

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0103/2010

ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE
BACILLUS SP. DO AMBIENTE AMAZÔNICO.

Bolsista: Ana Luiza Menezes Teles, FAPEAM.

Manaus

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0103/2010

ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE
BACILLUS SP. DO AMBIENTE AMAZÔNICO

Bolsista: Ana Luiza Menezes Teles, FAPEAM.

Orientador: MSc. Raimundo Felipe da Cruz Filho

Manaus

2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pela Faculdade de Medicina, com apoio do Departamento de Parasitologia.

Resumo

Introdução: Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, possuem importante papel em processos fisiológicos. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo. As proteases termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas e representa cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. **Objetivos:** O presente trabalho tem como objetivos isolar e identificar as bactérias proteolíticas do ambiente amazônico e também caracterizar o melhor funcionamento na utilização da enzima. **Metodologia:** O isolamento das bactérias foi realizado com choque térmico, semeadas em Ágar gelatina-leite e incubadas a 37°C por 24 horas. As bactérias protease-positiva foram purificadas e identificadas. Os *Bacillus* foram reativados em caldo nutritivo, a 37°C/24h em um pré - inóculo, alíquotas de 1000 µmL foram inoculadas em 4 mL de Solução de Manachini, pH 7,0, adicionada de gelatina 1%. Para a determinação da atividade proteolítica, 150 µL do extrato bruto com 1,5 mL de caseína 2,0%(p/v), 1,0 mL de Tampão Fosfato 0,15M, pH 7,5 e 0,5mL de solução enzimática foram incubadas a 30°C/30 min. A reação foi paralisada com 3,0 mL de solução 0,4M de TCA, filtrada em membrana 0,22 µm, com espectrofotometria a 280 nm. O pH ótimo das proteases será determinado em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampões: solução tampão citrato 0,2 M (pH 4 e 6); solução tampão fosfato 0,2M (pH 7 e 8) e solução tampão Tris HCl 0,2 M (pH 9) incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram realizados em triplicata e incubados nas temperaturas de 25°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C por 1 hora e depois determinada a atividade enzimática. **Resultados e Conclusão:** Das

coletas realizadas, foram isoladas 37 bactérias e dentre estas 21 identificadas do gênero *Bacillus*. Foram selecionadas para as etapas posteriores 8 isolados que obtiveram seu p_z menor que 0,4. Entre as selecionadas, o *B. firmus* foi o que apresentou maior quantitativo de produção de protease (0,950 U/mL), seu pH ótimo foi o 7 e seu pH na estabilidade enzimática foi o 4, já sua temperatura ótima foi a de 37°C e sua temperatura na estabilidade enzimática foi a de 25°C.

Palavras-chave: Ambiente amazônico, atividade enzimática, *Bacillus*, bactéria, protease.

Abstract

Introduction: Proteolytic enzymes or proteases catalyze the cleavage of peptide bonds in proteins, they play an important role in physiological processes. Proteases constitute one of the most important groups of industrial enzymes representing approximately 60% of the total enzyme marketed worldwide. The thermostable proteases produced by microorganisms of the genus *Bacillus* are the most important group of enzymes produced and represents about 20% of the enzymes marketed worldwide. In the pharmaceutical industry, proteases are used in healing ointments and have a potential use for other drugs. **Objectives:** This study aims to isolate and identify proteolytic bacteria from the Amazon environment and also characterize the better use of the enzyme. **Methodology:** The isolation of bacteria was carried out with heat shock, plated on gelatin-milk agar and incubated at 37 ° C for 24 hours. Protease-positive bacteria were purified and identified. The *Bacillus* were reactivated in nutrient broth at 37 ° C/24h on a pre - inoculum, aliquots of 1000 µmL were inoculated in 4 mL of Manachini solution, pH 7.0, 1% gelatin added. For the determination of proteolytic activity, 150 mL of crude extract with 1.5 mL of 2.0% casein (w / v), 1.0 mL of 0.15M phosphate buffer, pH 7.5 and 0.5 mL enzyme were incubated at 30 ° C/30 min. For the determination of proteolytic activity, 150 mL of crude extract with 1.5 mL of 2.0% casein (w / v), 1.0 mL of 0.15 M phosphate buffer, pH 7.5 and 0.5 mL enzyme were incubated at 30 ° C/30 min. The reaction was stopped with 3.0 mL of 0.4 M TCA, filtered through a membrane 0.22 µm with spectrophotometry at 280 nm. The optimum pH of protease will be determined at different pH values using the following buffer solutions: 0.2 M citrate buffer (pH 4 and 6), 0.2 M phosphate buffer (pH 7 and 8) and Tris HCl buffer 0.2 M (pH 9) incubated at room temperature for 1 hour. To evaluate the effect of temperature on proteolytic activity, the reaction system and white were performed in triplicate and incubated at temperatures of 25°C,

37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C and 80°C for 1 hour and then determined the enzyme activity.

