



Produção De Protease Utilizando Planejamento Fatorial Em Meios Contendo Resíduos Industriais Protease Production Using Factory Planning In Means Containing Industrial Residues

Tiago Lira Melo
Vanessa Assis Melo
Carlos Alberto Alves

Resumo: Enzimas são produtos biotecnológicos mais utilizados atualmente em diversos setores industriais, porém ainda apresentam elevados custos de produção e purificação. Formulação de meios alternativos utilizando componentes de baixo custo e a descoberta de novos micro-organismos produtores de enzimas. Estudos para reduzirem os processos de produção têm sido realizados nas últimas décadas. Os rejeitos das indústrias, principalmente os da indústria de alimentos, muitas vezes são descartados sem qualquer tratamento prévio no meio ambiente e apresentam um elevado poder nutricional que poderia ser aproveitado na formulação de meios para produção de enzimas. As proteases são enzimas de varias aplicações industriais que possuem especificidade e elevada atividade catalítica. Para atender a demanda de mercado, é necessário que as enzimas estejam disponíveis em quantidade economicamente viável. Grande parte das proteases de origem microbiana é produzida por bactérias do gênero *Bacillus*. A utilização de planejamento fatorial em processos fermentativos surgiu como uma alternativa viável, pois reduz a quantidade de experimentos realizados, auxiliando na obtenção de condições mais favoráveis a produção de metabólitos de alto valor agregado. Para a seleção da melhor condição, foram elaborados meios alternativos contendo Glicose e resíduos industriais: Soro de Leite e Resíduo de Sorvete. Os ensaios ocorreram durante 72 horas, 37°C, 150 rpm, em triplicata. Os resultados obtidos indicaram que o meio contendo resíduo de sorvete obteve a maior atividade proteolítica, cujo valor foi de 39,3 U/L. Foram realizados estudos para produção de Protease utilizando um planejamento fatorial 2³ para selecionar a melhor condição de produção da enzima. Dos ensaios realizados, o ensaio 8 apresentou a maior atividade proteolítica obtida que foi de 60,45 U/L. A utilização de resíduos da indústria alimentícia tem surgido como uma alternativa viável para elaboração de meios de produção de metabólitos de elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Produção enzimática, *Bacillus*, Meios alternativos

Abstract: Enzymes are biotech products most widely used in many industrial sectors, but also have high production and purification costs. Formulation alternative means using low cost components and the discovery of new enzyme-producing microorganisms, studies to reduce the production processes have been conducted in recent decades through. Tailings from industries, especially the food industry, are often discarded without any treatment in the environment and have a high nutritional power that could be

used in the media formulation for the production of enzymes. Proteases are enzymes of various industrial applications that have specificity and high catalytic activity. To meet market demand, it is necessary that the enzymes are available in economically viable quantities. Much of the microbial protease is produced by bacteria of the genus *Bacillus*. The use of factorial design in fermentation processes has emerged as a viable alternative because it reduces the amount of experiments, assisting in obtaining more favorable conditions for production of high added value metabolites. To select the best condition, were developed alternative media containing glucose and industrial waste: Whey and ice cream residue. The trials took place for 72 hours at 37 °C, 150 rpm in triplicate. The results indicated that the medium containing ice cream residue obtained the highest proteolytic activity, whose value was 39.3 U / L. Studies were conducted to produce protease using a 2³ factorial design to select the best enzyme production condition. Of testing, the test 8 showed the highest proteolytic activity obtained which was 60.45 U / L. The use of the food industry waste has emerged as a viable alternative to development of means of production of high biotechnological potential metabolites.

Keywords: Enzymatic production, *Bacillus*, Alternative medium

1. INTRODUÇÃO

A utilização de tecnologias enzimáticas é uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as diversas enzimas utilizadas industrialmente, as lipases se destacam por apresentarem uma alta capacidade em catalisarem reações em meios orgânicos e aquosos, ou seja, em meios que apresentam condições restritas de água (SBARDELOTTO et al., 2013; LIMA et al.; 2014).

