

Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite

Evaluation of bacitracin production at different temperatures by Bacillus licheniformis (UCP 1016) using alternative media containing milk serum

Amanda Emanuelle Sales

Bolsista de Iniciação Científica – CNPq, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas Universidade Católica de Pernambuco. Recife – Pernambuco [Brasil] amanda_mandau@hotmail.com

Galba Maria de Campos Takaki

Professor Adjunto III – Doutor em Microbiologia, Cursos de Engenharia Ambiental e Engenharia Química – Centro de Ciências e Tecnologia/ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB – Universidade Católica de Pernambuco. Recife – Pernambuco [Brasil] takaki@unicap.br

Carlos Alberto Alves da Silva

Professor Adjunto II – Doutor em Biotecnologia – Cursos de Engenharia Ambiental e Engenharia Química – Centro de Ciências e Tecnologia/ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco. Recife – Pernambuco [Brasil] calves@unicap.br

Resumo

A bacitracina é um antibiótico poliênico produzido por diversas espécies de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*. O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijos, que apresenta um alto valor nutritivo, embora seja considerado um poluente extremamente problemático, devido à sua elevada carga orgânica e seu excedente volume gerado. Realizaram-se estudos para elaboração de meios alternativos para produção de bacitracina, utilizando soro de leite em substituição ao ácido glutâmico – usado na composição original desse antibiótico –, e adição de diferentes concentrações de glicose nas temperaturas de 28 °C e 37 °C. A detecção do antibiótico foi realizada pelo método biológico, através da formação de halos característicos. Os resultados demonstraram que a bacitracina produzida na concentração de 10 g de glicose a 37 °C, obteve o maior halo de inibição (16 mm). A reutilização do soro de leite em meios de produção de bacitracina surge como nova alternativa para evitar o descarte desse rejeito no meio ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus licheniformis*. Produção bacitracina. Soro de leite.

Abstract

Bacitracin is a polyenic antibiotic produced by several species of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*. The milk serum is a by-product of the production of cheese, which has a high nutritional value, although it is considered an extremely troublesome pollutant due to its high organic load and volume generated. Studies were undertaken to draw up alternative means for production of bacitracin, using milk serum in substitution of glutamic acid – used in the original composition of the production, and adding different concentrations of glucose in temperatures of 28 °C and 37 °C. The detection of the antibiotic was carried out by biological method of formation of characteristic halos. The results showed that bacitracin produced at a concentration of 10 g of glucose at 37 °C had the highest inhibition zone (16 mm). The reuse of milk serum in the production of bacitracin appears as a new alternative to avoid the disposal of waste in the environment.

Key words: *Bacillus licheniformis*. Bacitracin production. Milk serum.



1 Introdução

Os micro-organismos desempenham um papel vital nos diversos ciclos e processos biotecnológicos existentes, sendo importantes bioindicadores de diversos ambientes, por meio da sua participação nos ciclos biogeoquímicos, em que podem participar de um ou mais ciclos existentes na natureza (CHANTAWANNAKUL et al., 2002; MADSEN, 2011; TORSVIK, ØVREÅS, 2002; DEMAÏN, 1999).

O gênero *Bacillus* se destaca por estar bem distribuído na natureza, sendo encontrado principalmente no solo e como participante da biota intestinal humana e animal (CONNOR et al., 2010; FENG et al., 2001; MANNANOV, SATTAROVA, 2001). Esse grupo de bactérias apresenta características fisiológicas e bioquímicas muito variadas, sendo encontradas diversas espécies produtoras de metabólitos biologicamente ativos com importância industrial e agrícola; e também espécies patogênicas produtoras de toxinas (ALI et al., 2010; BABALOLA, 2010; BRUSSAARD et al., 2007; CLAUS, 2003; GUPTA et al., 2003; JAEGER, EGGERT, 2002; PARK et al., 2008; RAO et al., 1998; SHARMA et al., 2003; SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002; SWAIN, RAY, 2009; XIONG et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Muitas espécies de importância industrial se destacam na produção de alimentos e antibióticos. Nesse gênero, encontram-se espécies que produzem uma grande quantidade de substâncias com ação antimicrobiana, incluindo diversos antibióticos (PAIK et al., 1997; SCHALLMEY et al., 2004; SIRTORI et al., 2006; TODOROVA, KOZHUHAROVA, 2010).

