

**PRODUÇÃO DE PROTEASE UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS
ATRAVÉS DE AMOSTRAS DE *BACILLUS LICHENIFORMIS*
ISOLADAS DO PORTO DA CIDADE DE RECIFE -
PERNAMBUCO**



ISSN: 1984-3151

**PROTEASE PRODUCTION USING DIFFERENT MEDIA FROM *BACILLUS*
LICHENIFORMIS SAMPLES ISOLATED OF PORT OF RECIFE CITY-
PERNAMBUCO**

**Vanessa de Assis Melo¹; Galba Maria de Campos –Takaki²; Carlos Alberto Alves da
Silva³**

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE. vanessaassismelo@gmail.com.
- 2 Doutora em Microbiologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE. takaki@unicap.br.
- 3 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE. calves@unicap.br.

Recebido em: 10/03/2015 - Aprovado em: 26/05/2015 - Disponibilizado em: 30/05/2015

RESUMO: A utilização de novas amostras de micro-organismos para produção de enzimas microbianas por processos fermentativos tem aumentado nas últimas décadas. As proteases são enzimas que apresentam uma alta especificidade catalítica, pois atuam principalmente na hidrólise de proteínas e de peptídeos. O gênero *Bacillus* se destaca por produzir uma grande quantidade de produtos biotecnológicos de alto valor agregado. Foram realizados ensaios para avaliar o potencial de 3 amostras de *B. licheniformis* (UCP 1010, 1020 e 1022) isoladas do Porto da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, através de uma seleção da produção de protease em meio sólido utilizando diferentes temperaturas (28, 37, 45 e 50°C). Após a seleção da amostra com maior potencial de produção de protease, foram realizados ensaios de produção da enzima através de fermentação submersa utilizando 3 diferentes meios, 150 rpm, 37 °C, durante 72 h. Os resultados revelaram que a amostra UCP 1020 obteve o maior halo característico de produção enzimática (3,5 cm) na temperatura de 37°C, durante 96 h. A produção através da fermentação submersa revelou que o meio denominado de 3 apresentou a maior atividade enzimática obtida (30,45 U L⁻¹).

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus*, enzimas microbianas, seleção condições.

ABSTRACT: The use of new samples of microorganisms for the production of microbial enzymes by fermentation processes has increased in recent decades. Proteases are enzymes which exhibit a high catalytic specificity because they act primarily on the hydrolysis of proteins and peptids. The genus *Bacillus* stands for producing a lot of biotechnological products with high added value. Assays were performed to evaluate the potential of 3 samples of *B. licheniformis* (UCP 1009, 1020 and 1022) isolated from the Port of Recife, Pernambuco, Brazil, through a protease production of selection on solid medium using different temperatures (28 37, 45 and 50 °C). After the selection of the sample with higher protease production potential, production of the enzyme assays were performed by submerged fermentation using 3 different medium. The performace assays in 150 rpm, 37 ° C, 72 h. The results revealed that the CPU 1020 sample had the highest enzyme production characteristic halo (3.5 cm) at 37°C

temperature for 96 h. The production by submerged fermentation revealed that the medium called presented an enzymatic activity of 30.45 U L⁻¹.

KEYWORDS: *Bacillus*, microbial enzymes, condition selection

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos nas últimas décadas têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo assim diversas características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; SAUER, *et al.*, 2008; GORDEEVA; IVASHKIN; GORDEEV, 2012; ERICKSON, *et al.*, 2012; AZMI, *et al.*, 2015).

A utilização desses processos tem possibilitado a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial através de processos fermentativos, principalmente as enzimas microbianas (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000; HOONDAL, *et al.*, 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; ADRIO; DEMAIN, 2014; GOPINATH, *et al.*, 2015).

As enzimas microbianas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, podendo atuar em inúmeras reações descritas no International Union Handbook of Enzyme Nomenclature. Estimam-se que 80% das enzimas sejam produzidas através de processos fermentativos e muitas destas adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e de produtos lácteos (SOETAERT; VANDAMME, 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; TYO; KOCHARIN; NIELSEN, 2010; ADRIO; DEMAIN, 2014).