Proteases refere-se a um grupo de enzimas cuja função catalítica é a hidrólise de proteínas. Elas podem ser obtidas através de plantas, animais e micro-organismos. No entanto, apenas as produzidas por microrganismos atendem às demandas industriais (ATOMI 2005; GHORBEL *et al.*, 2002). Entre as várias proteases, proteases bacterianas são as mais significativas, em comparação com animais e proteases fúngicas entre as bactérias, *Bacillus* sp são produtores específicos de proteases extra-celular. Estas enzimas têm ampla aplicação industrial, incluindo a indústria farmacêutica, indústria de couro, fabricação de hidrolizates proteínas, indústria de alimentos e indústria de transformação de resíduos. (NASCIMENTO & MARTINS 2003).

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos. O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção. Dentre estes resíduos incluem-se o soro de queijo (NASCIMENTO et al.; 2007).

O gênero *Bacillus* é conhecido por produzir uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como as proteases. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (WANG et al., 2007^{[M1][BC2]}).

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do aproveitamento em diversas atividades tem sido muito incentivadas, já que podem contribuir positivamente para a minimização da poluição ambiental, bem como diminuir os custos de produção e permitir a valorização econômica desses resíduos (FERNANDES et al. 2008; MENEZES et al. 2012; LOPES et al., 2013; LIMA et al.; 2014). O Brasil tem potencial na produção de enzimas por possuir grande quantidade e variedade de matérias-primas renováveis. O desenvolvimento de tecnologia por reaproveitamento de resíduos

na produção de enzimas favorece o desenvolvimento sustentável, fundamental na preservação do meio ambiente. (GOMES et al.; 2010).

Vários resíduos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção destas enzimas em larga escala. Dentre os resíduos gerados na indústria de alimentos, destaca-se o soro de queijo, líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou caseína (Brasil, 2005).

O soro de leite, por exemplo, é um resíduo altamente rico em proteínas, respondendo por 20% das proteínas encontradas no leite. A sua utilização como substrato biotecnológico para produção de enzimas, poderia contribuir em muito para a redução do custo operacional da produção, bem como para a preservação do meio ambiente. (NASCIMENTO e MARTINS, 2006).

O sorvete é uma excelente fonte de energia, devido principalmente ao seu alto conteúdo de carboidratos e gordura. As proteínas do leite representam de 34 a 36% de seus sólidos não gordurosos, e o sorvete contém elevada concentração de minerais e vitaminas, cujo conteúdo dependerá primariamente da quantidade de sólidos do leite utilizados na formulação (SOUZA et al.; 2010). Após a produção do sorvete, foi evidenciado^[M3] em seu descarte sólidos lácteos não gordurosos representados principalmente por proteína, sais minerais e lactose, alginatos, carboximetilcelulose (TAVARES et al.; 2011).

A utilização de recursos matemáticos, como os planejamentos fatoriais no processo fermentativos, tem facilitado e diminuído a quantidade de experimentos realizados, pois os resultados obtidos podem selecionar as melhores condições de produção, através da influência das variáveis estudadas (PARK et al., 2002; BURKERT et al., 2004; ZHU et al., 2013; AYENI et al., 2013; MELO et al., 2014).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

A amostra de *Bacillus licheniformis* UCP- 1020, isolado do porto da cidade de Pernambuco com a identificação e catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB). Para a manutenção, foi utilizado o meio Ágar Nutriente (AN) com a seguinte composição (por litro): Extrato de carne (5,0 g), Peptona (10,0 g), NaCl (5,0 g), Agar (15,0g), a pH 7,0.

2.2 MEIO DE CONTROLE DE PRODUÇÃO

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250 mL (% p:v). Alíquotas de 25 mL de pré-inóculo foram adicionadas em meio de cultura contendo (g/L): Extrato de Carne 5g; Peptona 15g; NaCl 5g; Hidrogeno Fosfato de potássio 5g; Cloreto de Cálcio 0,2g; Água destilada 1000 mL.

