

# Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico

## Optimization of a culture medium for protease production by *Bacillus* sp. thermophilic

Wellington Cristina Almeida do NASCIMENTO<sup>1</sup>, Camila Rocha da SILVA<sup>1</sup>,  
Raquel Vieira de CARVALHO<sup>1</sup>, Meire Lelis Leal MARTINS<sup>1\*</sup>

### Resumo

*Bacillus* sp. SMIA-2 cresceu e secretou proteases quando cultivado em culturas líquidas contendo citrato trissódico como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. A atividade máxima da enzima foi alcançada após 8 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 7,2 U.mg<sup>-1</sup> proteína. A suplementação do meio com 2,0 mM de CaCl<sub>2</sub> não proporcionou um aumento da atividade da protease, porém aumentou a sua estabilidade de 2 para 4 horas. A redução da concentração do fosfato de potássio no meio de cultura de 11,0 para 5,0 mM promoveu um acréscimo de 82% (13 U.mg<sup>-1</sup> proteína) na atividade da protease. A substituição do nitrato de amônio presente no meio de cultura por 0,1% de soro de queijo aumentou a atividade da protease para 25 U.mg<sup>-1</sup> proteína. Nestas condições, o tempo requerido para que a enzima atingisse seu pico de atividade máxima, que antes era de 9 horas, passou para 16 horas. A substituição do citrato trissódico do meio de cultura pela água de maceração de milho (0,5%) não só aumentou a atividade da enzima como também retardou o processo de desativação que é típico da produção de proteases. A atividade máxima da enzima obtida quando estes dois resíduos foram utilizados no meio foi 59,5 U.mg<sup>-1</sup> proteína. Após alcançar este valor a enzima se manteve estável por mais de 20 horas o que favorece a sua produção em larga escala.

**Palavras-chave:** proteases; *Bacillus* sp.; água de maceração de milho; soro de queijo.

### Abstract

*Bacillus* sp. SMIA-2 grew and produced proteases when cultivated in liquid cultures containing trisodium citrate as a carbon source and ammonium nitrate as a nitrogen source. The maximum activity of the enzyme was reached after incubating the microorganism for 9 hours, with levels of 7.2 U.mg<sup>-1</sup> protein. The supplementation of the medium with 2.0 mM of CaCl<sub>2</sub> did not improve the activity of the protease, but increased its stability from 2 to 4 hours. The reduction in the amount of inorganic phosphate in the medium from 11.0 to 5.0 mM resulted in an improvement of 82% (13 U.mg<sup>-1</sup> protein) in the protease activity. Replacing ammonium nitrate in the medium by 0.1% milk whey increased the protease activity to 25 U.mg<sup>-1</sup> protein. In these conditions, the time required for the enzyme to reach a maximum activity increased from 9 to 16 hours. Replacing citrate trisodium in the medium by corn steep liquor (0.5%) not only produced much better enzyme activity, but also delayed the deactivation process which is typical for the production of proteases. The maximum activity reached when these wastes were used in the medium was 59.5 U.mg<sup>-1</sup> protein. In addition, the enzyme maintained stable for more than 20 hours, which is favorable for its production on a large scale.

**Keywords:** proteases; *Bacillus* sp.; corn steep liquor; cheese whey.

## 1 Introdução

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais<sup>27</sup> representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo<sup>3</sup>. As proteases termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas industrialmente e representam cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo<sup>4,5</sup>.

As proteases microbianas têm sua aplicação predominante nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes<sup>10,13,15,22</sup>.

Alguns microrganismos produzem uma quantidade baixa de enzimas dificultando sua aplicação industrial, porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático<sup>16</sup>.

A produção industrial de enzimas é freqüentemente 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, portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos produtivos<sup>12</sup>.

O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção<sup>6</sup>. Dentre estes resíduos incluem-se o soro de queijo<sup>28</sup> e a água de maceração de milho<sup>14</sup>.

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de queijo foi realizada por diversos pesquisadores<sup>8,15,25</sup>, que observaram um aumento da produtividade enzimática com o uso deste resíduo como substrato. A água de maceração de milho (*Corn steep liquor*), um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais vitaminas e fosfato<sup>23</sup>, foi também utilizada por vários autores para reduzir o custo do meio de cultura utilizado para a produção de enzimas por microrganismos<sup>7,14,16,17</sup>.