A maioria dos antibióticos produzidos pelo gênero *Bacillus* são classificados quimicamente como polipeptídeos de baixo peso molecular, sendo sintetizados por diferentes mecanismos ribossômicos e não ribossômicos (MING, EPPERSON, 2002; SCHALLMEY et al., 2004; SIN, WRONG,

2003). O *Bacillus licheniformis* é caracterizado por produzir peptídeos antimicrobianos com atividade contra diversos micro-organismos patogênicos ou deteriorantes (CLADERA-OLIVEIRA et al., 2004). Outros micro-organismos da mesma espécie isolados de solo apresentam a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos com amplo espectro de atividade frente a bactérias gram-positivas e espécies patogênicas de fungos, com exceção de bactérias gram-negativas (HE et al., 2006; MARTIRANI et al., 2002).

A bacitracina é um antibiótico constituído por um grupo de diversos polipeptídeos, produzidos por *Bacillus licheniformis* ou *B. subtilis*. Caracteriza-se por apresentar um efeito sobre bactérias, em que seu mecanismo de ação consiste na interferência da biossíntese da parede celular bacteriana. Quimicamente é identificada como uma estrutura com anéis heptapeptídicos ligados a cadeias pentapeptídicas (DUBIN et al., 2005; SIN, WONG, 2003;).

A utilização de substratos alternativos para confecção de meios de cultura em diversos processos fermentativos tem sido bastante estudada nas últimas décadas, principalmente a reutilização de resíduos agroindustriais, a qual possibilita reduzir os custos de produção, além de minimizar os problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos para fins biotecnológicos (BUZZINI, MARTINI, 2000; PANDEY et al., 2000a; PANDEY et al., 2000b; ASHA POORNA, PREMA, 2006; RAPOSO et al., 2009).

A grande maioria dos trabalhos descritos na literatura cita a glicose e a sacarose, como fontes preferenciais de carbono para a produção de enzimas, de antibióticos e da maior parte dos bioprodutos de interesse industrial; entretanto, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, visando, sobretudo, o aproveitamento de resíduos industriais e a diminuição nos custos de produção. O soro de leite, resultante da fabricação

de queijos, vem sendo estudado como alternativa na produção de diversos componentes da indústria de alimentos e seus derivados (CALDEIRA et al., 2010; FORNARI, 2006; NITSCHKE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008; PELEGRINE, CARRASQUEIRA, 2008; VALDUGA et al., 2006; ZAVAREZE et al., 2010).

No processo de produção de 1 kg de queijo, 9 kg de soro são gerados. O soro apresenta valores nutricionais que atraem cada vez mais companhias em todo o mundo. Constituído de água, minerais, açúcares e proteínas, sua concentração gera produtos proteicos. Nas décadas de 70 e 80, o soro era considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial, sendo usado apenas na alimentação de animais ou mesmo descartado sob a forma de efluentes líquidos sem qualquer tratamento prévio (WALZEN et al., 2002).

A determinação da quantidade de oxigênio (DBO) do soro é de 30.000-50.000 mg/L, para cada litro de soro descartado nos efluentes, em que aproximadamente 30 g a 50 g de oxigênio dissolvido na água desaparecerão (REDE AMBIENTE, 2007). Além da poluição ambiental, o descarte do soro é também um desperdício de material proteico e outros nutrientes (Tabela 1), uma vez que retém perto de 60% dos nutrientes do leite (ALMEIDA et al., 2001; ANDRADE, 2005; BIASUTTI, 2008; CHERYAN, 1998; SISO, 1996).