2.3 MEIOS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO

Os meios alternativos foram elaborados utilizando resíduos de soro de leite, resíduo de sorvete Como fontes variáveis de nitrogênio e carbono (Figura 1 A-B). O soro de leite na mesma proporção da peptona no meio denominado controle. As concentrações dos resíduos utilizadas nos ensaios foram de 15g de soro de leite e 5g de resíduo de sorvete. Também foi adicionado ao meio 10g de glicose. Os ensaios foram realizados em

cultivos submersos a 150 rpm, durante 72 horas a 37°C.

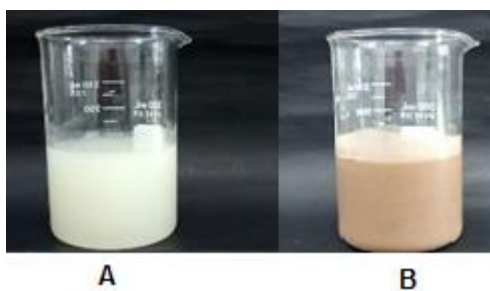


Figura 1: A (Soro de leite) e B (Resíduo de sorvete)

2.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASE

Os ensaios de produção ocorreram de acordo com o planejamento fatorial de 2^3 no meio controle para obtenção da melhor condição de produção da Protease. Após a seleção da melhor condição, foram elaborados ensaios com os meios alternativos mantendo as condições testadas no meio controle. Os ensaios ocorreram a 37°C, 60 horas, 150 rpms em triplicata. As amostras foram submetidas às determinações da atividade proteolítica, pH, crescimento microbiano e proteínas totais.

2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 para analisar os principais efeitos e interações das variáveis concentrações: Soro de Leite, Resíduo de sorvete e Glicose. Com 4 pontos centrais e níveis +1 e -1, (Tabela 1) com apoio de um Software Statistica 7.0 da Stat Soft.

Tabela 1. Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial 2^3

Variáveis (g/L)	-1	0	+1
Glicose	10	12	14
Soro de Leite	13	15	17
Resíduo de sorvete	3	5	7

2.6 DETERMINAÇÃO DO pH

Foi realizada por potenciometria em todas as amostras coletadas.

2.7 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O crescimento ocorreu em agitador orbital, em 150 rpm, a 37°C, por 60 h em triplicata, com amostras coletadas a cada 4 horas.

2.8 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais foram determinadas pela metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando solução de albumina bovina.

Para a preparação do reagente, foram dissolvidos 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de etanol 95% e, em seguida, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução foi completada para 1L com água destilada.

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Foi realizada através da metodologia descrita pelo método de LEIGTON (LEIGTON et al., 1973). A reação composta de 250 µL da solução azocaseína, 150 µL da amostra centrifugada produzida nos meios controle e alternativos.

A temperatura foi mantida em 40°C em banho-maria por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético. Em seguida, a solução com as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000 rpm a 4°C. As enzimas proteolíticas livres presente na mistura, foram identificadas na solução de 500 µL da solução resultante, adicionada de hidróxido de sódio (1:1). A leitura foi realizada ao término da reação, em espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática dos meios controle e alternativos foi calculada através da seguinte equação:

$$AE (U/L) = \frac{ABS_{am} \cdot V_{am} \cdot fd}{t}$$

AE= atividade proteásica (U/L);

ABS_{am} = Absorbância da amostra

V_{am}= volume da amostra (mL);

fd = Fator de diluição;

t= tempo de reação em minutos

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de atividades proteolíticas determinados em cultivo submerso de *B. licheniformis* UCP – 1020 em caldo nutritivo na presença de diferentes resíduos industriais, estão ilustrados na figura 1 e 2.

Os resultados mostram que a cultura de *B. licheniformis* UCP – 1020 produziu atividade proteolítica em todas as condições investigadas. A maior atividade proteolítica foi de 39,3 U/L em 48 h de cultivo submerso, utilizando o resíduo de sorvete como fonte de carbono e nitrogênio.

Espécies dos gêneros *Bacillus*, apresentam um elevado potencial biotecnológico para a produção de protease. (HADDAR et al., 2010). Nas últimas décadas, tem aumentado o interesse nesses micro-organismos, devido à grande utilização de diversas enzimas microbianas em diferentes segmentos industriais (RIBEIRO et al., 2013).

B. licheniformis UCP-1020 cresceu e produziu proteases em todos os meios contendo os resíduos industriais investigados, como observado na Tabela 2. SHIKHA e colaboradores relataram a produção de proteases utilizando várias fontes de carbono. O soro de leite, subproduto da indústria láctea, contém cerca de 55 % dos nutrientes do leite, incluindo a caseína, indutor de proteases além de lipídios, açúcares e outras proteínas. Segundo esses autores, os melhores resultados foram determinados na presença de melão de cana-de-açúcar.

Segundo Nascimento e Martins (2000) os *Bacillus* crescem e secretam proteases quando cultivados num meio de cultura contendo soro de leite, um resíduo das indústrias de laticínios. De fato, meios de cultura ricos em proteínas, como aqueles contendo o soro de leite e resíduo de sorvete possuem indutores que levam à produção de proteases.

A influência da utilização dos substratos industriais na produção de Protease está descrita na tabela 2 e na figura 2. Verifica-se que em todos os resíduos testados houve a produção de protease, porém resíduo de sorvete apresentou maior atividade Proteolítica (39,3 U/L), valor superior ao obtido no meio denominado controle.

Porém o meio contendo Glicose apresentou maior crescimento microbiano obtido por leitura a D.O (600nm) em espectrofotômetro[M4] de 1,884. O pH inicial em todos os meios foi de 7,0, observando-se que nos meios com Soro de leite e o Resíduo de Sorvete o pH se mostrou levemente alcalino. Retratado na figura 3. De acordo com (GOMES et al.,2012) o pH do meio de cultivo (pH inicial 7,0) permanece em torno da neutralidade na maioria dos ensaios durante 24 h de cultivo, o que foi constatado neste trabalho pelos autores. O menor valor, pH 5,59 foi determinado na presença da glicose e o maior, pH 8,55 na presença de Soro de leite.

Tabela 2. Crescimento microbiano, pH e atividade Proteolítica dos em diferentes resíduos em 72 horas de cultivo a 37°C a 150 rpm.

Resíduos	Crescimento Microbiano	pH	Protease U/L
Glicose	1,884	5,59	12,75
Soro de Leite	0,652	8,55	29,7
Resíduo de sorvete	0,840	8,49	39,3

A figura 2, mostra a produção enzimática em 72 horas de fermentação, demonstrando que o Resíduo de Sorvete apresentou uma maior produção de protease. NASCIMENTO e MARTINS (2006) produziram Protease bacterianas utilizando resíduos Agroindustrial como melão da cana-de-açúcar. Foi constatado que esse resíduo foi capaz de induzir uma secreção de Protease muito maior que a observada no presente trabalho.

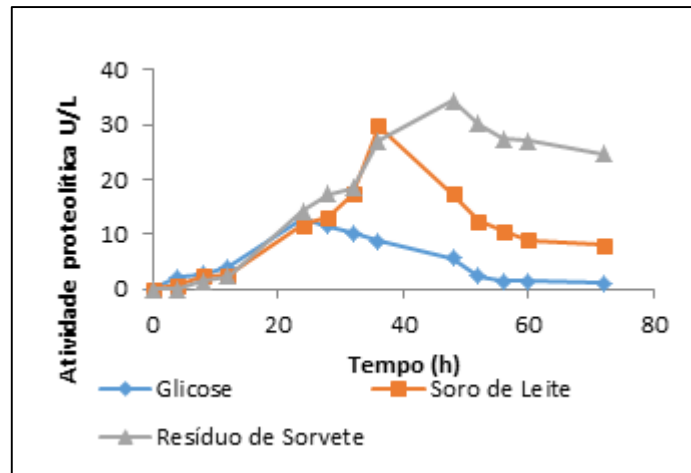


Figura 2. Atividade Proteolítica de *Bacillus licheniformis* utilizando diferentes resíduos em cultivo de 72 horas a 37° C e 150 rpm.

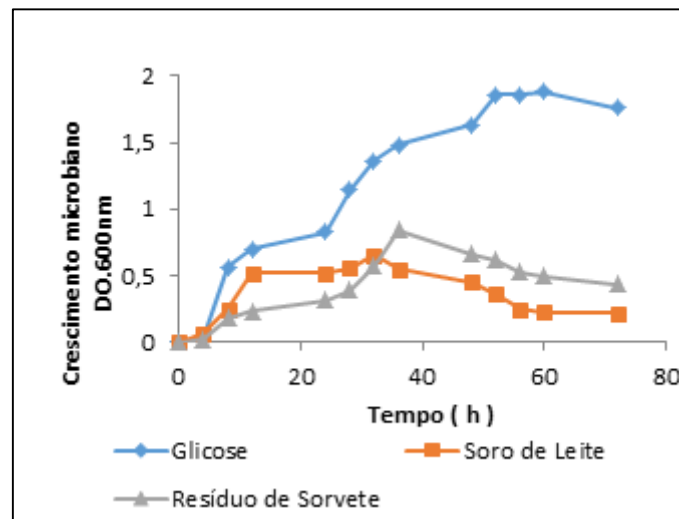


Figura 3. Crescimento do *Bacillus licheniformis* UCP (1020) nos diferentes meios alternativos testados para a produção de Protease, no período de 72 horas.

Utilizações de ensaios contendo planejamentos fatoriais reduzem a quantidade de experimentos que envolvem a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, pois os planejamentos simulam condições diferenciadas no mesmo experimento, favorecendo assim a obtenção da melhor condição obtida nos ensaios.

Após a seleção da melhor condição de produção de Protease, foram elaborados os meios alternativos contendo os resíduos industriais previamente selecionados, mantendo as mesmas condições de fermentação testadas anteriormente.

Na tabela 3 encontra-se a matriz decodificada contendo as variáveis Glicose, Resíduo de Sorvete e Soro de leite e também as determinações proteolíticas realizadas, verifica-se que a máxima atividade proteolítica evidenciada ocorreu no ensaio 8 observado na figura 4, que apresentou um valor inicial de Glicose (14,0 g/L), Soro de Leite (17,0 g/L) e Resíduo de sorvete (7,0 g/L), obtendo assim uma atividade Proteolítica de 60,45 U/L, maior atividade obtida nos 12 ensaios realizados. A atividade máxima da protease encontrada neste trabalho foi similar àquela relatada por (NASCIMENTO e MARTINS, 2004).

A atividade máxima da enzima (60,45 U/L proteína) foi alcançada após 28h de incubação do microrganismo, quando o crescimento já se encontrava no início da fase estacionária de crescimento. De acordo com Ward (1985), os microrganismos do gênero *Bacillus*, geralmente, produzem maior quantidade de protease ao final da fase exponencial de crescimento e, embora a função destas enzimas ainda não seja bem conhecida, sua produção está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação. (PEREZ et al. 2007), obtiveram máxima atividade da protease com *B. licheniformis* após 20 horas de cultivo. (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 inóculo (PURI; BEG; GUPTA, 2002).

Tabela 3. Produção de Proteínas totais, pH e atividade proteolítica dos ensaios para as concentrações de Glicose, Soro de Leite e Resíduos de Sorvete em 60 horas de cultivo a 37°C a 150 rpm.

Ensaio	Glicose	Soro de Leite	Resíduo de sorvete	pH	Proteínas Totais (mg/mL)	Proteas e (U/mL)
1	10,0	13,0	3,0	5,1	0,622	15,45
2	14,0	13,0	3,0	5,05	1,2	16,95
3	10,0	17,0	3,0	5,02	0,265	3,0
4	14,0	17,0	3,0	5,3	0,865	12,45
5	10,0	13,0	7,0	5,1	0,704	9,75
6	14,0	13,0	7,0	5,0	0,888	15,15
7	10,0	17,0	7,0	5,01	1,085	38,85
8	14,0	17,0	7,0	5,1	1,0404	60,45
9	12,0	15,0	5,0	5,0	0,987	24,41
10	12,0	15,0	5,0	5,5	0,789	23,25
11	12,0	15,0	5,0	5,0	0,850	23,85
12	12,0	15,0	5,0	5,0	0,835	23,30

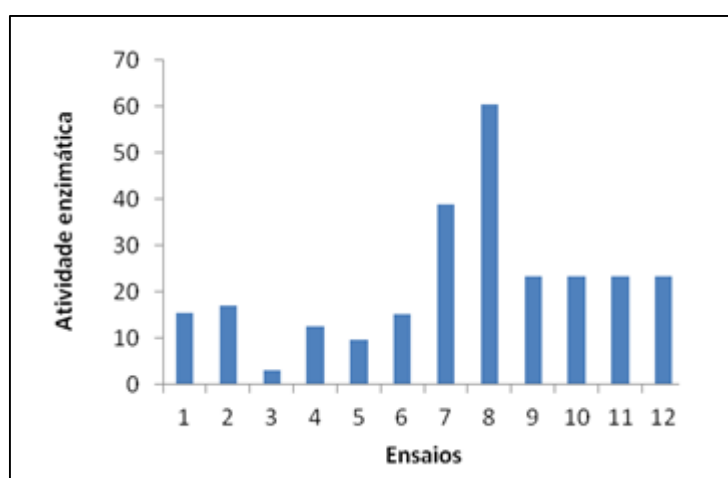


Figura 4. Variação da atividade enzimática em diferentes ensaios, sendo evidenciado maior produção de protease no ensaio 8.

A variação da faixa do pH estudado durante o perfil de crescimento ocorreu numa faixa de 6,0 a 5,0, modificando a faixa inicial como demonstrado na figura 5. 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*, 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%. Verifica-se também que no ensaio 8 foi obtido um pH ótimo de 5,58, sendo assim a melhor condição para a produção da Protease.

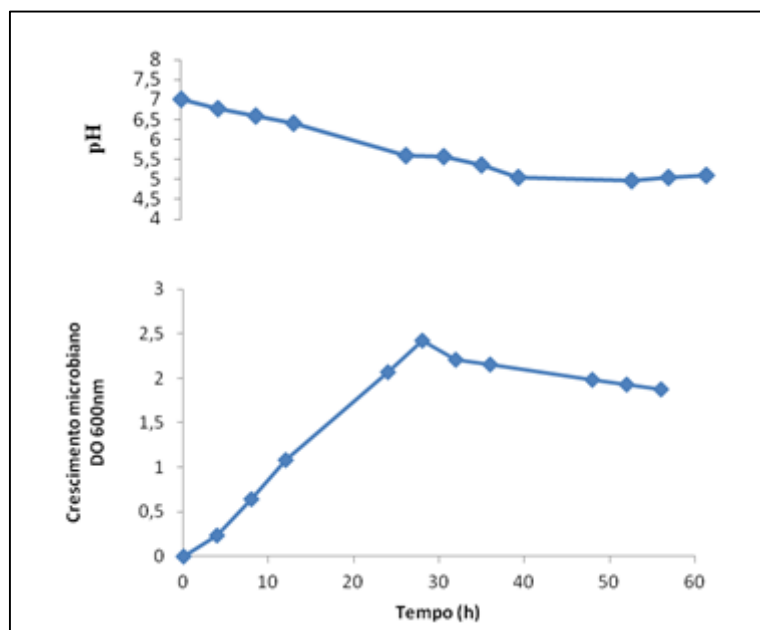


Figura 5 Crescimento do *Bacillus licheniformis* (UCP 1020) para o ensaio 8. Em 60 horas de fermentação a 37°C e pH 5,0.

Em processos fermentativos, nos quais cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis é essencial que seja utilizado um método de análise que permita detectar possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais. Em qualquer análise experimental deve-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última sendo dependente do tipo de planejamento realizado (ROCHA, 2010).

Dessa maneira, a segunda etapa do processo consistiu em avaliar o efeito das variáveis: Glicose, Resíduo de Sorvete e Soro de Leite na produção enzimática. Os valores codificados empregados no planejamento fatorial 2^3 completo, assim como os resultados obtidos para a atividade da enzima protease.

Os resultados expressos nos diagrama de Pareto (Figura 6) apresenta a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de com $p \leq 0,05$. As seguintes variáveis independentes: Glicoses, Resíduo de Sorvete e Soro de Leite, influenciaram para a produção de Protease. Sendo que Resíduo de Sorvete e o Soro de Leite foram as variáveis independentes mais relevantes para a produção da enzima, por ambas estarem muito acima dos valores de p.

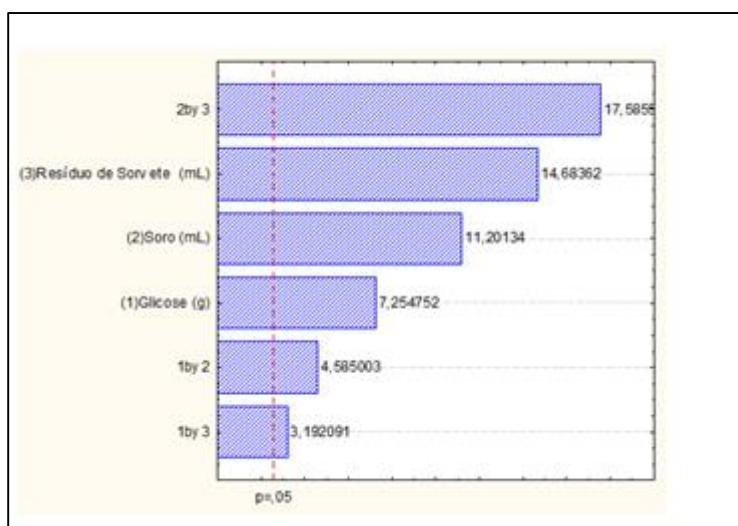


Figura 6. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de Protease por *Bacillus licheniformis* UCP 1020 a 60 horas de fermentação a 37°C. (1) Glicose, (2) Soro de Leite, (3) Resíduo de Sorvete.

O perfil de crescimento obtido no ensaio 8, com a amostra de *Bacillus licheniformis* (UCP 1020) está descrita na figura 5. Verifica-se que houve uma rápida adaptação do micro-organismo na fase onde ocorre a síntese da enzima e de outros constituintes celulares necessários a absorção dos nutrientes presentes no meio. Logo após, o micro-organismo cresceu de forma rápida, atingindo sua maior produção tanto de biomassa [M5][BC6][BC7] e atividade lipolítica de (60,45 U/L) em 60 horas de cultivo.

Talon, Montel, Berdague (1996), Abreu (2013) demonstraram que a concentração de enzima ativa, começa a aumentar ao final da fase do crescimento exponencial e atinge seu máximo durante a fase estacionária.

Oliveira et al., 2013 descreveram que para reduzir os custos da produção de enzimas, algumas estratégias podem ser adotadas, como a substituição dos componentes do meio de cultivo por reagentes de baixo custo ou até mesmo resíduos de alto valor nutritivo.

4. CONCLUSÕES [M8]

A utilização de rejeitos industriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado tem surgido como uma alternativa para minimizar os custos de produção e também o descarte de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

O meio contendo o resíduo de sorvete apresentou maior produção de protease, quando comparado aos demais meios testados. O denominado meio controle que continha Glicose e aos demais meios alternativos contendo Soro de leite e Resíduo de Sorvete, respectivamente.

O ensaio 8 apresentou maior produção de protease, nas condições que foram propostas no trabalho.

Verificou-se que os meios alternativos quando isolados, produziram protease alcalina. Os meios na presença da Glicose o pH variou para ácido.