Recebido para publicação em 27/9/2005

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001868)

<sup>1</sup> Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias,  
Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF,  
Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620,  
Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil,  
E-mail: meire@uenf.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada

Recentemente, uma bactéria termofílica capaz de produzir proteases extracelulares foi isolada por NUNES e MARTINS<sup>20</sup> a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes - RJ. Esta bactéria foi caracterizada fisiológica e bioquimicamente através da taxonomia clássica convencional e também através da análise filogenética de seqüências parciais de DNA ribossomal 16S (rDNA 16 S). De acordo com os resultados desta análise, o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1, sendo denominado *Bacillus* sp. cepa SMIA-2. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de proteases por este microrganismo, utilizando um meio de cultura de baixo custo, contendo os resíduos água de maceração de milho e soro de queijo.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Microrganismo e condições da cultura

O microrganismo utilizado neste estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada do solo<sup>20</sup>.

Para a produção da protease foi utilizado, inicialmente o seguinte meio de cultura (g/L de água destilada): citrato trissódico 10; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10; peptona 1; KCl 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0; CaCl<sub>2</sub> 2,2 x 10<sup>-3</sup>; ZnO 2,0 x 10<sup>-3</sup>; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,7 x 10<sup>-2</sup>; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,0 x 10<sup>-2</sup>; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 8,5 x 10<sup>-5</sup>; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,4 x 10<sup>-3</sup>; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,5 x 10<sup>-4</sup> e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3,0 x 10<sup>-4</sup><sup>20</sup>. Posteriormente, as seguintes modificações foram realizadas no meio de cultura: 1) aumento da concentração do CaCl<sub>2</sub> para 2,0 mM; 2) redução da concentração do K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para 5,0 mM; 3) substituição do nitrato de amônio do meio de cultura por 0,1% de soro de queijo (70% proteína, 15% lactose, 2% gordura, 10% sais minerais e 3% umidade); e 4) substituição do citrato trissódico do meio de cultura por 0,5% de água de maceração de milho (*Corn steep liquor* - Sigma-Aldrich).

Com o pH ajustado para 7,5 com solução de NaOH 1,0 M, os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Os meios foram inoculados com 1 mL de uma cultura de véspera e incubados em um agitador Thermo Forma Orbital Shaker (Ohio, USA) a 150 rpm em temperatura de 50 °C por 60 horas. Os experimentos foram realizados com três repetições, sendo cada uma delas constituída por 50 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL. A intervalos de tempo determinados foram retirados frascos para medida da densidade ótica a 600 nm, com a utilização de um espectrofotômetro Hitachi modelo UVmini -1240 (Kyoto, Japão), pH e dosagem da atividade da enzima nos filtrados da cultura.

### 2.2 Ensaio enzimático

Para a remoção das células, o meio de cultura foi centrifugado a 15.500 g por 15 minutos a 4 °C em uma centrífuga modelo Hermle Z 382K (Wehingen, Alemanha) e o sobrenadante livre de células, utilizado para dosagem da atividade da enzima.

A atividade enzimática foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15%. O substrato utilizado para essa determinação foi

uma solução de azocaseína 0,2% (p.v<sup>-1</sup>) preparada em tampão TRIS/HCl (pH 8,5). Adicionou-se 0,5 mL de extrato enzimático em 1,0 mL do substrato que foi incubado em banho-maria a 70 °C por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA e a solução centrifugada a 20.600 g por 5 minutos a 4 °C (Hermle Z 382K, Wehingen, Alemanha). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que a adição do TCA se deu antes do extrato enzimático<sup>11</sup>.

Uma unidade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

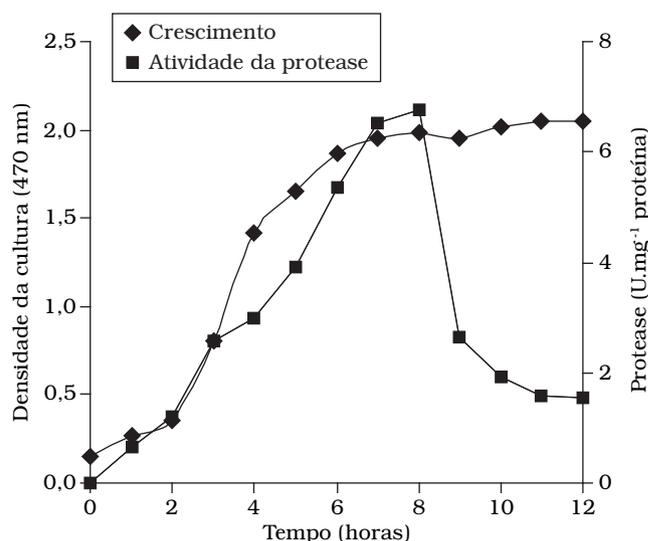
A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por PETERSON<sup>21</sup>.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Perfil do crescimento do microrganismo e da atividade proteásica

O perfil do crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e da atividade da protease em função do tempo de fermentação foram observados em meio líquido contendo 1% de citrato trissódico como fonte de carbono e 1% de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Figura 1). O crescimento foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura. Entretanto, a secreção da protease foi iniciada somente após 5 horas de crescimento. De acordo com SINGH, VOHRA e SAHOO<sup>27</sup>, possivelmente isto se deve ao requerimento de uma massa mínima de células, para iniciar a síntese da protease.

