
CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÕES DE PROTEASES

CHAUD, Luciana C. Silveira ¹

VAZ, Priscila Vaz²

FELIPE, Maria das Graças³

Resumo: É crescente o interesse nas pesquisas quanto à produção de enzimas microbianas nos últimos anos, devido às suas propriedades catalíticas superiores às dos catalisadores sintéticos, especificidade pelos substratos, aliado ao baixo custo das reações que as envolvem e principalmente por serem estas, produtos naturais, não contribuindo desta forma para geração de subprodutos tóxicos ao meio ambiente. Com a crescente ênfase na proteção ambiental, atualmente as enzimas substituem vários catalisadores químicos na manufatura de produtos químicos, farmacêuticos, têxteis, papéis, alimentos e químicos agrícolas. As enzimas proteolíticas representam um importante grupo de enzimas utilizadas na indústria, e podem ocorrer em plantas, animais e microrganismos. Proteases de origem microbiana representam um atrativo, uma vez que os microrganismos requerem espaço limitado para cultivo e são susceptíveis à manipulação genética. O presente trabalho apresenta algumas propriedades e aplicações das proteases, bem como resultados de pesquisas relacionadas à utilização de bactérias do gênero *Bacillus* para a produção destas enzimas.

Palavras-chave: Proteases. *Bacillus*.

SUMMARY: The interest in the researches on enzymes production have been increasing in the last years, due to their catalytic properties higher than the synthetic catalysts, substrates specificity, low cost of the involved reactions and mainly for being natural products, not collaborating for the generation of toxic by-products to the environment. Emphasizing the environmental protection, recently the enzymes have substituted several chemical catalysts in the manufacture of chemical, pharmaceutical and textile products, besides papers, food and agrochemicals. The proteolytic enzymes stand by an important group of enzymes used in the industry, and can be present in plants, animals and microorganisms. Proteases from microbial origin represent an attractive, since the microorganisms require a limited space for culture and are susceptible to genetic manipulation. This work presents some properties and applications of proteases, as well as results of researches related to the utilization of *Bacillus* genus bacteria for these enzymes production.

Keywords: Proteases. *Bacillus*.

PROTEASES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

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 (classificadas como amino e carboxypeptidases, respectivamente), enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do grupo terminal do

1 Farmacêutica Bioquímica- Fac. Ciências Farm. Rib. Preto- USP. e-mail: lu_chaud@yahoo.com.br.

2 Mestre em Biotecnologia Industrial – EEL- USP- e-mail: priscilavaz_eb@yahoo.com.br.

3 Doutora em Tecnologia Bioq. Farmacêutica- Fac. de Ciências Farm.- USP- e-mail: mgafelipe@debiq.faequil.br.

Escola de Engenharia de Lorena- EEL-USP, Departamento de Biotecnologia, Caixa Postal 116, CEP 12602-810, Lorena/SP, Brasil.

substrato. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo 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 leucina aminopeptidases), estudos estruturais e cinéticos são facilitados. Embora as diferentes classes destas enzimas sejam catalizadoras 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 obtenção de proteínas intracelulares e pigmentos, na obtenção de extrato de levedura, no tratamento de massa celular de levedura residual para ração animal e no tratamento de doenças provocadas por leveduras e fungos (FLEURI ; SATO, 2005).

Quanto às aplicações industriais das proteases, estas também são amplas, como pode ser visto a seguir:

- Detergentes: o mercado mais promissor para a produção de detergentes está na indústria da lavanderia, atingindo uma produção mundial de 13 bilhões de toneladas por ano. A protease detergente ideal, deve possuir especificidade para facilitar a remoção de uma variedade grande das manchas devido ao alimento, ao sangue, e às outras secreções do corpo. A atividade e a estabilidade em valores altos de pH e temperatura e a compatibilidade com outros agentes quelantes e oxidantes adicionados aos detergentes, estão entre os pré-requisitos principais para o uso de proteases nos detergentes.