Tabela 1: Caracterização físico-química do soro de leite

Características	Valor
Umidade e substâncias voláteis (g/100 g)	93,45
Proteínas (g/100 g)	0,83
Cinzas (g/100 g)	0,57
Lipídios (g/100g)	0,60
Carboidratos (g/100 g)	4,55
DQO (mg O ₂ / L)	64.000
pH	5,0

Fonte: Belo, 2009.

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade de reaproveitamento do soro de leite, em substituição ao ácido glutâmico, na produção de bacitracina por *Bacillus licheniformis*, realizando-se estudos para elaboração de meios alternativos econômicos para produção do antibiótico.

2 Material e métodos

2.1 Micro-organismos

Foram utilizados os seguintes micro-organismos:

- *Bacillus licheniformis* (UCP 1016) – isolado no porto da cidade do Recife e catalogado na Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP).
- *Micrococcus flavus* (UFPEDA 323), gentilmente cedida pelo banco de culturas do Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco, utilizada como micro-organismo teste. As culturas foram mantidas em meio Ágar Nutritivo (AN).

2.2 Soro de leite

Foi utilizado soro de leite coletado em indústrias de laticínios da cidade de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil.

2.3 Meios de cultura

Meio de manutenção:

Agar nutriente (AN): peptona (10,0 g), extrato de carne (3,0 g), NaCl (5,0 g), agar bacteriológico (20 g), água destilada q.s.p 1000 ml, pH 7,0.

Caldo nutritivo: peptona (10,0 g), extrato de carne (3,0 g), NaCl (5,0 g), água destilada q.s.p 1000 ml, pH 7,0.



Meios de produção da bacitracina

Meio de Hendlin: ácido glutâmico (10 g), K_2HPO_4 (0,5 g), K_2PO_4 (0,5 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g); $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g); água destilada q.s.p 1000 mL; pH 7,0.

Meio alternativo contendo soro de leite

K_2HPO_4 (0,5 g), K_2PO_4 (0,5 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g); $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g); soro de leite (1000 mL), pH 7,0.

Foram adicionadas soluções de glicose nas concentrações de 3,0 g, 5,0 g, 8,0 g e 10 g aos meios alternativos. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos. O soro de leite foi esterilizado em vapor fluyente.

2.4 Produção da bacitracina pela substituição do ácido glutâmico pelo soro de leite

Foram realizados crescimentos microbianos utilizando o meio de produção convencional e os meios denominados alternativos à base de soro de leite para a produção de bacitracina, com modificações a partir do meio convencional de produção, pela substituição do ácido glutâmico pelo soro de leite.

Pré-inóculo do *Bacillus licheniformis*

O crescimento foi realizado em *shaker* orbital, utilizando Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio caldo nutritivo, nas temperaturas 28 °C e 37 °C, a 150 rpm, durante aproximadamente 16 horas.

2.5 Cinética de produção

Foram inoculados 10% do pré-inóculo bacteriano nos meios controle e alternativos. O crescimento ocorreu em agitador orbital, a 150 rpm, nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, durante 96 horas. As amostras coletadas durante o processo de ciné-

tica de produção da bacitracina foram submetidas à determinação do pH através de potenciometria, a obtenção da curva de crescimento pela leitura em espectrofotômetro a 600 nm, e a determinação da produção da bacitracina através do teste de difusão em disco.

Determinação da atividade antibiótica

A determinação da atividade antibiótica foi realizada pelo método de difusão em disco (MOTTA, BRANDELLI, 2002). Placas de Petri, contendo 10 mL do meio Mueller Hinton, foram semeadas por espalhamento superficial com suspensões (escala 0,5 de MacFarland) contendo o micro-organismo teste *M. flavus* (UFPEDA 323). Em seguida, foram utilizados discos de papel xarope, previamente esterilizados, medindo 8 mm de diâmetro, embebidos nas amostras que continham líquido metabólico, coletadas durante o processo fermentativo. As amostras coletadas durante as respectivas fermentações do *B. licheniformis* foram filtradas em membranas da marca Millipore com tamanho de poro de 0,22 µm.

Na sequência, as placas foram incubadas por 24 horas, nas temperaturas de 28 °C e 37 °C. O aparecimento de um halo de inibição ao redor dos discos indicou a presença de atividade antibiótica, sendo o diâmetro medido e expresso em milímetros. A não formação de halo de inibição indicava ausência de produção do antibiótico.

3 Resultados e discussão

3.1 Efeito das diferentes concentrações de glicose nos meios

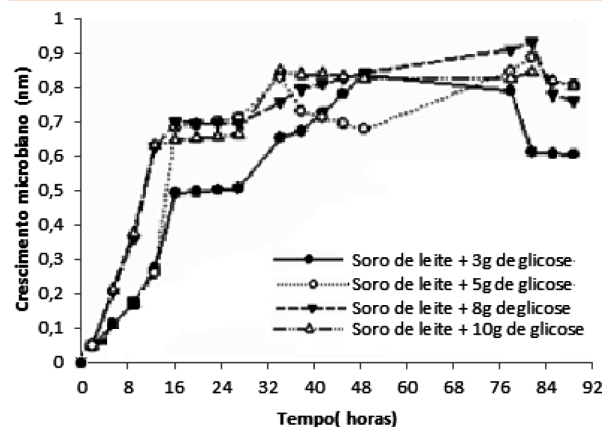
Nas últimas décadas, a produção de inúmeras moléculas bioativas, dentre elas os antibióticos, tem sido uma das áreas de aplicações farmacológicas mais exploradas na biotecnologia.

Azevedo et al. (2004) e Tabbene et al. (2009) descreveram que normalmente a produção de metabólitos secundários é observada em meios que apresentam uma composição diversificada pela presença de inúmeros componentes presentes, sendo capazes de manter um rápido crescimento microbiano, e onde os nutrientes provavelmente podem auxiliar direta, ou mesmo indiretamente, no processo de repressão da formação de enzimas inibidoras da síntese dos diversos compostos formados. A utilização de um resíduo da indústria de laticínios na formulação de um meio de produção da bacitracina, em que diferentes constituintes presentes nos meios de cultura – tais como fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, além de pH, temperatura e estado físico do meio – influenciam diretamente na produção dessas moléculas, aumentando ou mesmo diminuindo a capacidade de assimilação dos nutrientes pelo micro-organismo que está sendo usado.

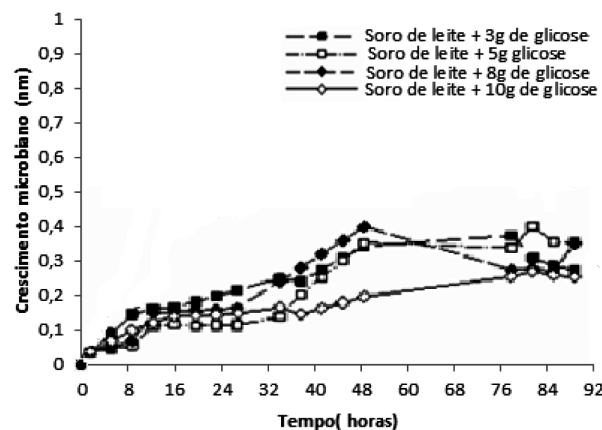
O crescimento do *Bacillus licheniformis* e a atividade antimicrobiana em função do tempo de fermentação foram observados durante 96 horas nos meios controle e alternativos, contendo soro de leite e diferentes concentrações de glicose, nas temperaturas de 28 °C e 37 °C. Os resultados obtidos estão descritos nas Figuras 1A e 1B, e demonstram que a fase de latência do micro-organismo foi considerada curta em ambos os meios testados nas diferentes temperaturas e concentrações de glicose.

