

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEASES, AMILASES, UREASES, LIPASES E TANASES POR FUNGOS E BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREA COSTEIRA DO NORDESTE DO BRASIL.

Igor Luiz Vieira de Lima Santos; Mykaella Joyce Silva de Araújo; Amanda Geovana Pereira de Araújo; Maria das Graças Morais de Medeiros; Carliane Rebeca Coelho da Silva

(Universidade Federal de Campina Grande) igorsantosufcg@gmail.com

Resumo

Microrganismos presentes nos mais diversos ambientes representam uma fonte atrativa de enzimas por poderem ser cultivados em grandes quantidades num relativamente curto tempo por métodos já estabelecidos. Isto faz com que produzam um suprimento abundante e regular do produto desejado. As proteínas microbianas têm uma maior vida útil e podem ser armazenadas durante semanas sem perda significativa de atividade. As enzimas produzidas como metabólitos por bactérias ou fungos são potencialmente aplicáveis nas mais diversas áreas industriais de produção ou transformação. Isto se dá devido à catálise biológica de processos de interesse comercial eficientemente e é nesse contexto que reside a importância da busca por novas possibilidades biológicas. Este trabalho teve como objetivo analisar a produção de proteases, amilases, ureases, lipases e tanases por linhagens do fungo *Rhizopus arrhizus* (WFCC/UCP 402), e das bactérias *Bacillus licheniformis* (WFCC/UCP 1008) e *Geobacillus stearothermophilus* (WFCC/UCP 1520) que foram isoladas de mangue na cidade de Rio Formoso no litoral sul de Pernambuco-Brasil. Estas linhagens foram submetidas aos testes de produção dessas enzimas em meios de cultura específicos em variadas temperaturas e tempos de amostragens. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições de temperaturas empregadas nenhum dos três isolados produziu proteases e tanases de modo eficiente em qualquer tempo de amostragem, mas todas produziram ureases em diversos níveis sendo verificada maior eficiência em *R. arrhizus*. As amilases e lipases foram produzidas apenas pelas linhagens de bactérias. Sendo assim, o *R. arrhizus* deve gerar melhor produção de ureases, o *B. licheniformis* deve ser utilizado na produção de amilases e ureases e o *G. stearothermophilus* na produção de ureases e lipases. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos microrganismos estudados em produzir estas enzimas de interesse industrial.

Palavras-chave: microrganismos, produção enzimática, bactérias, fungos.

Introdução

Existe um clamor social por atividades produtivas sustentáveis valorizando assim a produção de insumos e processos químicos que demandem matéria prima renovável. Neste ponto que se insere a utilização de microrganismos capazes de processos bioquímicos mais eficientes e que favoreçam a produção em larga escala de insumos metabólicos essenciais para os mais diversos ramos industriais fortalecendo assim a sua competitividade. É necessário observar o interesse na melhoria dos processos evitando assim o dispêndio de recursos e aumentando a sua eficiência. Neste contexto existe o favorecimento da utilização de matérias primas renováveis por tecnologias de biotransformação e biocatálise. Estas tecnologias já são realidade nas indústrias, mas a pesquisa continuada favorece o aparecimento de novos processos e novas

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

oportunidades de mercado. Sua implementação resulta em produtos de maior qualidade, obtidos por processos de menor consumo energético e de menor impacto ambiental.

O potencial biocatalítico dos microrganismos tem sido empregado há séculos para produzir pão, vinho, vinagre e outros produtos comuns sem conhecimento da base bioquímica de seus ingredientes. Enzimas microbianas ganharam interesse por seus usos difundidos na indústria e medicina devido à sua estabilidade, atividade catalítica e facilidade de produção e otimização da obtenção diferente das enzimas vegetais e animais. O uso de enzimas em várias indústrias (por exemplo, alimentos, agricultura, produtos químicos e produtos farmacêuticos) está aumentando rapidamente devido à redução do tempo de processamento, baixo consumo de energia, custo-benefício, características não-tóxicas e ecológicas. Enzimas microbianas são capazes de degradar compostos químicos tóxicos de resíduos industriais e domésticos (compostos fenólicos, nitrilos, aminas, etc.) por degradação ou conversão (SINGH et al., 2016). Entre as enzimas de interesse para a indústria, as mais empregadas são as proteases, que respondem por 60% do mercado mundial de enzimas.