Estudos sobre a estabilidade de proteases produzidas por *Bacillus* sp., têm sido conduzidos a fim de avaliar a estabilidade destas enzimas em detergentes para lavanderia, concluindo-se que elas não são estáveis em presença de 5%(v/v) de peróxido de hidrogênio em solução e após a adição de Cloreto de cálcio (10mM) e glicina (1mM). Mais que 85% da atividade da enzima foi retida após 1h a 60°C. A enzima não foi inibida em presença de 1 a 5 mM de EDTA (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

O parâmetro chave para o melhor desempenho de uma protease em um detergente é seu ponto isoelétrico, pois quanto mais próximo este for em relação ao pH da solução detergente, mais apropriada ela será para esta aplicação (RAO et al., 1998). Segundo Gupta et al. (2002), a maioria das proteases alcalinas tem seu ponto isoelétrico próximo ao pH ótimo, em torno de 8-11 e são mais ativas em temperaturas entre 50 e 70°C.

- Processamento de couro: atualmente, as proteases alcalinas microbianas, são usadas em tratamento de couro animal para remover restos de pêlo ou facilitar a embebição com água, conforme patentes (SHIMIZU et al., 2005; BELLOC et al., 1981), que padronizaram tratamento de couro com estas enzimas.

- Produção de alimentos: na indústria de laticínios, principalmente na produção de queijos (OHMIYA et al., 1979) e fabricação de pães, melhorando sua qualidade (ENZYMES FOR BAKING).

-Indústria farmacêutica: A administração oral de proteases tem sido utilizada para corrigir certas síndromes de deficiência de enzimas líticas. Também têm sido usadas em combinação com antibióticos de largo espectro para tratar queimaduras e feridas (RAO et al., 1998).

- Tratamento de efluentes - um exemplo foi citado por Seixas et al. (2006), em trabalho realizado com efluentes de um abatedouro de aves, obtendo bons resultados.

- Outras aplicações: as proteases são utilizadas em pesquisas para elucidar o relacionamento entre a estrutura, função e síntese de peptídeos e sequenciamento de proteínas (RAO et al., 1998), além de sua importante participação como alternativa do uso de antibióticos. Esta possibilidade de substituição de antibióticos por probióticos foi evidenciada nas pesquisas com *Bacillus licheniformis*, bactéria produtora de proteases, cujos resultados destas pesquisas revelaram que o uso desta bactéria como probiótico, adicionada em rações de frangos de corte, resultou em melhor ganho de peso em relação ao controle (FLEMING; FREITAS, 2005).

Além das aplicações citadas, a engenharia de proteínas permite a introdução de mudanças em sua estrutura, que podem ser convenientes para promover alterações de funções ou propriedades desejáveis. Proteases isoladas de organismos extremofílicos, provavelmente mimetizam algumas destas propriedades não naturais das enzimas, que são desejáveis para sua comercialização. Porém, há dificuldades para o crescimento de extremófilos em culturas laboratoriais (RAO et al., 1998).

Se considerarmos a participação de 2/3 das proteases na indústria de detergentes, estas enzimas dominam o mercado mundial de enzimas, como ilustrado na Figura 1 (PATEL; SINGH, 2005).

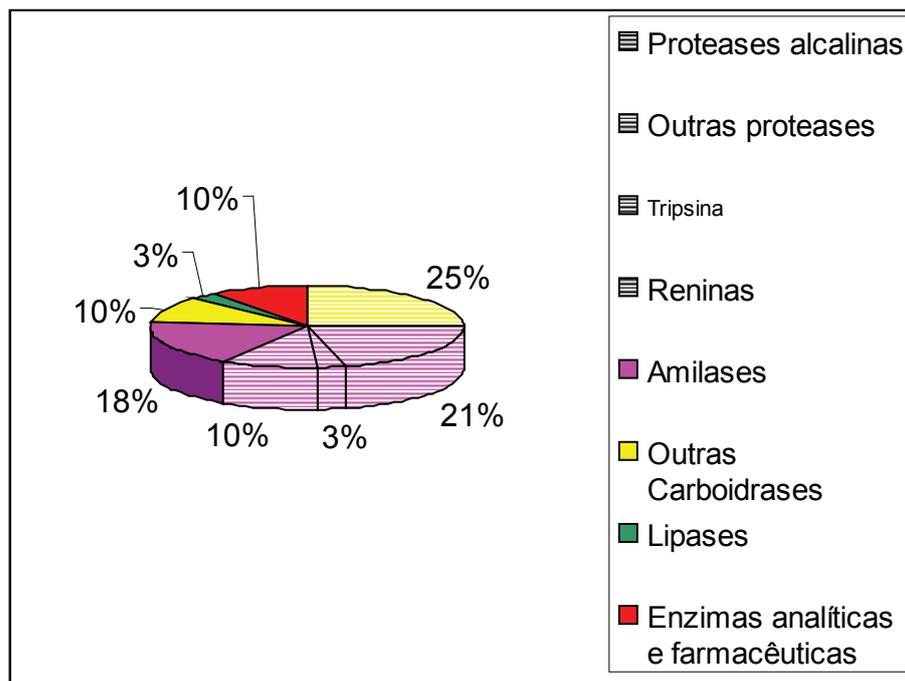


Figura 1: Distribuição do mercado de enzimas (Adaptado de PATEL; SINGH, 2005).

As proteases utilizadas no Brasil eram importadas, porém hoje as patentes de produção desta enzima para algumas aplicações, são comercializadas através de universidades e centros de pesquisa (ERENO, 2005).

PRODUÇÃO MICROBIANA DE PROTEASES

De acordo com a literatura, diferentes microrganismos são capazes de produzir proteases, como bactérias (FERRERO et al., 1996; AL-SHERI; MOSTAFA, 2004; CHOUYYOK et al., 2005; PATEL; SINGH, 2005; PEREZ et al., 2007; FARANAK et al., 2007; SILVA; DELATORRE; MARTINS, 2007) e fungos (GOTTSCHALK, 1985), conforme exemplos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns microrganismos produtores de protease.

| MICROORGANISMOS | REFERÊNCIA |
|---|---------------------------------|
| <i>Aspergillus</i> sp. | GOTTSCHALK, G., 1985 |
| <i>Bacillus clausii</i> | FARANAK et al., 2007 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | AL-SHERI; MOSTAFA, 2004 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> E-44 | PEREZ et al., 2007 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> MIR 29 | FERRERO et al., 1996 |
| <i>Bacillus</i> sp. termofilico-cepa SMIA-2 | SILVA; DELATORRE; MARTINS, 2007 |
| <i>Bacillus</i> sp. | PATEL; SINGH, 2005 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | CHOUYYOK et al., 2005 |

Dentre as bactérias que excretam proteases, podemos citar os seguintes gêneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus (vulgaris)*, *Clostridium* sp. e muitas outras anaeróbias. Estas proteases podem ser, em função de seu pH ótimo, proteases neutras, ácidas ou alcalinas. Uma protease bem caracterizada e largamente utilizada é a protease alcalina, produzida pelo gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*). Esta protease é ativa em pH entre 8 e 11. As proteases neutras, excretadas por *B. megaterium* e *P. aeruginosa*, são instáveis e inativadas logo após a formação, por condições ácidas ou alcalinas. Proteases ácidas, com pH ótimo entre 4 e 6, são produzidas por *Aspergillus* sp. (GOTTSCHALK, 1985).

Bacillus licheniformis tem sido utilizado nas fermentações industriais por várias décadas para produção não somente de proteases, mas amilases, antibióticos ou produtos químicos variados como ácido acético e substituto de L – triptofano (GHERNA et al., 1989).

Com relação à produção de enzimas líticas da parede celular de leveduras, é grande o número de pesquisas quanto à utilização de *Bacillus* sp para produção de glucanases, mananases, proteases e quitinases, cuja ação pode variar, dependendo dos estágios de crescimento celular e conforme o gênero e espécie da levedura (FLEURI; SATO, 2005; PÉREZ et al., 2007).

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO GÊNERO *BACILLUS*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbicas e gram positivas que formam endósporos, resistentes a condições ambientais adversas tais como calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbicos. Muitos bacilli são organoheterotróficos e utilizam uma considerável escala de compostos orgânicos simples (açúcares, amino ácidos, ácidos orgânicos), como substratos respiratórios. A maioria são mesófilos, com temperatura ótima entre 30 e 45°C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem à temperaturas de 65°C ou mais altas (STAINER et al., 1986). Além das proteases, produzem enzimas hidrolíticas, como as mananases e glucanases, dependendo do meio de cultura utilizado. Algumas espécies são mais susceptíveis para a produção de enzimas e endósporos como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. clausii*. Estes *Bacillus* têm sido usados como probióticos em animais e humanos (PÉREZ et al., 2007).

B. licheniformis (uma bactéria de interesse no gênero, pelo caráter não patogênico - Figura 2) está amplamente distribuído 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). É classificado como GRAS (Generally Reconized As Safe) pelo U.S. Food and Drug Administration na produção de alfa-amilase (BTR Bio-Technical Resources).

Pesquisas realizadas com a estirpe de *B. licheniformis* SB3086 evidenciaram a não ocorrência de danos para humanos e ratos, embora quando esta estirpe foi utilizada, observou-se

problemas relacionados a reprodução em animais domésticos (U.S. Environmental Protection Agency, 2003).

De acordo com Gupta et al. (2002), para o desenvolvimento de um eficiente processo de obtenção de enzimas pela indústria, é de fundamental importância conhecer os vários parâmetros de fermentação, técnicas de purificação e propriedades das mesmas. A relação C/N 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.

Além da importância da relação C/N no meio de cultivo para a produção microbiana 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 a produção e atividade enzimática, temperatura e tempo de incubação.

Com relação à 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. De acordo com estes autores a protease alcalina não é uma enzima constitutiva, visto que diferentes fontes de carbono e nitrogênio podem alterar sua produção. No caso de *B. licheniformis*, Al-Sheri e Mostafa (2004), encontraram o aumento na produção desta enzima quando utilizaram farinha de soja. Pesquisas nas quais se utilizaram *B. subtilis* (CHU; LEE; LI, 1992) e *B. horikoshii* (JOO et al., 2002), também revelaram comportamento semelhante quanto ao favorecimento da produção de proteases.

Patel e Singh (2005), observaram que a produção de protease por *Bacillus* sp depende da disponibilidade de carbono e nitrogênio iniciais no meio de cultura, evidenciando máximo efeito no crescimento celular com a combinação de peptona e extrato de levedura, enquanto a atividade ótima da enzima foi obtida na presença de casa aminoácidos, peptona e extrato de levedura. Segundo estes autores, isto favoreceu a produção enzimática, sendo esta ótima quando a concentração de casa aminoácidos variou de 1,5-2% . Ainda neste estudo, foi constatado que altas concentrações de glicose também podem inibir o crescimento microbiano e também a produção de protease.

Silva, Delatorre e Martins (2007), analisando a influência das condições de cultura em *Bacillus* sp. termofílicos, sobre a produção de protease extracelular, observaram que quando o meio de cultivo foi constituído de amido e maltose, suplementado com soro de leite, resultou em maior secreção da protease, encontrando ainda que o aumento da concentração de maltose no meio de cultura até 1%, resultou em melhoria do crescimento bacteriano e atividade enzimática. Segundo estes autores, a lactose e sacarose, não foram efetivas na produção destas enzimas.

Com relação à fonte de nitrogênio, estudos realizados por Al-Sheri e Mostafa (2004), revelaram que a produção de proteases em meios contendo nitrogênio orgânico, foi mais eficiente que em meios contendo nitrogênio inorgânico.

Segundo Patel e Singh (2005), a presença de nitrogênio orgânico, caseína e casamino ácidos, podem induzir a produção de proteases extracelulares, porém encontraram fenômenos de repressão do crescimento e produção enzimática quando a fonte de nitrogênio utilizada foi inorgânica (Cloreto de amônio, bem como sulfato de amônio e nitrato de amônio).

Ainda com relação à composição do meio de cultura, Manachini 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. Patel e Singh (2005), observaram uma produção máxima de protease em *Bacillus* sp. em concentração de 10% de sal (NaCl), sendo suprimida significativamente a produção da enzima em 5% (m/v), enquanto esta não foi produzida na ausência de sal.

Além da composição do meio de cultura, a temperatura é um dos mais importantes fatores que afetam a produção enzimática, como constatado por Ferrero et al. (1996). Durante pesquisas com *B. licheniformis* MIR 29, estes autores conseguiram melhores resultados em termos de atividade enzimática a 60°C, enquanto Manachini e Fortina (1998), estudando *B. licheniformis* halotolerante, isolado de sedimentos marinhos, observaram atividade ótima a 70°C.

Al-Sheri e Mostafa (2004), em estudo com *B. licheniformis* verificou a existência de uma relação positiva entre produção de protease e incubação a temperaturas superiores a 50°C, observando que a temperatura ótima de atividade da protease foi 55°C, podendo ser relativamente estável a 60-65°C.

Patel e Singh (2005), estudando a produção de protease em *Bacillus* sp encontraram ser a temperatura de 37°C favorável para crescimento microbiano, produção de esporos e atividade da protease, enquanto para Pérez et al. (2007), em estudo com *B. licheniformis* E-44 a temperatura foi 40°C.

Ainda com relação à temperatura, Silva, Delatorre e Martins (2007), estudando *Bacillus* sp., observaram que a temperatura ótima de atividade da protease produzida foi 70°C, porém a maior estabilidade da enzima foi a 60°C (a protease manteve 80% de sua atividade original após 2 h a 60°C, sendo que a 70°C a atividade original foi mantida somente por 15 minutos), enquanto a secreção de protease foi máxima a 50°C e foi menor com altas (55°C) e baixas (42°C) temperaturas.

Assim como a 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* MIR 29, observaram maior crescimento em pH acima de 9,0, o que também foi observado por Manachini e Fortina (1998), em *B. licheniformis* halotolerante, 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 estudo conduzido por Çalik et al.

(2002) . Foi investigada uma faixa de pH entre 7,0 e 7,5, observando-se na primeira fase de crescimento (0-20h), uma dependência 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 mesma 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 .

Al-Sheri e Mostafa (2004), analisando algumas 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.

Em estudo com *Bacillus* sp, Silva, Delatorre e Martins (2007), detectaram altos níveis de atividade de protease em culturas crescidas em pH 7,5-8,5, sendo que o pH ótimo foi 8,5. Neste estudo, o crescimento foi maior em pH 9,5, porém a atividade da protease foi quase a metade da observada em pH 7,5-8,5.

O tempo de incubação também exerce forte efeito sobre o rendimento da protease, o que foi evidenciado experimentalmente através de pesquisas com *Bacillus* sp., nas quais se utilizaram a metodologia de superfície de resposta. Nestas pesquisas, a máxima atividade da enzima ocorreu após 96h (PURI; BEG; GUPTA, 2002). Entretanto, Perez et al. (2007), obtiveram máxima atividade da protease com *B. licheniformis* após 20 horas de cultivo e Silva, Delatorre e Martins (2007), estudando o mesmo gênero, 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).

Novas proteases podem ser obtidas a partir de mutações, resultando em aumento da eficiência catalítica e melhora na estabilidade com relação à temperatura e agentes oxidantes (GUPTA; BEQ; LORENZ, 2002), oferecendo novas possibilidades e potenciais para aplicação biotecnológica. No caso de *B. licheniformis*, pesquisas foram feitas quanto ao sequenciamento do genoma desta bactéria (VEITH et al., 2004).