Esses estudos de produção enzimática revelam o elevado potencial biotecnológicos dos *Bacillus licheniformis* isolados do Porto de Suape do Estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS^[M9]

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

ABREU, L. *Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipase por staphylococcus warneri ex 17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicas*. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado Curso de Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

AYENI, A. O., BANERJEE, S., OMOLEYE, J. A., HYMORE, F. K., GIRI, B. S., DESHMUKH, S. C., MUDLIAR, S. N. Optimization of pretreatment conditions using full factorial design and enzymatic convertibility of shea tree sawdust. *Biomass and Bioenergy*, v.48, p.130-138, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001. *Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45-53. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254, 1976^[M10].

BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Revista Uniabeu, Alagoas*, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.

BURKERT, J. F. M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v.91, n.1, p.77-84, 2004.

ÇALIK, P., ÇALIK, G., BILIR, E., OZDAMAR, H. T. 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^[M11].

FERNANDES, A. F., PEREIRA, J., GERMANI, R., OIANO-NETO, J. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, suppl., p. 56-65, 2008.

GUPTA, R., KHAN, S., BEG, K. Q., CHAUHAN, B. [An\[M12\]](#) overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.60, p.381-395,2002.

LEIGHTON. T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molucular Biology*, v. 76, p. 103-122, 1973.

MELO, A.G., PEDROSO, R.C.F., GUIMARÃES, L.H.S., ALVES, J.G.L.F., DIAS, E.S., RESENDE, M.L.V., CARDOSO, P.G. The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation. *Advances in Microbiology*, v.4, p. 143-150, 2014.

MENEZES, J.D.S., DRUZIAN, J.I., PADILHA, F.F., SOUZA, R.R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.8, n.8, p. 1761-1776, 2012.

NASCIMENTO, W. C. A. E MARTINS, M. L. L. Production and properties of na extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 91-96, 2004.

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.

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.

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, n.6, p.761-766, 2002.

PEREZ, M. PIAD, R.; MILIAN, G.; FELIPE, M.G.; FERREIRA, A.; MANCILHA, I. M.; LAURÊNCIO, M.; SILVA, J. B. A. [Preparation\[M13\]](#) 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., TANKASALE, M. A., GHATGE, S. M., DESHPANDE, V. V. [M14]Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v.62, p.597-635, 1998

RIBEIRO, B. D; CASTRO, A. M; SALGADO, A.M; COELHO, M.A.Z. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, p.01-89, 11 fev. 2013.

ROMERO, F. J. ; GARCIA, L. A. ; SALAS, J. A. ; DÍAZ, M. ; QUIRÓS, L. M. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 507-515, 2001.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M. R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Ice cream: composition, processing and addition of probiotic. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 21, n. 1, p. 155-165, jan./mar. 2010.

SBARDELOTTO, M., AGNOL, A.D; VENTURIN, B; MULINARI, J; TREICHEL, E; VARGAS, G.D.L.P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp., utilizando torta de canola como substrato. *Biochemistry And Biotechnology Reports*, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 3, p.293-296, mar. 2013.

SCHNEIDER, C. F., SCHULZ, D.G., LIMA, P.R., JUNIOR, A.C.G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, RN, v. 7, n. 5, p.08-17, 2012.

TEIXEIRA, A, Z., NASCIMENTO, M., M., F. TRINDADE, J.L.F., RODRIGUES, S.A. caracterização físico-química, bioconversão de resíduos agroindustriais e comparação entre métodos de inoculação. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Paraná, v. 5, n. 2, p.450-457, fev. 2011.

ZHU, M. J., CHENG, J. R., CHEN, H. T., DENG, M. C., XIE, W. H. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, n.60, v.3, p.336-342, 2013.

WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: M. Moo-Young Editor, *Comprehensive Biotechnology*, v. 3, p. 789-818. 1985.

WANG, F., PODELL, E. R., ZAUG, A.J., YANG, Y., BACIU, P. CECH, T.R., LEI, M. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, v.445, p.506-510, 2007.