As proteases (E.C.3.4) constituem o maior grupo de enzimas utilizadas industrialmente no mundo todo, movimentando a economia deste setor ativamente, apresentando uma alta especificidade catalítica, pois atuam principalmente na hidrólise de proteínas e de aminoácidos (HADDAR *et al.*, 2010; PILLAI *et al.*,

2011), sendo produzidas principalmente por diversos gêneros de micro-organismos (GUPTA, BEG, LORENZ, 2002; SANDHYA, *et al.*, 2005; RADHA, *et al.*, 2011; RODARTE, *et al.*, 2011; ZAFERANLOO, *et al.*, 2014; LILAO; MATEO; MAICAS, 2014; RAVI, *et al.*, 2015).

A atual demanda mundial do mercado enzimático gerou um interesse em proteases microbianas devido ao seu rápido crescimento, a eficiência de custos, facilidade com que eles podem ser geneticamente modificados, e de suas aplicações em diferentes atividades industriais: processamento de alimentos e bebidas, formulação de detergentes e produção de medicamentos (RAO, *et al.*, 1998; MAURER, 2004; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; SABOTIČ; KOS, 2012; NIYONZIMA; MORE, 2015).

O gênero *Bacillus* tem sido descrito na literatura como um excelente produtor de bioprodutos de origem microbiana, principalmente através de processos fermentativos (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004; VAN DIJL; HECKER, 2013; LOISEAU, *et al.*, 2015).

Este trabalho teve como objetivos a seleção de amostras de *Bacillus licheniformis* com potencial de produção de protease em meio sólido e a seleção de meios de produção de protease através de fermentação submersa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas 3 amostras do gênero *Bacillus licheniformis* (UCP 1010, 1020, 1022), isoladas do

porto da cidade de Recife, Pernambuco. As amostras estão catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). Para a manutenção das culturas, foi utilizado o meio Ágar Nutriente (AN) g L⁻¹: Extrato de carne (5,0), Peptona (10,0), NaCl (5,0), Agar (20,0), pH 7,0.

2.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE PROTEASE EM MEIO SÓLIDO

Foram utilizadas amostras de *Bacillus licheniformis* previamente descritas em diferentes temperaturas de crescimento (28, 37, 45 e 50 °C) e em diferentes valores de pH (5, 6, 7, 8, 9, 10) para a obtenção das melhores amostras produtoras de protease em meio sólido, através da metodologia de Hankin e Anagnostakis (1979), utilizando o meio Ágar Nutriente contendo 10% de gelatina.

Após a distribuição do meio nas placas, foi feito um furo de 0,8 cm para obtenção dos poços nos centros das placas, onde foram inoculadas suspensões bacterianas de 10⁶ UFC mL⁻¹. As placas foram colocadas em estufas com diferentes temperaturas durante 72 h.

A formação de halo transparente indicando a degradação da gelatina ao redor da colônia, evidência a presença da protease.

2.3 SELEÇÃO DOS MEIOS DE PRODUÇÃO DE PROTEASE EM MEIO SÓLIDO

Após o processo de seleção das amostras produtoras da protease em meio sólido, foram realizados ensaios de produção da enzima através de fermentação submersa.

Foram testados os meios: **meio 1** (g L⁻¹): óleo de soja 0,001 L, peptona 10 g e extrato de levedura 5 g, água destilada 1 L; **meio 2** (g L⁻¹): Peptona 0,1; KCl 0,03; K₂HPO₄ 0,09; MgSO₄ 0,05; CaCl₂ 0,03; ZnO 0,025; FeCl₃.6H₂O 0,027; MnCl₂.4H₂O 0,001; CuCl₂.2H₂O 0,0085; CoCl₂.6H₂O 0,024; NiCl₃.6H₂O 0,025; H₃BO₃ 0,003; **meio 3** (g L⁻¹): Extrato de Carne 5 g; Peptona 15 g; NaCl 5 g; K₂HPO₄ 5 g; CaCl₂ 0,2 g.

A produção de protease foi avaliada durante 72 h, 150 rpm, a 37 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular foi determinado, através da coleta de amostras a cada 4 horas durante 72 h, utilizando-se um espectrofotômetro Hitachi modelo UVmini-1240 (Kyoto, Japão) a um comprimento de onda de 600 nm..

