina para quantificação de proteases.

APÊNDICE B

Tabela 1 – Crescimento Celular, consumo de xilose, produção de proteases e variação do pH (6,5, 7,5, 8,5) em diferentes tempos, na fermentação de *B. lichemiformis* utilizando o Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como fonte de carbono

Experimento	Tempo	pH	ABS	Δ ABS	Valor de xilose	% de consumo de Xilose	Proteases (U/mL)
pH 6,5	Puro	6,50	----	----	10,849	----	ND
	Inicial	6,85	0,818	0	7,528	----	ND
	T 9 hs	6,67	1,395	0,577	6,626	11,976	ND
	T 18 hs	6,67	1,739	0,913	7,443	1,1259	ND
	T 26 Hs	7,63	1,782	0,964	7,066	6,1385	ND
pH 7,5	Puro	7,50	----	----	7,513	----	ND
	Inicial	7,4	0,871	0	7,006	----	ND
	T 9 hs	7,09	1,466	0,596	5,808	17,097	ND
	T 18 hs	7,59	1,705	0,832	5,541	20,912	ND
	T 26 Hs	7,67	1,780	0,907	5,803	17,166	ND
pH 8,5	Puro	8,50	----	----	6,551	----	ND
	Inicial	7,7	0,915	0	5,927	----	ND
	T 9 hs	7,60	1,473	0,559	5,670	4,326	ND
	T 18 hs	7,75	1,729	0,815	5,083	14,228	ND
	T 26 Hs	7,78	1,783	0,869	5,012	15,435	ND

ND = Não Detectado

Δ ABS = Absorbância à 540 nm (Valores resultantes da diferença entre Absorbância inicial e Absorbância final

APÊNDICE C:

Tabela 2 – Crescimento Celular, consumo de xilose, produção de proteases e variação do pH (6,5, 7,5, 8,5) em diferentes tempos, de Absorbância, fixando o pH inicial em 7,5, na fermentação de *B. lichemiformis* utilizando diferentes fontes de carbono

Experimento	Tempo	pH	ABS	Δ ABS	Valor de xilose	% de Consumo de Xilose	Proteases (U/mL)
Hidrolisado (10g/L)	Puro	7,50	----	----	7,513	----	ND
	inicial	7,4	0,871	0	7,006	----	ND
	T 9 hs	7,49	1,466	0,596	5,808	17,097	ND
	T 18 hs	7,59	1,705	0,832	5,541	20,912	ND
	T 26 Hs	7,67	1,780	0,907	5,804	17,166	ND
Xilose (10 g/L)	Puro	7,50	----	----	10,172	----	ND
	inicial	7,55	0,671	0	7,689	----	ND
	T 9 hs	7,55	1,637	0,965	6,505	15,390	ND
	T 18 hs	7,85	1,702	1,030	5,798	24,589	ND
	T 26 Hs	7,88	1,732	1,061	6,300	18,057	ND
Experimento	Tempo	pH		Δ ABS	Valor de Glicose	% de Consumo de Glicose	Proteases (U/mL)
Glicose (10g/L)	Puro	7,50	----	----	12,129	----	ND
	inicial	7,50	0,692	0	7,411	----	ND
	T 9 hs	5,02	2,175	1,482	ND	100	ND
	T 18 hs	6,00	1,828	1,136	ND	100	ND
	T 26 Hs	6,04	1,840	1,148	ND	100	ND

ND = Não Detectado

Δ ABS = Absorbância à 540 nm (Valores resultantes da diferença entre Absorbância inicial e Absorbância final

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Assessoria de Documentação e Informação
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Palladino, Fernanda

Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar./ Fernanda Palladino; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe—Lorena, 2008.

74f.: fig..

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. *Bacillus licheniformis* 2. Hidrolisado de bagaço de cana 3. Proteases 4. Enzimas I.Título. II. Felipe, Maria das Graças Almeida, Orient.

CDU-574.6