Bactérias e fungos presentes no solo desempenham uma função essencial em vários ciclos biogeoquímicos sendo responsáveis pela ciclagem de compostos orgânicos. Microrganismos do solo influenciam os ecossistemas pela contribuição a saúde, nutrição das plantas e a própria química do solo e fertilidade (ANBU et al., 2017). Os microrganismos apresentam uma extensa diversidade genética e desempenham inúmeras funções nos mais variados processos dos ecossistemas. Sendo assim é essencial o conhecimento e aproveitamento dos microrganismos isolados dos mais diferentes ecossistemas naturais. Será com isso que um conjunto de aplicações antes desconhecidas podem ser descobertas analisando-se suas vias metabólicas e conseqüentemente seus metabólitos que podem conter moléculas até então desconhecidas e que podem ser utilizadas em benefício da humanidade.

O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em 2016 movimentar 4.61 bilhões de dólares e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movimente aproximadamente 320 milhões de dólares anualmente. Tal importância econômica justifica o interesse gerado pela busca de microrganismos capazes de influenciar favoravelmente a descoberta de processos e produtos de suas vias que envolvam tecnologia de baixo custo energético e que possuam menor impacto ambiental na sua obtenção (DIAS e CARVALHO, 2017). As enzimas, principais alvos da busca pelos cientistas, são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. Estas proteínas atuam

em vias biossintéticas nas células vivas e estão presentes em todos os organismos sejam plantas ou animais, ou nos mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos (GAZZALA et al., 2016).

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, principalmente aqueles catalisados por enzimas de alta eficiência, baixo custo e facilidade de produção. Sendo assim, a procura por novas moléculas de interesse biotecnológico é uma ferramenta atual e necessária para a descoberta de novos processos que otimizem a produção industrial e acarretem em inovação para as empresas. Isto impactaria de modo benéfico diretamente a cadeia produtiva nas mais diferentes áreas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a presença de enzimas com potencial interesse biotecnológico industrial dos tipos proteases, amilases, uréases, lipases e tanases por microrganismos das espécies *R. arrhizus*, *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* quando submetidos a diferentes temperaturas e tempos de crescimento. Este tipo de análise favorece a obtenção de dados eficientes para uma produção em larga escala possibilitando o direcionamento dos fermentadores da linha de produção.

Metodologia

Microrganismos: As linhagens de microrganismos utilizadas foram do fungo filamentosso *Rhizopus arrhizus* (WFCC/UCP 402) e das bactérias *Bacillus licheniformis* (WFCC/UCP 1008) e *Geobacillus stearothermophilus* (WFCC/UCP 1520) isoladas de substratos de mangue localizado na cidade de Rio Formoso no litoral sul do estado de Pernambuco – Brasil. Elas foram obtidas do banco de cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, o qual é cadastrado no World Federation Culture Collection-WFCC.

Meios de manutenção: A linhagem do fungo *R. arrhizus* foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose ágar (p/v) peptona 10g, glicose 40g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000ml. Já as bactérias *B. licheniformis* e o *G. stearothermophilus* foram mantidas em ágar nutritivo (p/v) peptona 5g, extrato de carne 3g, cloreto de sódio 1g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000ml. Estas linhagens foram mantidas em temperatura de 5°C, sendo repicadas a cada 3 meses com o intuito de obter culturas jovens.

Meios para detecção enzimática: A atividade enzimática foi determinada em quintuplicata em meio específico para detecção de: proteases (extrato de carne 3g, peptona 5g, ágar bacteriológico 15g, água destilada 1000 e pH 7,0, adicionado de uma solução de gelatina de 5g diluída

em 100ml de água destilada com pH 6,0); amilases (extrato de carne 3g, peptona 5g, amido 2g, ágar bacteriológico 20g e água destilada 1000mL em pH 7,0); ureases, camada inferior: ágar bacteriológico 20g, peptona 10g, glicose 40g, água destilada 1000ml, solução de uréia 50ml (1% p/v) em pH 6,5, camada superior: ágar bacteriológico 20g, solução tampão fosfato de sódio monobásico 255ml (2,76% p/v), solução tampão fosfato de sódio dibásico 245ml (5,37% p/v), solução uréia 50ml (1% p/v), solução de azul de bromotimol 50ml, água destilada 500ml em pH 6,5; lipases (peptona 10g, cloreto de sódio 5g, cloreto de cálcio bihidratado 0,1g, ágar bacteriológico 20g, 10ml de tween 20 (esterilizado em vapor fluente), água destilada 1000ml em pH 6,0); e tanases, extrato de malte 30g, ágar bacteriológico 15g, ácido tânico 0,5% (p/v), água destilada 1000ml e pH 6,5.

Preparação da suspensão microbiana: Para preparação das suspensões microbianas foram obtidas suspensões esporícas de 10^8 esporos/ml a partir de culturas jovens de *R. arrhizus* crescidas em Sabouraud (28°C/168h); e suspensão bacteriana de 10^8 CFU/ml a partir de culturas jovens de *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* crescidas em ágar nutritivo (30°C/24h). Posteriormente, 50µl das suspensões microbianas foram inoculadas em furo com diâmetro de 6mm no centro das placas contendo 20ml dos meios de cultura específicos para detecção enzimática.

Determinação da atividade enzimática: após a inoculação das soluções microbianas as placas foram incubadas a 28°, 37° e 45°C. A estimativa visual dos halos de atividade enzimática foi realizada em intervalos de tempo de 24, 48 e 72h.

Atividade Proteolítica: gelatina foi usada para avaliar a atividade proteolítica. Para melhor visualização do halo, após as 72 h de incubação, a superfície das placas foi coberta com solução reveladora de iodo (0,1N). Atividade Amilolítica: a habilidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após 72 h de incubação a 28, 37 e 45° C, as placas foram reveladas com iodo e a atividade amilolítica avaliada pela zona clara ao redor da colônia. Atividade Urealítica: a detecção da enzima urease foi confirmada pela mudança do pH e cor do meio, de verde para amarelo. Atividade Lipolítica: após 72 h de incubação a 28, 37 e 45°C o halo de degradação do Tween 20 foi evidenciado pela revelação das placas com iodo e a atividade lipolítica avaliada pela zona clara ao redor da colônia. Atividade Tanalítica: após 72 h de incubação a 28, 37 e 45°C deveria ser observada a degradação do ácido tânico e a clarificação do meio ao redor da colônia.

Resultados e Discussões

PROTEASES

As proteases são importantes enzimas, utilizadas na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica e de detergentes (SINGH et al, 2016). Os resultados obtidos demonstraram a habilidade dos microrganismos testados em crescer nas diferentes temperaturas para o meio de cultura contendo gelatina como fonte de carbono adicional (Tabela 1), contudo foi observada a incapacidade dos microrganismos em produzir proteases de forma eficiente nas condições avaliadas (Figura 1). Isto foi verificado pela não formação de halos nas placas analisadas apesar do crescimento observado.

Tabela 1: Média das quintuplicatas do índice de crescimento microbiológico para todos os meios testados após 72 horas de incubação.

Organismos	PROTEASES			AMILASES			UREASES			LIPASES			TANASE		
	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C	28°C	37°C	45°C
<i>Rhizopus arrhizus</i>	3+	3+	3+	3+	3+	-	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	1+	1+	3+	-	-	-
<i>G. stearothermophilus</i>	1+	1+	3+	1+	1+	2+	2+	3+	3+	1+	1+	1+	-	-	-

1+ = Baixo Crescimento, 2+ = Médio Crescimento, 3+ = Alto Crescimento.

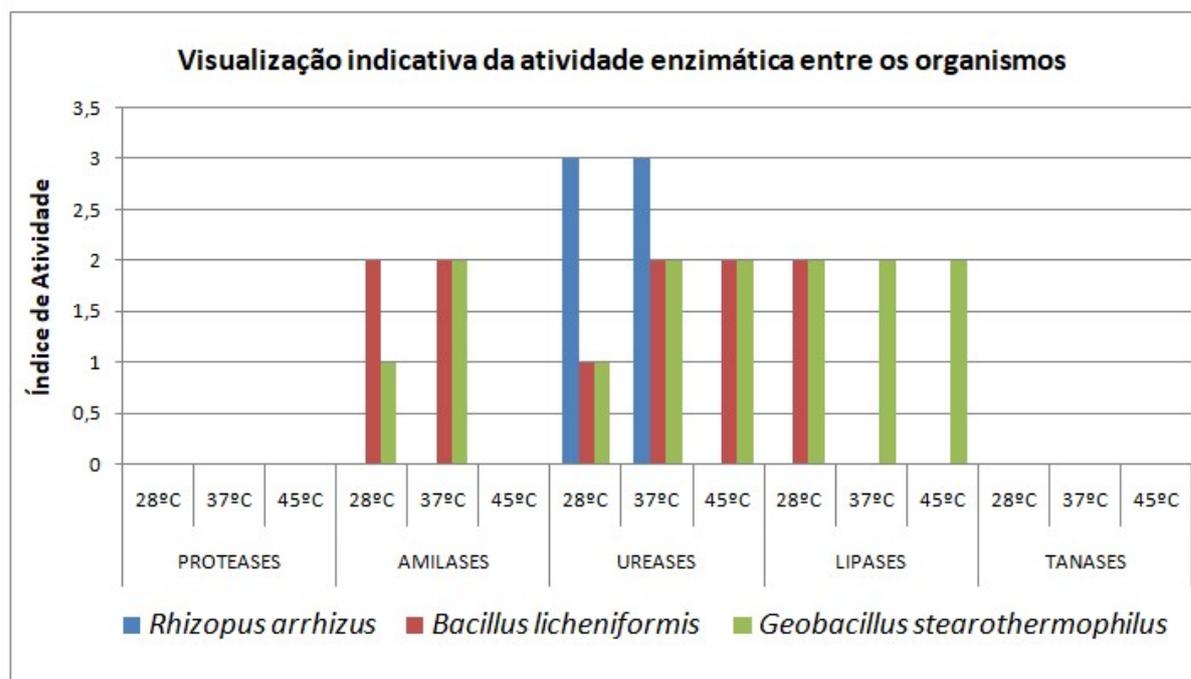


Figura 1. Visão geral com comparação indicativa global do crescimento e das atividades enzimáticas dos microrganismos testados para todas as enzimas analisadas no tempo de 72h. Índice de Atividade: H1 = Baixa atividade, H2 = Média atividade, H3 = Alta atividade.

Esperava-se que o *G. stearothermophilus* por ser uma linhagem termofílica, ou seja, organismo que apresenta maior afinidade metabólica por altas temperaturas apresentaria melhor taxa de crescimento na temperatura de 45°C chegando a níveis 3+ que foram considerados como de alto crescimento. O fato de ele ser um organismo termofílico pode ter influenciado o seu baixo crescimento, em níveis 1+, nas temperaturas de 28° e 37°C. Diferentemente do *Bacillus* que foi mais estável apresentando níveis de crescimento mais uniformes para todas as enzimas e temperaturas testadas. Mas isso tudo pode ser resultado de uma interação entre a capacidade de crescimento em certa temperatura e a disponibilidade do nutriente específico. