

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0076/2011

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *BACILLUS* SP. EM SISTEMA DE
DUAS FASES AQUOSAS.

Bolsista: Ana Luiza Menezes Teles, FAPEAM.

Manaus
2012

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0076/2011

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *BACILLUS* SP. EM SISTEMA DE
DUAS FASES AQUOSAS.

Bolsista: Ana Luiza Menezes Teles, FAPEAM.

Orientador: MSc. Raimundo Felipe da Cruz Filho

Manaus
2012

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 pela 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

Proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Entre as aplicações farmacêuticas de proteases microbianas estão o tratamento da trombose, agentes quimioterápicos, pomadas cicatrizantes, entre outros. Uma grande variedade de enzimas microbianas têm sido utilizada no tratamento de trombooses. O presente trabalho teve como objetivos: purificar proteases utilizando o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA); caracterizá-las quanto ao pH e Temperatura; utilizar fermentação submersa e otimizar o sistema de produção/purificação em SDFA. Foram analisadas *Bacillus sp.* produtores de protease isolados de solo Amazônico. Dos cultivos retirou-se 1000 µmL para inoculação em Solução de Manachini, pH 7,0 [gelatina 1%.(m/v)] Para a determinação da atividade proteolítica 150µL do extrato bruto com 1,5mL de caseína 2,0%(p/v), 1,0mL de Tampão Fosfato 0,15M, pH 7,5 e 0,5mL de solução enzimática e foram incubadas a 30°C/30min. A reação foi paralisada [3,0mL de solução 0,4M de TCA], filtrada em membrana 0,22 µm. A absorbância do filtrado foi determinada a 280nm. O pH ótimo foi determinado em diferentes valores de pH e incubados por 1 hora. O tempo de incubação das amostras foi de 0 a 90 minutos para cada faixa de pH, determinada a atividade enzimática a cada 10 minutos. Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema foi incubado nas temperaturas de 25°C a 80°C por 1 hora e determinada a atividade enzimática. Para os ensaios de estabilidade o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas de 25 °C a 80 °C e o tempo de incubação das amostras foram de 0 a 90 minutos, determinando-se atividade enzimática a cada 10 minutos. A influência das variáveis foi realizado com um ensaio fatorial (2³) com 4 repetições do ponto central, os fatores foram a massa molar do PEG, o pH e as concentrações de sais de fosfato, as análises foram referentes a atividade enzimática e determinando-se posteriormente o PF, R topo%, K e a Seletividade. Os sistemas de extração das enzimas foram realizados com solução de Polietileno Glicol (50% p/v) de diferentes massas molares

[PEG 400, 4000 e 6000] e soluções de fosfato [40% (m/m)], contendo fosfato de potássio, em pH 7,0; 8,0 e 9,0. A massa final do sistema foi de 3g. Os volumes da fase superior e inferior foram medidas, separando-se com pipetas, cada uma dessas fases para determinação da atividade proteolítica e teor de proteína. Da cultura estoque 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* (1) foi selecionado para as análises posteriores. Com pH ótimo foi igual a 7,0, e a enzima apresentou estabilidade ao pH 4. A temperatura ótima foi de 37°C, e o efeito da temperatura na estabilidade enzimática 25°C. O melhor sistema considerando-se as quatro variáveis respostas foi MMPEG (m/m) 400, Con. Sais= 15% e pH 9,0, com valores de $K = 1,61$, $PF = 1,02$, $R \text{ topo}\% = 70,1$ e $S = 1,52$

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

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Justificativa	9
3. Objetivos	11
4. Materiais e Métodos	12
4.1. Microrganismos	12
4.2. Produção de proteases em meio líquido	12
4.3. Determinação da atividade proteolítica	12
4.4. Efeito do pH na atividade e na estabilidade	13
4.5. Efeito da temperatura na atividade enzimática	13
4.6. Delineamento experimental e análise estatística	13
4.7. Preparação do Sistema de Duas fases aquosa	14
4.8 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína, Atividade, Rendimento, Seletividade e Fator de Purificação.....	14
5. Resultados	16
6. Conclusão	21
7. Referências Bibliográficas	22

1. Introdução

Proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas e possuem importante papel em processos fisiológicos. Aquelas de origem microbiana representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, com inúmeras aplicações em produtos industriais, domésticos e na indústria farmacêutica. Uma das principais atrações pelo uso de microrganismos se dá pelo baixo custo na produção, pelo cultivo em grande quantidade, tempo curto e pela vantagem de não estar condicionado às questões sazonais e geográficas (BON, 2008).

Devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares proteolíticas 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 fármacos (RAO, 1998).

Uma das principais aplicações farmacêuticas de proteases microbianas (proteases fibrinolíticas) é que são usadas no tratamento da trombose, que é considerado como um dos principais eventos de doenças cardiovasculares (DCVs) na vida moderna (ASHIS; SUDHIR, 2011). Uma variedade de enzimas microbianas fibrinolíticas, ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), uroquinase (u-PA, CE 3.4.21.31) e estreptoquinase bacteriana do ativador do plasminogênio (CE 3.2.1.35) têm sido amplamente estudados e utilizados como agentes trombolíticos (DENG, 2010).

As DCVs podem ser: doenças coronarianas, cerebrovasculares, hipertensão, doença arterial periférica, cardiopatia reumática, cardiopatia congênita e insuficiência cardíaca. De

acordo com estatísticas da Organização Mundial da Saúde, cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2005, o que representou 30% de todas as mortes globais. Em 2015, quase 20 milhões de pessoas morrerão de DCVs, principalmente por doença coronariana e derrame (DENG, 2010).

2. Justificativa

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos (RODARTE, 2005; 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 pouco tempo. 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.

O aproveitamento de fontes naturais, como os microrganismos, para produção de novos fármacos, vem sendo o incentivo principal para o desenvolvimento de diversos setores da bio-indústria. O Brasil com uma das maiores biodiversidade do mundo apresenta grande potencial para busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos uma vez que é inigualável a sua biodiversidade microbiana, disponível para transformação em produtos úteis e de maior valor agregado, dentre eles as enzimas. Conceitualmente enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, ou seja, aceleram a velocidade de reações químicas. "Enzimas especiais" são aquelas com aplicabilidade em uso terapêutico, diagnóstico, analítico, química fina e pesquisa na atualidade as enzimas são empregadas desde os produtos de limpeza, que contém proteases, na área petroquímica produzindo biodiesel (lipases) e na terapêutica em kits de diagnósticos, fármacos, entre outras tantas áreas. A alta eficiência das enzimas, aliada a alta especificidade, tornam-nas agentes de grande potencial para o uso terapêutico, sua relevância se dá pelo fato de que em pequenas quantidades do catalizador biológico podem produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas (ZIMMER, 2009).

3. Objetivos

- Purificar proteases utilizando o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA);
- Caracterizar proteases quanto ao pH e Temperatura;
- Produção de proteases utilizando fermentação submersa;
- Otimização do sistema de produção/purificação no SDFA

4. Materiais e Métodos

4.1 Microrganismos

Nesta pesquisa foram analisadas *Bacillus* sp. produtores de protease isolado de solo Amazônico e preservado em Agar nutritivo, Laboratório de Microbiologia segundo Cruz Filho (2006).

4.2 Produção de proteases em meio líquido

Da cultura estoque foi preparada uma suspensão semelhante à coluna 1 de Mac Farland, desta foi retirado um alíquota de 1000 µmL a para inoculação frasco de Erlenmeyer contendo 40 mL de Solução de Manachini, pH 7,0, adicionada de gelatina 1% (p/v) (SANTOS, 2009) . A fermentação foi realizada a 120 rpm, a 37°C por 24 horas. O sobrenadante foi separado por filtração em membrana (0,22 µm), e submetido à análise proteolítica.

4.3 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% (p/v), em 1,0 mL de Tampão Fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5 mL 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) (FLEURI; SATO, 2008).

A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm. A unidade de atividade proteolítica é definida segundo Leighton (1973), sendo expressa em U/mL. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com adição de TCA antes da adição da enzima. (FLEURI; SATO, 2008).

4.4 Efeito do pH na atividade e na estabilidade

O pH ótimo das proteases foi determinado em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampões: solução tampão citrato 0,2 M (pH de 4 a 6); solução tampão fosfato 0,2M (pH de 7 a 8) e solução tampão Tris HCl 0,2 M (7.2 a 9) incubados à temperatura ambiente por 1 hora (SANTOS, 2009), e seguida da determinação da atividade proteolítica sugerida por Fleuri e Sato (2008). A estabilidade foi determinada nos tempos de incubação das amostras em minutos (15, 30, 45, 60, 75, 90 min) para cada faixa de pH (SANTOS, 2009), determinando-se atividade enzimática segundo Fleuri e Sato (2008).

4.5 Efeito da temperatura na atividade enzimática

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 (SANTOS, 2009), e seguida da determinação da atividade proteolítica sugerida por Fleuri e Sato (2008). Para os ensaios de estabilidade o extrato enzimático foi 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 foi de 0 a 90 minutos para cada temperatura, fpo determinada a atividade enzimática a cada 10 minutos (SANTOS, 2009), segundo Fleuri e Sato (2008).

4.6 Delineamento experimental e análise estatística

A influência das variáveis foi realizado com um ensaio fatorial completo (2^3) com 4 repetições do ponto central (Tabela 1), os fatores foram a massa molar do PEG, o pH e as concentrações de citrato, as análises foram referentes a atividade enzimática (U/mL), o fator de purificação (FP), rendimento teórico (Rs%), coeficiente de partição da enzima (K_{ae}) e a seletividade (S). Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o programa Minitab 16.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	7	8	9
MMPEG	400	4000	6000
Conc. Sais	15	20	25

Tabela 1: Planejamento experimental completo (2^3) com 4 repetições no ponto central tendo com fatores Massa molar do PEG (MMPEG), Linhas de amarração (*Tie Line*) e o pH.

4.7 Preparação do Sistema de Duas fases aquosa

Os experimentos para extração das enzimas foram realizados com solução de Polietileno Glicol (50% p/v) de diferentes massas molares, PEG 400, 4000 e 6000 e soluções de fosfato (40%), consistindo de uma mistura de quantidades adequadas de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 , em pH 7,0; 8,0 e 9,0. O sistema foi preparado em tubo de centrífuga graduado contendo uma mistura de quantidade necessária de polímero e sal, no qual foi adicionado o extrato enzimático com as proteases que representará 20% (m/m), do total da massa do sistema, no qual foi adicionado água para completar peso final de 3g. Todos os sistemas foram agitados em vortex por 60 segundos e as duas fases separadas por 60 minutos. Em seguida, os volumes da fase superior e inferior foram medidas, separando-se com pipetas, individualmente, cada uma dessas fases para determinação da atividade proteolítica e teor de proteína.

4.8 Determinação do Coeficiente de Partição da Proteína, Atividade, Rendimento, Seletividade e Fator de Purificação

Para determinação do coeficiente de partição protease (A), seletividade (B) rendimento teórico % (C) e o fator de purificação (grau de pureza) (D) foram utilizadas as fórmulas descritas abaixo (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005):

$$(A) Kae = \frac{A_{\text{topo}} \text{ (Atividade proteica na fase leve)}}{A_{\text{fundo}} \text{ (Atividade proteica na fase pesada)}}$$

$$(B) S = \frac{K_{\text{biomolécula alvo}}}{K_{\text{proteínas totais}}}$$

$$(C) R_{(S)} \% = \frac{100}{[1 + V_I (V_S \times K)]}$$

$$(D) PF = \frac{A_t / C_t}{A_i / C_i}$$

5. Resultados

Da cultura estoque, 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* e possuírem o PZ menor que 0,4 (Tabela 2). As bactérias encontradas na cultura estoque 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) foi o que apresentou maior quantitativo de produção de protease (31,67 U/mL) (Tabela 3).

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. pantothenius</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 2: Valores da atividade enzimática (Pz) apresentados pelas diferentes isolados.

Espécies	Abs Média	Desv. Pad.	U/mL
<i>B. megaterium</i>	0,047	0,013	3,133
<i>B. pumilus</i> (1)	0,001	0,002	0,067
<i>B. pumilus</i> (2)	0,049	0,093	3,267
<i>B. thuringiensis</i>	0,099	0,087	6,6
<i>B. anthracis</i>	0,032	0,110	2,133
<i>B. firmus</i> (1)	0,475	0,117	31,67
<i>B. firmus</i> (2)	0,045	0,047	3
<i>B. brevis</i>	0,282	0,397	18,8

Tabela 3: Resultados quantitativos para produção de protease em U/mL e desvio padrão.

Como *B. firmus* (1) foi à bactéria de maior produção protease, sendo esta utilizada para que se determinar as características físico-químicas da enzima. O pH ótimo foi igual a 7,0 (Figura 1), e a enzima apresentou estabilidade ao pH 4 (Figura 2). A temperatura ótima foi de 37°C (Figura 3), e o efeito da temperatura na estabilidade enzimática 25°C (Figura 4).

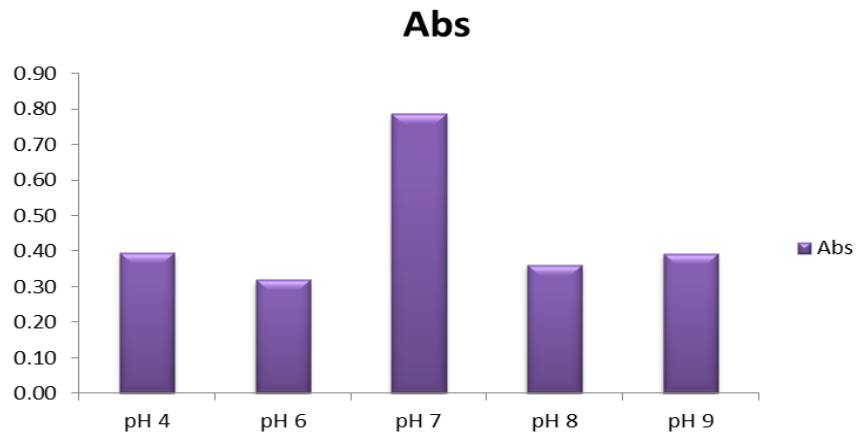


Figura 1: Efeito do pH na atividade enzimática (pH ótimo)

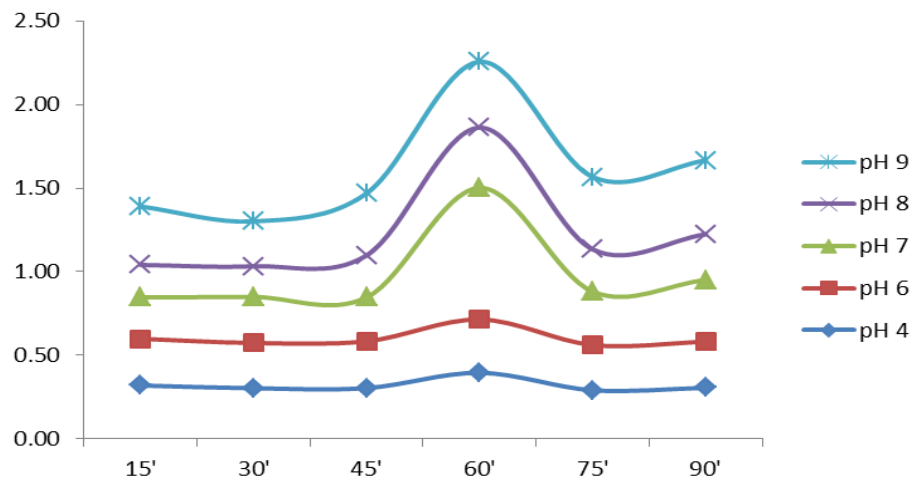


Figura 2: Efeito do pH na estabilidade enzimática

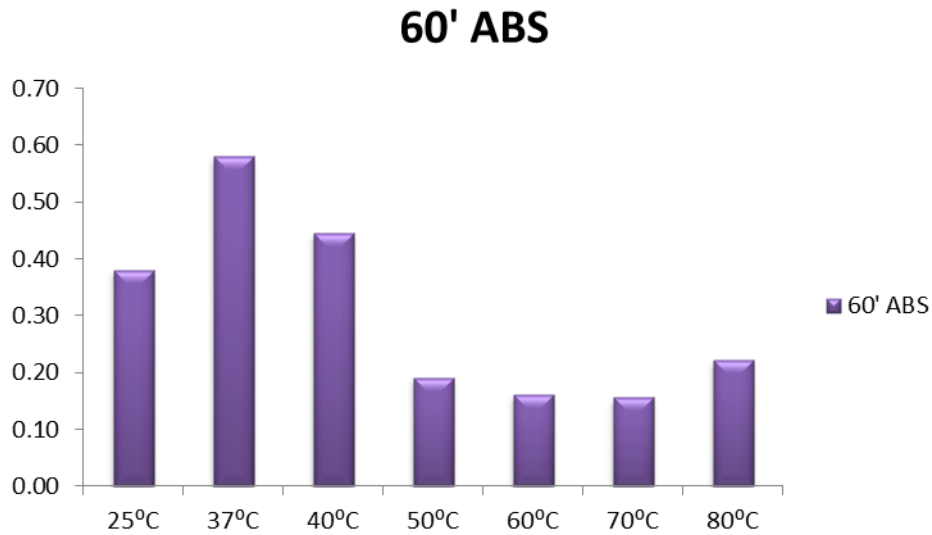


Figura 3: Efeito da Temperatura na atividade enzimática (temperatura ótima)

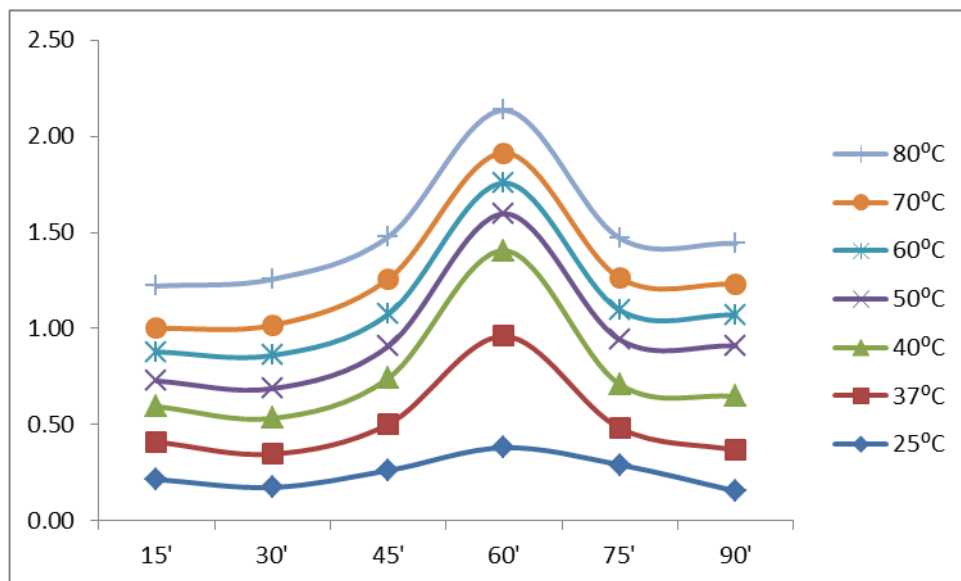


Figura 4: Efeito da Temperatura na estabilidade enzimática

Nos experimentos (n=12) realizados por Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) mostraram que as proteases extraídas de *B. firmus* (1) particionaram preferencialmente para a fase rica em PEG (fase superior do sistema) ($K > 1$) (Tabela 4). Isto pôde ser evidenciado pelo aumento da concentração de sais de fosfato, pois quanto maior a concentração destes sais nos sistemas maior foi o valor do coeficiente de partição (K) (MOURA et al., 2010; PALHETA et

al., 2010) exceto os sistemas 3, 4 e 7. Em relação ao fator de purificação (PF) os valores variaram de 0,59 a 1,02. Essa variável resposta sofreu influência significativa das variáveis MMPEG, Com. Sais e pH, apresentando o maior valor nos níveis mais altos dessas variáveis. Quanto ao rendimento da proteína (R topo %), o sistema 2 foi de 70,1%, demonstrando que provavelmente a enzima teve seu sítio ativo alterado pela presença do PEG no sistema ou a eliminação de inibidores no SDFa. A Seletividade máxima foi de 1,75 no sistema 5, observou-se significância das variáveis respostas do planejamento assim como as interações entre elas. O melhor sistema (2) considerando-se as quatro variáveis respostas foi MMPEG (m/m) 400, Con. Sais= 15% e pH 9,0, com valores de K = 1,61, PF= 1,02, R topo%= 70,1 e S=1,52 (Tabela 4).

Amostras	pH	MMPEG	Con.Sais	K	R topo %	FP	S
1	7	400	15	sf	sf	sf	sf
2	9	400	15	1,61	70,11	1,02	1,52
3	7	6000	15	0,89	25,18	0,81	0,84
4	9	6000	15	0,81	40,25	0,71	0,92
5	7	400	25	1,47	35,60	1,00	1,75
6	9	400	25	1,45	45,59	0,90	1,51
7	7	6000	25	0,89	20,62	0,59	0,72
8	9	6000	25	1,04	32,60	0,75	1,43
9	8	4000	20	1,42	45,04	0,80	1,36
10	8	4000	20	1,06	38,06	0,72	0,96
11	8	4000	20	1,29	42,77	0,84	1,00
12	8	4000	20	1,25	41,89	0,77	0,86

Tabela 4: Purificação em SDFa usando planejamento fatorial 2^3 , (MMPEG: massa molar do PEG; Com. Sais: concentração de sais de fosfato; K: fator de partição; R topo%: rendimento; FP: fator de purificação; sf; não ocorreu a formação de fases)

6. Conclusão

- Todas as bactérias analisadas eram produtoras de protease;
- Das 37 bactérias isoladas, 21 eram do gênero *Bacillus*;
- As bactérias do gênero *Bacillus*, 20 continham esporos;
- Das 16 bactérias restantes possuíam forma de bastonete;
- 8 bactérias selecionadas com atividade enzimática (Pz) < 0,4;
- *B. firmus* (1) apresentou maior quantitativo de produção de protease;
- Como *B. firmus* (1) foi a de maior produção proteásica, ela foi utilizada para as etapas seguintes.
- 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;
- O melhor processo de produção/purificação foi o sistema 2.

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.
- BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *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 mojavenensis* under fed batch operations. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 10, p. 1103-1109, 2002.
- BRAGA, R. M.; et al. XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo "Isolamento de fungos de solo de manguezal da Reserva Ecológica de Sapiroanga". 2009.
- CANHOS, V.P. & MANFIO, P.F. 2001 [Online] Recursos Microbiológicos para Biotecnologia.
- 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
- Homepage: www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recurso_biologicos.pdf.
- KIM, W., CHOI, H.K., KIM, Y., PARK S.H., CHOI, I., OH, KWON, I., LEE, S. JEONG, Y.K. Proteolytic enzymes: A practical approach. Beynom, R.J., Bond, J.S. (eds). 1989. Academic press. Oxford
- KONG, I.S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzymes produced from *Bacillus* sp CK 11-4 SCREENED FROM Chungkook-Jang. *Applied and Environment Microbiology* 62, 24-82, 1997.
- 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
- 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
- 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).

MOURA, R. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Partição da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth (ConGf) em sistema de duas fases aquosas usando PEG – fosfato. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife-PE.

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. VOL. 36(3) 2006: 299 - 306

PALHETA, R. A.; PORTO, T. S.; FERNANDES, M. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F.S. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PROTEASES DO LÁTEX DE *Brosimum parinarioides* Ducke UTILIZANDO O SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG-FOSFATO). Anais/Resumos da 62ª Reunião anual da SBPC: ISSN: 2176-1221. UFRN, Natal- RN, 2010.

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

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.

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. : il.

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 Termostável Produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. Sinaferm, 2003.