O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período de tempo relativamente curto, em torno de 5 horas, iniciando-se após 2 horas de incubação com finalização após 7 horas. A partir deste tempo, a velocidade do crescimento foi reduzida e a cultura entrou na fase estacionária.



**Figura 1.** Crescimento e atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50 °C em meio de cultura contendo 1% de citrato trissódico como fonte de carbono e 1% de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

A produção enzimática aumentou no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. A atividade máxima da protease foi alcançada após 8 horas de incubação do microrganismo, com níveis de  $7,2 \text{ U.mg}^{-1}$  proteína, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da protease foi reduzida, o que sugere que a produção da enzima está associada ao crescimento e que foi produzida quando a cultura estava metabolicamente ativa.

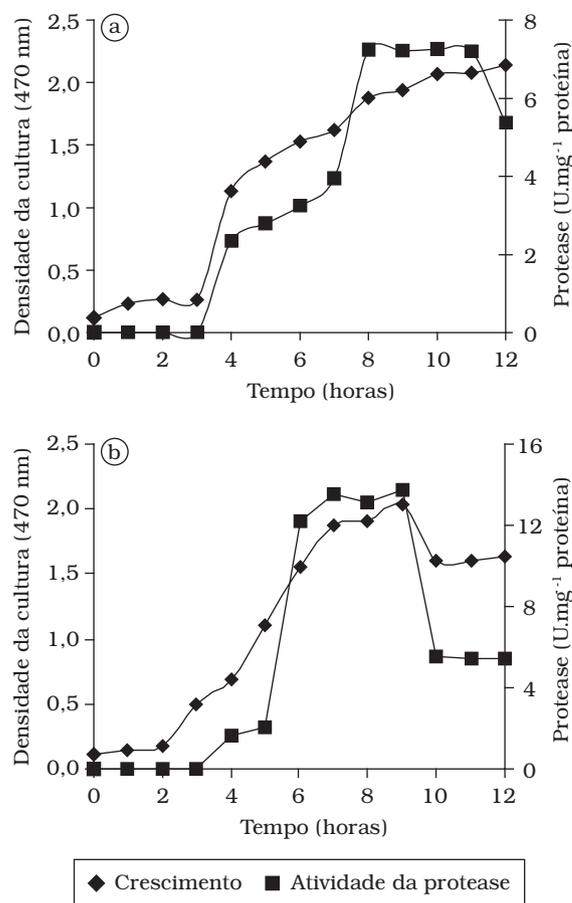
De acordo com WARD<sup>30</sup>, os microrganismos do gênero *Bacillus* geralmente produzem maior quantidade de protease ao final da fase exponencial de crescimento. A função destas enzimas ainda não é bem conhecida, mas sua produção está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação. Uma vez que a síntese de proteases está intimamente ligada ao processo de esporulação, fatores que afetam a esporulação como condições de estresse, seja pela redução da concentração de nutrientes, tensão de oxigênio ou composição do meio, podem ter um profundo efeito na produção destas enzimas<sup>19</sup>.

Após alcançar o valor máximo, a protease sofreu um rápido processo de desativação, o que torna difícil a sua produção em larga escala, devido à dificuldade de se isolá-la em sua atividade máxima. Portanto, foi necessário identificar caminhos que aumentassem a estabilidade da enzima sem, contudo, prejudicar o crescimento do microrganismo.

### 3.2 Influência do $\text{K}_2\text{HPO}_4$ e do $\text{CaCl}_2$ sobre o crescimento e atividade da protease

O íon cálcio possui importante efeito estabilizador de proteases, como já demonstrado previamente por muitos pesquisadores<sup>1,2,9</sup>. Neste sentido, a suplementação do meio de crescimento com  $2,0 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 2) não proporcionou um aumento da atividade da protease, porém levou ao aumento da sua estabilidade de 2 para 4 horas. Posteriormente, a concentração do fosfato de potássio no meio de cultura foi reduzida de  $11,0$  para  $2,0 \text{ mM}$ , promovendo um acréscimo de  $82\%$  na atividade da protease, que era inicialmente de  $7,2$  e passou para  $13,1 \text{ U.mL}^{-1}$ . Além disso, a enzima manteve-se estável por um período de 4 horas, o que é de grande importância para a sua produção em larga escala. Esses resultados são similares àqueles encontrados por JANSSEN, PEEK e MORGAN<sup>11</sup> que mostraram que a remoção de agentes quelantes, a substituição de fosfato inorgânico por  $\beta$ -glicerolfosfato de sódio e o aumento da concentração de cálcio no meio de crescimento, aumentou a atividade da protease produzida por *Thermus* sp. Rt41A. De acordo com estes autores, o aumento na atividade da protease se deve ao aumento de cálcio disponível para o crescimento microbiano.