2.5 DETERMINAÇÃO DO PH

O pH das amostras coletadas foi determinado através de potenciometria.

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍCA

A atividade enzimática foi determinada através da metodologia descrita por Leighton *et al.*, (1973).

Para detecção da protease foi preparada uma reação contendo 250 µL da solução azocaseína e 150 µL da amostra coletada no processo de produção em diferentes intervalos de tempo.

As amostras coletadas foram centrifugadas para separação da massa celular e obtenção de um líquido metabólito isento de células.

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, todas

as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 8.000 rpm, 40 °C.

Após o término da centrifugação, foram adicionados 500 µL de uma solução de NaOH (1:1). A presença das enzimas proteolíticas foi observada através de leitura em espectrofotômetro automático modelo a um comprimento 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 da protease foi calculada através da Eq. 1 (LEIGHTON *et al.*, 1973):

$$AE (U L^{-1}) = \frac{ABS_{am} \cdot V_{am} \cdot fd}{t} \quad (1)$$

AE = atividade proteásica (U L⁻¹); ABS_{am} = absorbância da amostra; V_{am} = volume da amostra (mL); fd = Fator de diluição; t = o tempo de reação em minutos.

2.6 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

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

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

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 1 L com água destilada.

Em seguida, foi preparada uma curva de calibração para determinação das proteínas totais das amostras coletadas no período da fermentação. Após a centrifugação das amostras, foram lidas a um comprimento de onda de 595 nm.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE PROTEASE EM MEIO SÓLIDO

Os ensaios realizados com as amostras UCP 1009, 1020 e 1022 em diferentes valores de temperatura e pH estão descritos na TAB. 1. Os halos obtidos foram medidos em centímetros.

Verifica-se que não houve nenhuma formação de halo característico da protease testada nas temperaturas de 45 e 50 °C em todas as amostras utilizadas, confirmando os dados descritos na literatura.

Tabela 1
Ensaio de detecção da protease em meio sólido utilizando diferentes amostras de *Bacillus licheniformis* em diferentes valores de temperatura.

AMOSTRAS	Temperatura (°C)	24h	48h	72h	96h
UCP 1009	28°C	-	-	2,5	3,0
	37°C	-	1,5	2,5	3,0
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-
UCP 1020	28°C	-	-	1,5	2,0
	37°C	1,5	2,0	3,3	3,5
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-
UCP 1022	28°C	-	-	-	-
	37°C	-	1,5	2,5	3,0
	45°C	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-

A melhor produção da enzima ocorreu na temperatura de 37 °C, onde as amostras UCP 1009 e 1022 apresentaram a formação de halos característicos da enzima após 48 h de ensaio, porém os melhores resultados foram obtidos com a amostra UCP 1020

que apresentou uma atividade crescente da atividade proteolítica em meio sólido, apresentando com 96 h a formação de um halo de 3,5 cm.

Riffel *et al.*, (2003) descreveram que a atividade proteolítica dos micro-organismos pode ser confirmada através de ensaios em meios sólidos, onde a formação do halo característico indica a produção da enzima estudada, e quanto maior o tamanho do halo formado, possivelmente será proporcional a atividade enzimática estudada.

Soares *et al.*, (2001) relataram um estudo da produção de protease em diferentes temperaturas, e verificaram que os maiores níveis de enzima foram encontrados numa faixa de temperatura entre 37 °C e 40°C.

Quando a temperatura foi aumentada para 45 °C, uma considerável redução na produção de enzima foi observada, possivelmente devido à desnaturação da protease pela temperatura.

3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES MEIOS DE PRODUÇÃO

Após o processo de seleção da melhor amostra produtora de protease em meio sólido, onde a amostra UCP 1020 foi selecionada, foram realizados ensaios para a produção de protease através de fermentação submersa utilizando 3 diferentes meios. A FIG. 1 descreve o crescimento microbiano do *Bacillus licheniformis* UCP 1020.

Verifica-se que houve crescimento celular nos 3 meios testados durante as 72 h de ensaio de produção, porém o meio 3 apresentou um crescimento mais uniforme que os outros 2 meios de produção testados. Observa-se que a fase estacionária foi mais acentuada no meio 3, e muito curta no meio 1.

Nascimento, Martins (2006) relataram que micro-organismos do gênero *Bacillus*, produzem maior quantidade de enzimas microbianas, como as proteases, principalmente ao final da fase exponencial de crescimento. Chauhan e Gupta (2004) também obtiveram maior produção de protease na fase estacionária de crescimento do micro-organismo quando trabalharam com *Bacillus sp.* RGR-14.

Ladeira *et al.*, (2010) descreveram que ocorre o crescimento *Bacillus sp.* logo após a sua inoculação, porém a secreção da enzima, só acontece após 6h crescimento microbiano. Subsequentemente, a fase exponencial de crescimento foi visível durante as primeiras 15 h do processo fermentativo.

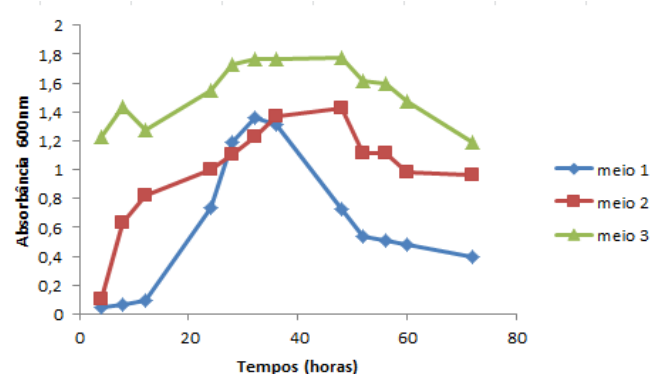


Figura 1 – Crescimento microbiano nos 3 diferentes meios de produção durante 72 horas, 150 rpm, 37 °C.

3.2 PRODUÇÃO DE PROTEASE

A atividade da protease foi avaliada em todas as amostras coletadas durante o processo fermentativo. A FIG. 2 mostra o comportamento da produção da enzima nos 3 diferentes meios testados.

Verifica-se que houve produção de protease nos 3 meios testados durante o período de 72 h. Destacando-se o meio denominado de 3, no qual se verifica uma maior produção de protease em 32 h, apresentando um valor de 30,45 U L⁻¹.

A atividade máxima da enzima ($30,45 \text{ U L}^{-1}$) foi obtida após 32 h de fermentação, onde se observa que o crescimento do micro-organismo já havia cessado, e a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento.

A atividade obtida da protease nos ensaios realizados, foi considerada superior à obtida por Soares *et al.*, (2001) que trabalharam com a cultura de *Bacillus subtilis* no mesmo meio testado, produzindo uma atividade máxima em fermentação submersa de 12 U mL^{-1} , e próximo aos valores obtidos por Alves (2012) que alcançou uma atividade de 41 U mL^{-1} trabalhando com culturas de *Bacillus licheniformis*.

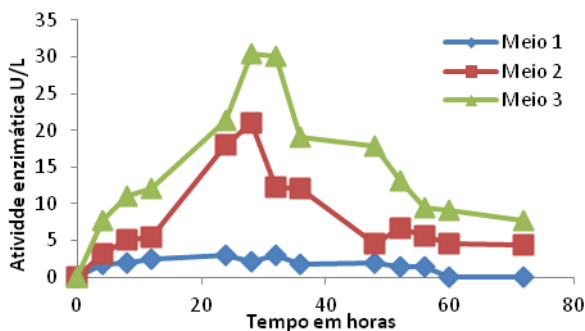


Figura 2 – Produção de protease pela amostra de *Bacillus licheniformis* UCP 1020 através de fermentação submersa em 3 diferentes meios testados, durante 72 h, 150 rpm.

Verifica-se também que o pico de produção enzimático ocorreu na metade da fase exponencial, observando-se subsequentemente, um rápido processo de desativação, devido provavelmente ao aparecimento de alguma outra protease produzida no meio e/ou à alcalinização do meio de cultivo, conforme relatado por Chu *et al.*, (1992).

Sankaralingam *et al.*, (2001) produziram protease por *Shigella sp.* em meio basal e obtiveram uma atividade enzimática de $18,8 \text{ U mL}^{-1}$.

3.3 DETERMINAÇÃO DO PH

Nos ensaios realizados observa-se que houve um comportamento uniforme na variação do pH nos 3 diferentes meios testados. Na FIG. 3 encontram-se representados os valores de pH.

O comportamento do pH de ambos os meios testados oscilou de forma gradativa, permanecendo as primeiras 8 h de processo fermentativo na faixa neutra. Observa-se que o meio 2 apresentou o maior valor de pH final obtido, que foi de 9,5, enquanto que os meios 1 e 3, apresentaram valores de 8,65 e 8,72, respectivamente.

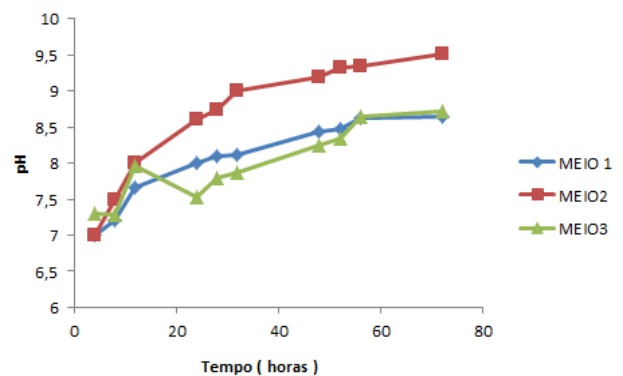


Figura 3 – Variação de pH na produção de protease através da amostra de *Bacillus licheniformis* UCP 1020 através de fermentação submersa utilizando diferentes meios.

Sookkheo, *et al.*, (2000) obtiveram valores de pH ótimos na faixa de 7,0 - 8,5. Kim, *et al.*, (2002) obtiveram para protease produzida por *Bacillus stearothermophilus*, valor de pH ótimo igual a 7,5.

Lima (2009) e Ferro (2002) descreveram que o efeito do pH na velocidade das reações enzimáticas pode ser devido às constantes alterações de estabilidade da enzima, da afinidade da enzima pelo substrato e da transformação catalítica existente. Esses três fatores podem atuar de maneira isolada ou combinada, dependendo da situação em estudo. Entretanto, deve-

se levar em consideração que pH muito elevado pode diminuir a estabilidade da enzima produzida.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

Os valores obtidos na determinação das proteínas totais estão descritos na FIG. 4.

Verifica-se que nas amostras coletadas no meio 3, foi observada uma maior concentração de proteínas totais existentes, apresentando um valor de 1,107 mg mL⁻¹, no período de 32 horas de fermentação.

Gupta *et al.* (2002) descrevem que a atividade das proteases produzidas por *Bacillus sp* após 12 horas de fermentação, obtiveram uma atividade de 42 U mg⁻¹ de proteína, porém o seu pico máximo foi atingido após 18 horas (47 U mg⁻¹ proteína) e, a partir daí, começou o processo de redução da atividade proteolítica. Verifica-se que a produção de enzimas proteolíticas está ligada diretamente a uma cultura metabolicamente ativa.

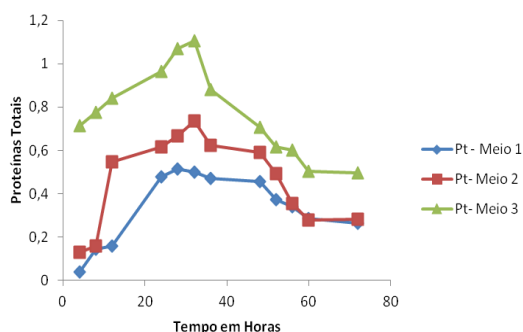


Figura 4 – Determinação das proteínas totais em diferentes meios de produção de protease por *Bacillus licheniformes*, durante 72 horas, 150 rpm, 37 °C.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de novas amostras de micro-organismos para produção de enzimas microbianas tem aumentado muito nas últimas décadas, pois a biodiversidade microbiana tem sido muito estudada, pois são inúmeros os micro-organismos isolados de ambientes diversos que possuem habilidades biotecnológicas muitas vezes desconhecidas.

As proteases são enzimas que apresentam muitas aplicações nas diferentes áreas industriais e ambientais existentes, sendo uma das enzimas microbianas mais produzidas nas últimas décadas.

A habilidade da amostra *Bacillus licheniformis* UCP 1020 isolada do Porto da cidade do Recife, revela o potencial biotecnológico existente em micro-organismos que habitam ambientes pouco estudados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L., DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AZMI, A. S. *et al.* Scaling-Up Recombinant Enzyme Fermentation. In: **Recombinant Enzymes-From**

Basic Science to Commercialization. Springer International Publishing, 2015. p. 99-113.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye**

binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R.; **Process Biochem**, v. 39, p. 21-15, 2004.

CHU, I.M.; LEE C.; LI, T.S.. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 755-761, 1992.

ERICKSON, B. *et al.* Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 2, p. 176-185, 2012.

FERRO, L.A. **Produção, purificação e caracterização da enzima B-1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 175p. 2002.

GOPINATH, S.C.B *et al.* Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. **BioMed Research International**, 2015.

GORDEEVA, Y. L., IVASHKIN, Y. A., GORDEEV, L. S. Modeling the continuous biotechnological process of lactic acid production. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, v. 46, n. 3, p. 279-283, 2012.

GUPTA, R., BEG, Q., LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HADDAR, A. *et al.* Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone, **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 246-251, 2010.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. **The use of solid media for detection of enzymes production by fungi**. **Mycologia**, v.67, p.597 – 607, 1979.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOONDAL, G. *et al.* Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

KIM, Y. K. *et al.* Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearthermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 82, p.157-164, 2002.

KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

LADEIRA, S. A. *et al.* Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp in submerged fermentation: optimization of the culture medium using an experimental design approach. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LILAO, J., MATEO, J. J., MAICAS, S. Biotechnological activities from yeasts isolated from olive oil mills. **European Food Research and Technology**, p. 1-9, 2014.

LIMA, C.A. *et al.* Production of a collagenase from *Candida albicans* URM362. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 315-320, 2009.

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 Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LOISEAU, C. *et al.* Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-11, 2015.

MAURER, K.H. Detergent proteases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330-334, 2004.

NASCIMENTO, W,C A., MARTINS M,L,L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**. v. 26, p. 582-588, 2006.

NIYONZIMA, F. N., MORE, S. Detergent-Compatible Proteases: Microbial Production, Properties, and Stain Removal Analysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 233-258, 2015.

PAREKH, S., VINCI, V. A., STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 287-301, 2000.

PILLAI, P.; MANDGE, S.; ARCHANA, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13, **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1110-1117, 2011.

- RADHA, S. *et al.* Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. **Arch Appl Sci Res**, v. 3, p. 155-163, 2011.
- RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAVI, M. *et al.* Studies on the potent protease producing bacteria from soil samples. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 1, p. 983-988, 2015.
- RIFFEL, A *et al.* Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003.
- RODARTE, M. P. *et al.* Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.
- SABOTIČ, J., KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351-1375, 2012.
- SANDHYA, C. *et al.* Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.
- SANKARALINGAM, S. *et al.* Optimization of Culture Conditions for the Production of an Extracellular Protease from *Shigella* sp. **Advances in Bioresearch**, v. 2, p. 92 – 102, 2001.
- SAUER, M. *et al.* Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100-108, 2008.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.
- SOARES, V.F. *et al.* High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. In: **Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 311-319, 2005.
- SOETAERT, W.; VANDAMME, E. The impact of industrial biotechnology. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 7-8, p. 756-769, 2006.
- SOOKKHEO, B. *et al.* Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Protein Expression and Purification**, v. 20, p. 142-151, 2000.
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C., PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.
- TYO, K.EJ; KOCHARIN, K.; NIELSEN, J. **Toward design-based engineering of industrial microbes. Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 255-262, 2010.
- VAN DIJL, J. M., HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microb Cell Fact**, v. 12, n. 3, 2013.
- ZAFERANLOO, B. *et al.* Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-1762, 2014.