A glicose é usualmente uma excelente fonte de carbono para o crescimento bacteriano, interferindo na síntese de muitos metabólitos secundários, entre eles a bacitracina. Em alguns micro-organismos, foi relatado um efeito inibitório da glicose com a redução do pH (AWAIS et al., 2008; TABBENE et al., 2009). Nos estudos realizados, o maior consumo de glicose por *B. licheniformis* para produção de bacitracina ocorreu após 32 horas de crescimento. Em estudos realizados por Xu,

Jia e Liu (2011), buscando uma produção eficiente de acetoina, um aromatizante produzido por *B. licheniformis*, utilizando 100 g/L de glicose, foi observado que a concentração de glicose cai rapidamente depois de 8 horas, chegando a zero após 36 horas de fermentação.



(c)



(b)

Figura 1: Curva de crescimento de *Bacillus licheniformis* nos meios alternativos a base de soro de leite adicionados de glicose em diferentes concentrações, 150 rpm, 96 horas e temperatura de 37 °C (A) e de 28 °C (B)

Verifica-se que a curva referente ao crescimento de *B. licheniformis* na temperatura de 37 °C foi maior em relação aos ensaios realizados a 28 °C. Brussaard et al. (2007) descreveram que a melhor temperatura de produção de bacitracina por *Bacillus subtilis*, isolado do solo e utilizando o glicerol como fonte de carbono, era de 37 °C, considerada ótima para a produção de bacitraci-

na mesmo em diferentes meios de cultivo, entre eles os antimicrobianos peptídicos (KHALIL et al., 2009). Os resultados obtidos nos estudos envolvendo a elaboração de meios alternativos, contendo soro de leite para produção de bacitracina, corroboram os dados descritos na literatura.

A presença de uma fonte de carbono adequada no meio de produção dos metabólitos secundários proporciona um aumento considerável no processo de duplicação celular, favorecendo, além do crescimento, uma maior produção do antibiótico a ser produzido, uma vez que os estágios referentes ao crescimento bacteriano e a produção de bacitracina ocorrem em paralelo em diversos estudos realizados que constataram que a produção da bacitracina pelo *B. licheniformis* pode ocorrer paralelamente durante o crescimento celular e ser favorecida por uma fonte ideal de carbono na composição do meio (AWAIS et al., 2008).

3.2 Estudo da variação do pH na produção da bacitracina

Na Figura 2, estão descritos os ensaios realizados com a variação de pH nos meios modificados. Foi observado um aumento dos valores no início do crescimento microbiano, porém a partir do período em que se detectou a produção de antibiótico, observou-se um decréscimo nos valores obtidos. Nos ensaios realizados a 37 °C, os valores do pH se mantiveram constantes durante o período em que ocorreu a fase estacionária de crescimento, apresentando valores correspondentes a 6,0 e 7,0, que sofreram alterações, variando de 7,0 para 5,0 em um curto intervalo de tempo. Verificou-se que ao término da fase estacionária, foi evidenciada uma acidificação nos meios cultivados a 37 °C.

O pH é um fator físico que tem influência direta no crescimento microbiano, pois assume valores entre 7 e 9, nos quais tal crescimento é considerado excelente, enquanto que, em uma

maior faixa alcalina (9 e 9,5), é considerado de baixo rendimento nos processos fermentativos. O metabolismo microbiano ocorre por meio de reações químicas que consomem ou liberam energia durante todo processo fermentativo (ZELDER, HAVER, 2000). Além disso, em alguns microorganismos, o efeito inibidor da glicose está relacionado com a diminuição dos valores de pH no meio de produção. El-Sersy, Ebrahim e Abou-Elela (2009) descreveram que a produção de bacitracina por *Bacillus subtilis* é dependente diretamente do pH, e, quando existe um efeito inibidor da glicose, é devido aos processos de acidificação que apresenta como resultado um grande acúmulo de ácidos orgânicos, reduzindo assim a formação da bacitracina em maior quantidade no meio de produção testado.

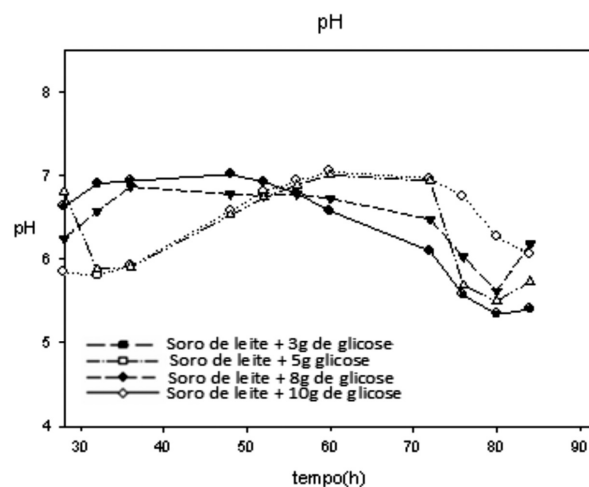


Figura 2: Curvas de variação do pH durante a produção de Bacitracina pelo *Bacillus licheniformis* nos meios alternativos a base de soro de leite com adição de glicose a 3 g, 5 g, 8 g e 10 g, 150 rpm, 96 horas, 37 °C (A) e a 28 °C (B)

3.3 Detecção da produção da bacitracina

Durante todos os ensaios realizados para produção da bacitracina, foram efetuados testes biológicos de difusão em disco, utilizando o *Micrococcus flavus* como micro-organismo pa-

drão. A bacitracina é um antibiótico polipeptídico de atuação contra bactérias Gram-positivas, seu mecanismo de ação consiste na interferência da biossíntese da parede celular bacteriana (SIN, WONG, 2003).

O aparecimento de um halo de inibição ao redor dos discos indica a presença de ati-

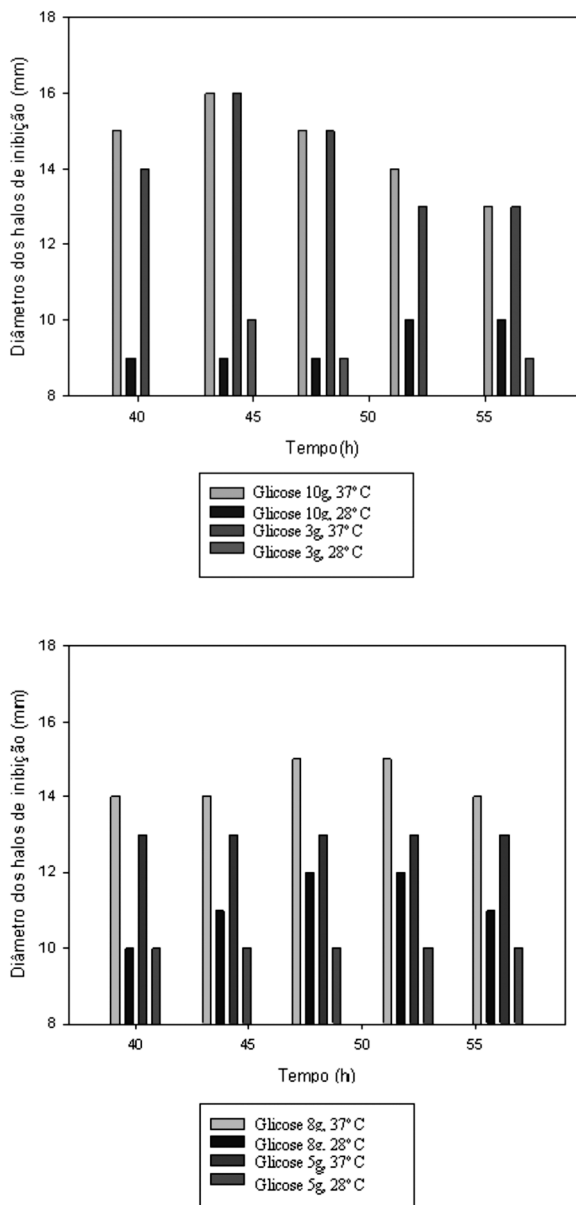


Figura 3: Diâmetro dos halos de inibição (mm) produzidos pelo líquido metabólico das fermentações em meios contendo soro de leite e glicose nas concentrações de 3 g, 5 g, 8 g e 10 g em diferentes temperaturas

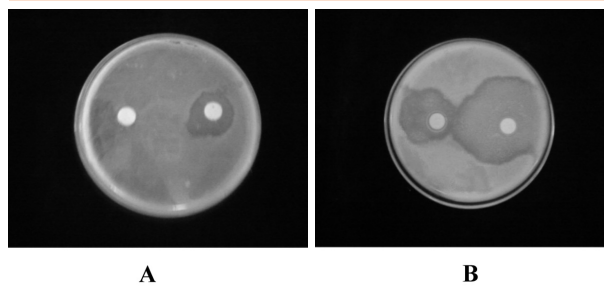


Figura 4: Atividade inibitória do antibiótico produzido nos meios alternativos a base de soro de leite 28 °C (A) e 37 °C (B)

vidade antibiótica, sendo medido o diâmetro e expresso em milímetro. A ausência de halo indica ausência de produção do antibiótico. Pela medição do tamanho dos halos de inibição (Figura 3), foi possível verificar que a produção de bacitracina se apresentou superior nos meios cultivados a 37 ° C. Observa-se na Figura 4 que os maiores valores se encontram nos meios contendo 10 g de glicose, apresentando halos de 13-16 mm; e 8 g de glicose que mostram halos de 14-15 mm.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de bacitracina depende das condições de cultivo empregadas. Diferentes constituintes presentes nos meios de cultura podem influenciar diretamente na produção de moléculas bioativas. Além desses constituintes, o pH e a temperatura podem interferir de forma direta na produção de diversas substâncias biotecnológicas. Em geral, uma boa produção de metabólitos secundários é observada em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, e onde os nutrientes, provavelmente, reprimem a formação das enzimas inibidoras da síntese desses metabólitos (AZEVEDO et al., 2004).

4 Conclusões

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:



- o *Bacillus licheniformis* possui capacidade para utilizar o soro de leite como substrato, constituindo assim uma alternativa viável e promissora para a produção de bacitracina a partir desse resíduo industrial;
- os meios alternativos contendo soro de leite e diferentes concentrações de glicose (3 g, 5 g, 8 g e 10 g) apresentaram resultado positivo na produção do antibiótico;
- a bacitracina produzida foi detectada pelo método biológico de formação de halos característicos, tendo a concentração de 10 g de glicose, obtido o maior halo de inibição (16 mm);
- o reaproveitamento do soro de leite na elaboração de meios de produção de metabólitos secundários, como a bacitracina, pode contribuir para a redução da poluição ambiental, já aproximadamente metade da produção mundial de soro é descartada em efluentes sem qualquer tratamento biológico prévio.

Referências

ALI, S.; ZAFAR, Y.; MUHAMMAD ALI G.; NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, 2010.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciência e Tecnologia Alimentícia*, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001.

ANDRADE, A, C. Efeito da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*, 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2005.

ASHA POORNA, C.; PREMA, P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, n. 2, p. 106-112, 2006.

AWAIS, M. et al. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 2, p.114-119, 2008.

AZEVEDO, R. C. L. S.; PIMENTA, F. C.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de cerrado goiano e efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. *Revista de Patologia Tropical*, v. 33, p. 217-226, 2004.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 1559-1570, 2010.

BIASUTTI, E. A. R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.

BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 121, n. 3, p. 233-244, 2007.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, v. 71, n. 1, p. 41-44, 2000.

CALDEIRA, L. A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência Rural*, v. 40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.

CHANTAWANNAKUL, P. et al. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, v. 28, p. 241-245, 2002.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998. 527 p.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 21, p. 53-58, 2004.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, v. 179, p. 145-150, 2003.

CONNOR, N. et al., Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 5, p. 1349-1358, 2010.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiological and Biotechnological*, v. 52, p. 455-463, 1999.

DUBIN, A. et al. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52 n. 3, p. 633-638, 2005.

EL-SERSY, N. A.; EBRAHIM, H. A. H, ABOU-ELELA, G. M. Response surface methodology as a tool for optimizing the production of antimicrobial agents from *Bracillus licheniformis* SN2. *Current Research in Bacteriology*, p.1-14, 2009.

- FENG, Y.Y. et al. Fermentation of starch for enhanced alkaline proteases production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumillus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 153-160, 2001.
- FORNARI, R, C, G. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de goma xantana. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, 2006.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- HE, L.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU 12. *Microbiological Research*, v. 161, n. 4, p. 312-326, 2006.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- KENNEY, T. J; MORAN JR, C. P. Genetic evidence for interaction of sigma with two promoters in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, p. 3282-3290, 1991.
- KHALIL, R. et al. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, n. 3, p. 242-250, 2009.
- MADSEN, E.L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p.1-9, 2011.
- MANNANOV, R. N.; SATTAROVA, R. K. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria, *Chemistry of Natural Compounds*, v. 37, n. 2, p. 117-123, 2001.
- MARTIRANI, L. et al. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell Factories*, v. 1, p. 1-5, 2000.
- MING, L. J.; EPPERSON, J. D. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 91, p. 46-58, 2002.
- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 63-70, 2002.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* CL7. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v. 21, n. 1, p.82-85, 2001.
- OLIVEIRA, C. M. et al. Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2008.
- PAIK, H. D. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p. 294-298, 1997.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000a.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000b.
- PARK, J. H. et al. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 8, p. 404-412, 2008.
- PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento das proteínas do soro do leite no enriquecimento nutricional de sucos vitaminados. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 10, n. 1, p. 103-114, 2008.
- RAO, M. L. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAPOSO, S. et al. Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products. *International Journal of Energy and Environment*, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2009.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 1-17, 2004.
- SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, E. N. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 823-832, 2003.
- SIN, D. W. M.; WONG, Y. C. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 11, p. 799-809, 2003.
- SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of General Applied Microbiology*, v. 52, p. 357-363, 2006.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresearch Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.



SWAIN, M.R.; RAY, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, v. 164, n. 2, p.121-130, 2009.

TABBENE, O.; SLIMENE, I. B.; BOUABDALLAH, F.; MANGONI, M. L.; URDACI, M. C.; LIMAM, F. Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp. strain B38 newly isolated from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.157, p. 407-419, 2009.

TEIXEIRA, M. L. Purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis*. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

TODOROVA, S.; LUBKA KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 1207-1216, 2010.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 240-245, 2002.

VALDUGA, E. et al. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Alimentos e Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 393-400, 2006.

WALZEN, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews of Food Science Nutrition*, v. 42, p. 353-375, 2002.

XIONG, Y. et al. Production and characterization of a novel bioflocculant from *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 9, p. 2778-2782, 2010.

XU, H.; JIA, S.; LIU, J. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 779-788, 2011.

ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 100-105, 2010.

ZELDER, O.; HAVER, B. Environmentally directed mutations and their impact on industrial biotransformation and fermentation processes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, p. 248-251, 2000.

ZHANG, Y. et al. The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 12, p. 664-672, 2009.

Recebido em 4 maio 2011 / aprovado em 27 ago. 2011

Para referenciar este texto

SALES, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; ALVES DA SILVA, C. A. Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite. *Exacta*, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 231-240, 2011.