CONCLUSÃO

As múltiplas aplicações das proteases e interesses econômicos envolvidos em sua produção e purificação, justificam o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem minimizar os custos de produção e maximizar a eficiência destas enzimas.

As condições de crescimento de *Bacillus* sp e produção de protease pelos mesmos, são dependentes da estirpe 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. Porém, generalizando, podemos extrapolar uma faixa de pH (7,0 a 9,0), temperatura (40-70°C) e tempo de incubação, para planejamento de protocolos experimentais envolvendo o gênero *Bacillus* (14-96hs).

Por outro lado, a utilização de *Bacillus* sp como probióticos, melhorando as características de animais de corte (como frangos) e conferindo características mais saudáveis aos alimentos, são um atrativo para o desenvolvimento de pesquisas na área.

REFERÊNCIAS

AL-SHERI, M. A.; MOSTAFA, S.Y. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Paquistan Journal of Biological Sciences**, v.7, p.1631-1635, 2004.

BELLOC, A. et al. **Microrganism and proteolytic enzyme derived therefrom**. U.S. Patent 4288556, 1981.

BTR- Biotechnical Resources- ***Bacillus licheniformis*: the highyield expression system**. Disponível em: www.biotechresources.com/bacillus. Acesso em: 10/09/2007.

ÇALIK, P. et al. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.685-697, 2002.

CHOUYYOK, W. et al. Extraction of alkaline protease using an aqueous two phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p.3514-3518, 2005.

CHU, I.M.; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme Microbiology Technology**, v.14, p.755-761, 1992. ENZYMES FOR BAKING. Disponível em: www.maps-enzymes.co> Acesso em: 08 set. 2007

ERENO, D. **Fungos e bactérias são a base de detergentes usados em equipamentos hospitalares**. Revista Pesquisa FAPESP- Ciência e Tecnologia no Brasil. maio 2005. Disponível em <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=38&bd=1&pg=1&lg=>>>. Acesso em 08 set. 2007.

FERSHT, A. **Enzyme structure and mechanism**. Ed. Freeman, sd edition, 1995, p.405- 426.

FLEMING, J. S.; FREITAS, R.J.S. Evaluation of the effect of prebiotics (MOS), probiotics (*Bacillus licheniformis* and *Bacillus Subtilis*) and growth promoter in broiler diets. **Archieves of Veterinary Science**, v.10, p.41-47, 2005.

FLEURI, L. F. et al. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, n.28, 2005.

GHERNA et al. *Bacillus licheniformis* Final Risk Assessment. Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA). Environmental Protection Agency – U.S. www.epa.gov, 1989.

GOTTSCHALK, G. Catabolic activities of aerobic heterotrophs. **Bacterial metabolism**. Ed. Springer, sd edition, p.144, 1985.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.381-395, 2002.

GUPTA, R.; BEQ, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.15-32, 2002.

JOO, H. et al. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v.38, p.155-159, 2002.

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

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.37, p.1-9, 2006.

OHMIYA, K. et al. Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. **Journal of Food Science**, v.44, p.1584-1588, 1979.

PATEL, R. M.; SINGH, S. P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and Optimization. **Process Biochemistry**, v.40, p.3569-3575, 2005.

PEREZ, M. et al. 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, 2007.

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

RAO, M.B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p.597-635, 1998.

SEIXAS, A.C.M. et al. Produção e utilização de *Bacillus subtilis* em tratamento de efluentes líquidos. **Base Alimentarium**. Prod. Cient. Faculd. de Eng. de Alim.- UNICAMP, 2006.

SHIMIZU, Y. et al. Enzymatic unhairing agent for use in tanning for producing leather and method for enzymatic unhairing treatment. U.S. Patent 6867032, 2005.

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

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

U.S.Environmental Protection Agency- ***Bacillus licheniformis* strain SB 3086 (006492) fact sheet**. Disponível em: www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheet_006492.htm . Acesso em: 10 set. 2007.

VEITH, B. et al. The complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.204-211, 2004.