De acordo com KUMAR e TAKAGI<sup>16</sup>, o fosfato de potássio tem sido muito utilizado nos meios de cultura devido à sua capacidade tamponante. Porém, elevadas concentrações deste componente podem ocasionar uma precipitação do meio de cultura durante o processo de esterilização em autoclave,



**Figura 2.** Crescimento e atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a  $50^\circ\text{C}$  em meio de cultura contendo 1% de citrato trissódico como fonte de carbono, 1% de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e suplementado com a)  $2 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ ; e b)  $5 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $2 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ .

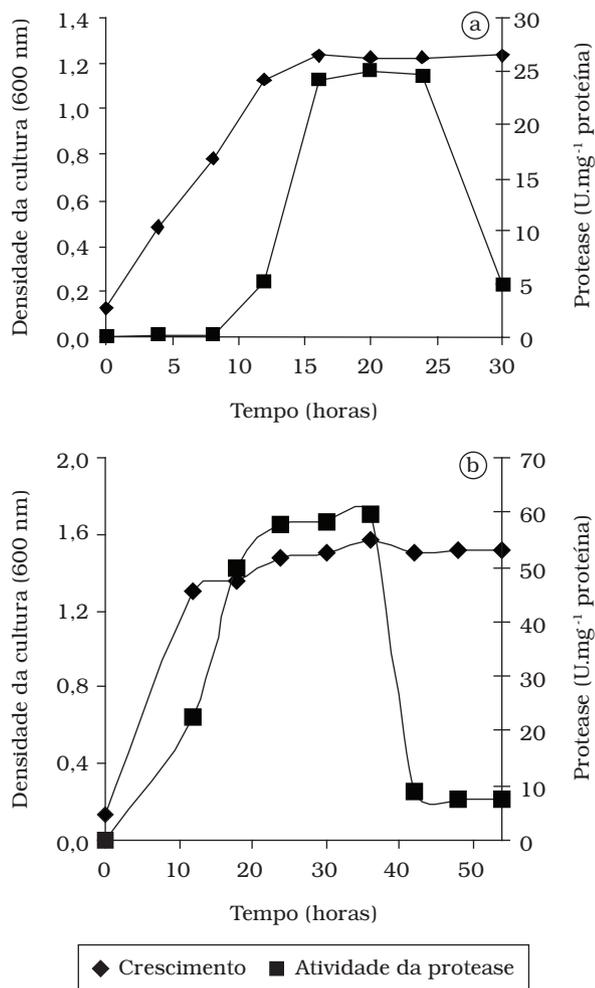
reduzindo as concentrações de metais disponíveis para o crescimento do microrganismo.

O cálcio solúvel, como o cloreto de cálcio e acetato de cálcio, é precipitado quando uma elevada concentração de fosfato é utilizada no meio de fermentação e assim os produtos de síntese, como as enzimas, são altamente inibidos por este composto<sup>24</sup>.

### 3.3 Utilização do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases

Atualmente, resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substratos para a produção de várias enzimas devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial<sup>6,8,29</sup>. Neste sentido, foi avaliada a atividade da protease secretada pelo microrganismo em estudo, quando cultivado em um meio contendo soro de queijo e água de maceração de milho. A substituição do nitrato de amônio presente no meio de cultura por  $0,1\%$  de soro de queijo levou a enzima a apresentar uma atividade máxima de  $25 \text{ U.mg}^{-1}$  proteína (Figura 3), o que correspondeu a um aumento de cerca de três vezes na atividade da protease. En-

tretanto, o tempo requerido para que a enzima atingisse seu pico de atividade máxima, que antes era de 9 horas, passou para 16 horas.



**Figura 3.** Crescimento e atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo 1% de citrato trissódico, a) 0,1% de soro de leite, 0,5% água de maceração de milho; e b) 0,1% soro de queijo.

A alteração no meio de cultura, substituindo-se o citrato trissódico pela água de maceração de milho (0,5%), não só levou ao aumento surpreendente da atividade da enzima, como também retardou o processo de desativação que é típico da produção de proteases. A atividade máxima da enzima obtida nestas condições foi de 59,5 U.mg<sup>-1</sup> proteína. Após alcançar este valor, a enzima se manteve estável por mais de 20 horas, o que favorece a sua produção em larga escala.

Meios de cultura ricos em proteínas, como aqueles contendo o soro de leite, possuem indutores que levam à produção de proteases, o que justifica as grandes quantidades desta enzima produzidas utilizando-se o soro de queijo, um resíduo comum das indústrias de laticínios<sup>25</sup>. Assim, conclui-se que a utilização do soro de queijo, além de contribuir para a redução de poluen-

tes ambientais, favorece também a redução dos custos do meio de cultura utilizados para a produção das proteases.

De acordo com MAURER<sup>18</sup>, o meio de cultura utilizado para a fermentação industrial contribui muito no custo de produção de enzimas em larga escala, devido à utilização de grandes volumes, sendo necessário aliar elevada produtividade enzimática com os custos das fontes de carbono e de nitrogênio, para que a produção seja mais viável.

#### 4 Conclusões

A redução de 11,0 para 5,0 mM da concentração de fosfato de potássio no meio de cultura promoveu um acréscimo de 82% na atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2.

A substituição do nitrato de amônio e do citrato trissódico presentes no meio de cultura pelo soro de queijo e água de maceração de milho, respectivamente, proporcionou um aumento da atividade da protease e retardou o processo de desativação que é típico da produção desta enzima. Portanto, os resíduos, soro de queijo e água de maceração de milho podem ser utilizados como uma fonte alternativa de baixo valor comercial para a produção de proteases extracelulares por *Bacillus* sp. SMIA-2.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Rio de Janeiro) pelo apoio financeiro e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de uma bolsa de doutorado.

#### Referências bibliográficas

1. AZEREDO, L. A. I. et al. Production and partial characterization of Thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technol.**, v. 34, n. 3-4, p. 354-358, 2004.
2. BAKHTIAR, S. et al. Stability Characteristics of a Calcium-Independent Alkaline Protease from *Nesterenkonia* sp. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 32, n. 5, p. 525-531, 2002.
3. BANERJEE, U. C. et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 213-219, 1999.
4. 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.
5. 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.
6. BOCCHINI, D. A. et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.
7. BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Biores. Technol.**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

8. FEIJOO, G. et al. Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp. BOS55. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, n. 1, p. 86-90, 1999.
9. GHORBEL, B.; KAMOUN, A. S.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enz. Microbial Technol.**, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.
10. HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 43, n. 5, p. 735-750, 1999.
11. JANSSEN, P. H.; PEEK, K.; MORGAN, H. W. Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, n. 3, p. 400-406, 1994.
12. JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
13. KANEKAR, P. P. et al. Optimization of Protease Activity of Alkaliphilic Bacteria Isolated From an Alkaline Lake in India. **Biores. Technol.**, v. 85, n. 1, p. 87-93, 2002.
14. KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Biores. Technol.**, v. 78, n. 2, p. 123-126, 2001.
15. KOSIKOWSKI, F. V. Our Industry Today. **J. Dairy Sci.**, v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.
16. KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Advances**, v. 17, n. 5, p. 561-594, 1999.
17. LEE, P. C. et al. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 63-67, 2003.
18. MAURER, K. H. Detergents proteases. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 15, n. 3, p. 330-334, 2004.
19. MING CHU, I.; LEE, C.; LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 14, n. 9, p. 755-761, 1992.
20. NUNES, A. S.; MARTINS, M. L. L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 271-275, 2001.
21. PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochem.**, v. 83, n. 4, p. 346-356, 1977.
22. PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 15, n. 1, p. 72-76, 1993.
23. RIVAS, B. et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, n. 1, p. 93-98, 2004.
24. RINKER, K. D. et al. Cultivation of hiperthermophilic and Extremely Thermoacidophilic Microorganisms. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999. 830 p.
25. ROMERO, F. J. et al. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. **Process Biochem.**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.
26. SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, C. R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochem.**, v. 36, n. 8-9, p. 781-785, 2001.
27. SINGH, J.; VOHRA, R. M.; SAHOO, D. K. Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochem.**, v. 39, n. 9, p. 1093-1101, 2003.
28. SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Biores. Technol.**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.
29. TAVARES, V. B. et al. Utilização do Resíduo Líquido de Indústria de Processamento de Suco de Laranja Como Meio de Cultura de *Penicillium citrinum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.
30. WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: BLANC, H. W.; DREW, S.; WANG, D. (eds). **Comprehensive Biotechnology**. v. 3, Oxford, UK: Pergamon Press, 1985. 818 p.