Results and Conclusion: Of the samples taken, 37 were isolated and from these 21 were identified of the genus *Bacillus*. Were selected for the later stages 8 isolates that obtained their pz lower than 0.4. Among the selected, the *B. firmus* showed the largest amount of production of protease (0.950 U / mL), its optimum pH was 7 and pH stability enzyme was 4, its optimum temperature was 37°C and temperature stability enzyme was 25°C.

Key-words: Amazon environment, *Bacillus*, enzymatic activity, bacteria, protease.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	JUSTIFICATIVA	10
3	OBJETIVOS	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS DE AMOSTRAS DE SOLO	12
4.2	PRODUÇÃO DE PROTEASE EM MEIO SÓLIDO	12
4.3	PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS	12
4.4	PRODUÇÃO DE PROTEASES EM MEIO LÍQUIDO	13
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	13
4.6	EFEITO DO PH NA ATIVIDADE E NA ESTABILIDADE	14
4.7	EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	14
5	RESULTADOS	15
6	CONCLUSÃO	19
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

1. Introdução

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, possuem importante papel em processos fisiológicos. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo (RODARTE, 2005; RAO, 1998). As proteases termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas e representa cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo. (BEG, 2002; BEG, 2003; NASCIMENTO, 2007).

Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição, também estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. (RAO, 1998).

2. Justificativa

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos (RODARTE, 2005; LUNA, 2002; POZA, 2001; RAO, 1998). A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Proteínas são degradadas por microrganismos, que utilizam os produtos de degradação como nutrientes para o seu crescimento. A degradação é iniciada por proteinases (endopeptidases) secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por peptidases (exopeptidases) em um sítio extra ou intracelular.

Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Entre as fontes naturais de proteases, os microrganismos representam um recurso renovável atrativo por que podem ser cultivados por métodos fermentativos, em larga escala, em tempo relativamente curto. Além disso, proteínas microbianas têm longo prazo de validade e podem ser armazenadas em condições ideais por longo período, sem perda significativa da atividade. (RAO, 1998; SILVA, 2003).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais das cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (CANHOS, 2001; BRAGA, 2009).

Manfio (1998) ressalta que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivadas das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo.

Na natureza grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por microrganismos. Tais microrganismos representam excelente fonte de enzimas devida à facilidade de manipulação genética e a ampla diversidade bioquímica (NEVES, 2006).

Pelos trabalhos analisados, tem sido observado que as proteases estão amplamente distribuídas entre microrganismos. Segundo Rao (1998) proteases de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia.

3. Objetivos

- Isolar bactérias proteolíticas de ambiente amazônico;
- Identificar as bactérias isoladas produtoras de enzima proteolítica de ambiente amazônico;
- Caracterizar o melhor funcionamento na utilização da enzima.

4. Materiais e Métodos

4.1 Isolamento de bactérias proteolíticas de amostras de solo

O isolamento e seleção das bactérias proteolíticas, nesta pesquisa foram analisados 30 amostras de solo. Um grama de todas as amostras de solo foi adicionado em tubo de ensaio de 16,5 mm x 150 mm e será submetido a choque térmico, 80°C por 12 minutos, em seguida colocado em banho de gelo por 5 minutos (SARAIVA, 2007). Posterior a esse tratamento, 100 µL foram semeadas em placas de Petri, medindo 100 x15 mm, contendo Agar gelatina-leite em seguidas incubadas a 37°C por 24 horas. (PATEL, 2005).

4.2 Produção de Protease em meio sólido

Transcorrido o período de incubação supracitada, foi analisado o comportamento do crescimento bacteriano. A presença de halo hialino ao redor da colônia foi considerada positiva para atividade proteásica. Para confirmar a hidrólise do leite e a produção de metabólitos ácidos e alcalinos contidos no leite, na placa contendo o crescimento bacteriano foi adicionada uma solução de cloreto de mercúrio acidificada, durante 10 minutos e após a retirada da solução, para verificar hidrólise verdadeira. Observando-se a redução do halo, indica que o leite não foi digerido, e ocorrendo a intensificação do halo transparente, significa hidrólise verdadeira (FERNANDES, 2005).

4.3 Purificação e manutenção dos isolados

As bactérias protease-positiva foram purificadas em ágar nutritivo para posterior identificação segundo a metodologia citada por Barrow e Feltham (1999). Todos os isolados foram mantidos sob refrigeração, no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal do Amazonas.

Foi realizado também o cálculo do PZ para que se determinasse a atividade enzimática da bactéria, que consiste na razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. As bactérias

selecionadas foram aquelas com PZ menor que 0,4, pois quanto mais o PZ se aproxima de zero, maior é a sua atividade enzimática.

4.4 Produção de proteases em meio líquido

Dos cultivos foi retirado 1000 µmL para inoculação frasco de Erlenmeyer contendo 40 mL de Solução de Manachini, pH 7,0, adicionada de gelatina 1% (FERNANDES, 2005) . A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 120 rpm, a 37°C por 24 horas. O sobrenadante foi separado da biomassa por filtração a vácuo e submetido à análise proteolítica.

Os *Bacillus* protease-positiva identificados foram reativados em caldo nutritivo, a 37°C por 24 horas dos quais foram, individualmente, retirados 1000 µmL para inoculação frasco de Erlenmeyer contendo 40 mL de Solução de Manachini, pH 7,0, adicionada de gelatina 1%. A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 120 rpm, a 37°C por 24 horas. O sobrenadante foi separado da biomassa por filtração sob vácuo e submetido a análise proteolítica (FERNANDES, 2005).

4.5 Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado 150 µL do extrato bruto e como substrato 1,5 mL caseína 2,0% (m/v), em 1,0 mL de Tampão Fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5mL de solução enzimática incubada a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em membrana 0,22 µm. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm (FLEURI; SATO,2008).

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida segundo Leigton (1973), como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 1 em 60 minutos, sendo expressa em U/mL. A atividade da protease específica é calculada pela razão entre a atividade proteásica total e a quantidade de proteína contida em 1000 µL das amostra

(U/mg). Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com adição de TCA antes da adição da enzima. (FLEURI; SATO,2008).

4.6 Efeito do pH na atividade e na estabilidade

O pH ótimo das proteases será determinado em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampões: solução tampão citrato 0,2 M (pH 4 e 6); solução tampão fosfato 0,2M (pH 7 e 8) e solução tampão Tris HCl 0,2 M (pH 9) incubados à temperatura ambiente por 1 hora . Para os ensaios de estabilidade ao pH a solução da enzima será incubada nos diferentes tampões citados acima. O tempo de incubação das amostras será de 0 a 90 (15,30,45,60,75,90) minutos para cada faixa de pH, determinando-se atividade enzimática a cada 15 minutos (CAVALCANTI, 2004).

4.7 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco serão realizados em triplicata e incubados nas temperaturas de 25°C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C por 1 hora e depois determinada a atividade enzimática. Para os ensaios de estabilidade o extrato enzimático será incubado nas temperaturas (25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C) e o tempo de incubação das amostras será de 0 a 90 minutos para cada temperatura, determinando-se atividade enzimática a cada 15 minutos (CAVALCANTI, 2004).

5. Resultados

Foram realizadas coletas de solo amazônico, no solo do Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas. Das 30 coletas realizadas, foram isoladas 37 bactérias, com presença de Halo hialino ao redor da colônia, após semeadura em placas contendo ágar leite-gelatina e incubação a 37°C por 24 horas. Após os critérios de seleção serem aplicados, das 37 bactérias isoladas, somente 21 bactérias foram selecionadas, por serem do gênero *Bacillus* (Tabela 1). Destas foram selecionadas para as etapas posteriores 8 isolados que apresentaram atividade enzimática (Pz) inferior a 0,4 que segundo Santos et al. (2009) apresenta produção fortemente positiva. As bactérias selecionadas foram: 2 colônias de *Bacillus firmus* e *B. pumilus*, as demais com uma colônia de *B. anthracis*; *B. megaterium*; *B. thuringiensis* e *B. brevis*. Sendo o *B. firmus*(1) o que apresentou maior quantitativo de produção de protease (0,950 U/mL) (Tabela 2).

Espécies	Pz
<i>B. megaterium</i>	0,28
<i>B. licheniformis</i> (1)	0,83
<i>B. licheniformis</i> (2)	0,60
<i>B. pumilus</i> (1)	0,35
<i>B. pumilus</i> (4)	0,82
<i>B. pumilus</i> (3)	0,40
<i>B. pumilus</i> (2)	0,23
<i>B. pumilus</i> (5)	0,42
<i>B. amyloliquefaciens</i> (1)	0,50
<i>B. amyloliquefaciens</i> (2)	0,43
<i>B. thuringiensis</i>	0,30
<i>B. brevis</i>	0,33
<i>B. mycoides</i> (1)	0,41
<i>B. mycoides</i> (2)	0,40
<i>B. anthracis</i>	0,23
<i>B. pantothenicus</i>	0,43
<i>B. firmus</i> (1)	0,36
<i>B. firmus</i> (2)	0,22
<i>B. firmus</i> (3)	0,77
<i>B. circulans</i>	0,42
<i>B. shpaericus</i>	0,41

Tabela 1: Valores da atividade enzimática (Pz) apresentados pelas diferentes isolados.

Espécies	Abs Média	Desv. Pad.	U/mL
<i>B. megaterium</i>	0,047	0,0125	0,094
<i>B. pumilus</i> (1)	0,001	0,0023	0,001
<i>B. pumilus</i> (2)	0,049	0,0927	0,099
<i>B. thuringiensis</i>	0,099	0,0868	0,199
<i>B. anthracis</i>	0,032	0,1097	0,063
<i>B. firmus</i> (1)	0,475	0,1170	0,950
<i>B. firmus</i> (2)	0,045	0,0470	0,090
<i>B. brevis</i>	0,282	0,3968	0,563

Tabela 2: Resultados quantitativos para produção de protease em U/mL e desvio padrão.

Como *B. firmus* (1) foi a de maior produção proteásica, ela foi utilizada para que se determinasse o efeito do pH na atividade e na estabilidade enzimática, o resultado obtido foi o de que o pH ótimo da enzima é o pH 7,0 como mostrado no gráfico 1, já o efeito do pH na estabilidade, demonstrou que a enzima foi estável em pH 4 (gráfico 2). Para o efeito da temperatura na atividade enzimática, observou-se que a temperatura ótima foi a de 37°C (gráfico 3), o efeito da temperatura na estabilidade enzimática, demonstrou que a enzima foi estável na temperatura de 25°C (gráfico 4).

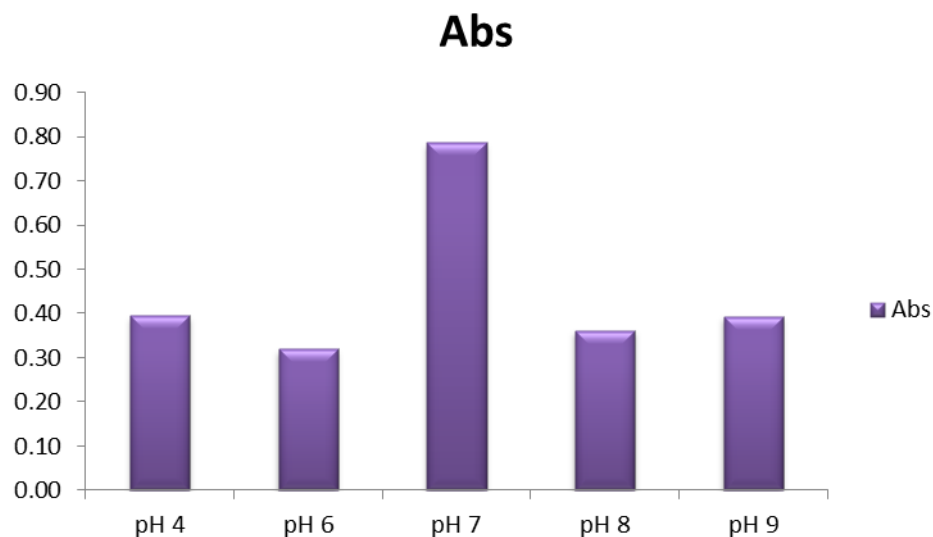


Gráfico 1: Efeito do pH na atividade enzimática (pH ótimo)

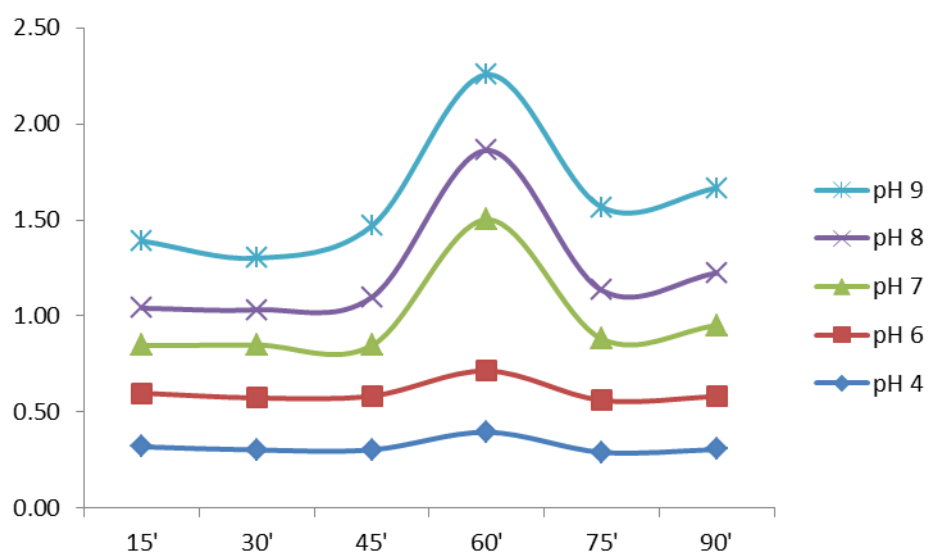


Gráfico 2: Efeito do pH na estabilidade enzimática

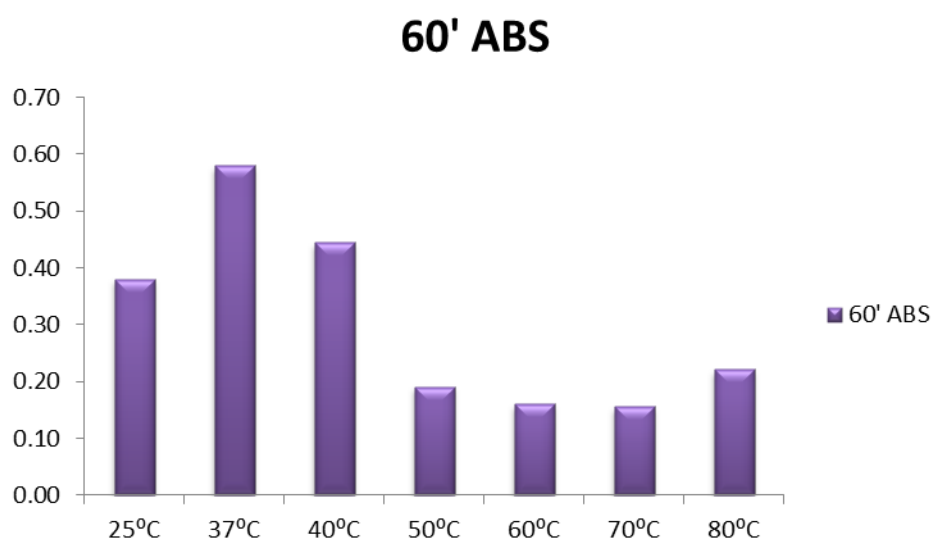


Gráfico 3: Efeito da Temperatura na atividade enzimática (temperatura ótima)

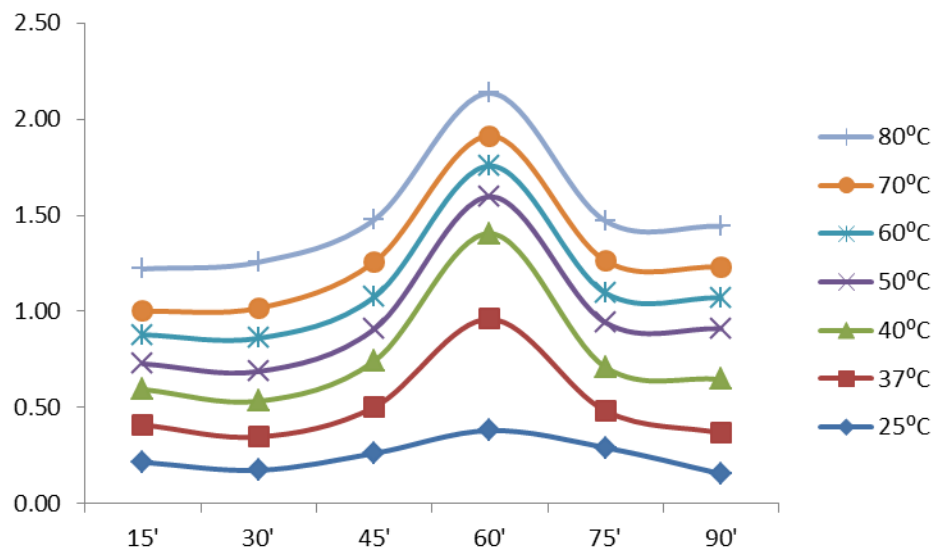


Gráfico 4: Efeito da Temperatura na estabilidade enzimática

6. Conclusão

- Todas as bactérias analisadas são produtoras de protease;
- Das 37 bactérias isoladas, 21 eram do gênero *Bacillus*;
- As bactérias do gênero *Bacillus*, 20 continham esporos;
- As 16 bactérias restantes não possuíam forma de bastonete;
- *B. firmus* (1) apresentou maior quantitativo de produção de protease (0,950 U/mL).
- O pH ótimo da enzima foi o pH 7;
- A enzima foi estável em pH 4;
- A temperatura ótima da enzima foi a de 37°C;
- A enzima foi estável na temperatura de 25°C;

Após todos os resultados, constatou-se que o solo amazônico é rico em bactérias proteolíticas, sendo, portanto viável para pesquisas de prospecção biotecnológica.

7. Referências

- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. 1999. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 331p.
- BRAGA, R. M.; et al. XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo “Isolamento de fungos de solo de manguezal da Reserva Ecológica de Sapiiranga”. 2009.
- CANHOS, V.P. & MANFIO, P.F. 2001 [Online] Recursos Microbiológicos para Biotecnologia.
Homepage: www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf.
- CHANG CT, FAN MH, KUO FC, SUNG HY. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. J. Agric. Food Chem. 48(8):3210–3216, 2000.

GUPTA , R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P.; Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications Appl Microbiol Biotechnol 59:15–32, 2002

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

BEG, Q. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. Process Biochemistry, v. 37, n. 10, p. 1103-1109, 2002.

KIM, W.,CHOI, H.K., KIM, Y., PARK S.H., CHOI. I., OH., KWON, I ., LEE., S. JEONG, Y.K., KONG, I.S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzymes produced from *Bacillus* sp CK 11-4 SCREENED FRON Chungkook-Jang. Applied and Enviroment Mycrobiology 62, 24-82 , 1997.

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

LIU J.G.; XING, J.M.; CHANG, T.;MA, Z.Y.; LIU, H.Z. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. Process Biochem 40:2757–2762, 2005

LEE S.K.; BAE, D.H.; KWON, T.J.; LEE, S.B.; LEE, H.H.; PARK, J.H.; HEO, S.; JOHNSON, M.G. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. J Microbiol Biotechnol 11(5):845–852, 2001

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

MANFIO et al. 1998. Biodiversity: Perspectives and Technological Opportunities. Capítulo 9:Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável (diversos documentos).

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. Termofílico. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.27 no.2 Campinas Apr./June 2007.

NELSON, D. L. & COX, M. M. (2000). Enzymes. In Principles of Biochemistry, pp. 243–292, Worth Publishers, New York.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. Acta Amazônica. v.36, n.3, 2006: 299 - 306

PENG, Y.; ZHANG, Y. Z. Optimization of fermentation conditions of douchi fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. *Chin Food Ferment Ind* 28:19-23, 2002.

PENG, Y., ZHANG, Y.Z., (2002a) Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme-producing strain DC-4 from Chinese douchi and primary analysis of the enzyme property. *Chin High Technol Lett* 12:30-34

PENG, Y.; HUANG, Q.; ZHANG, R.H.; ZHANG, Y.Z. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*; 134 : 45-52, 2003

Proteolytic enzymes: A practical approach. Beynon, R.J., Bond, J.S. (eds). 1989. Academic press. Oxford

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916-921, Nov. 2001.

RAO, M.B., TANKSALE, A .P., GHATGE, M.S., DESPHANDE, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *microbiology and molecular biology reviews*, 62 (3):597-635.

RODARTE, M. P. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) / Mirian Pereira Rodarte. - Lavras : UFLA, 2005. 86 p.

SATO, H. H; FLEURI, L. F. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(2): 299-310, abr.-jun. 2008.

SILVA, M. R. O. et al. Estudo de Métodos de Extração de Protease Termotável Produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. *Sinaferm*, 2003.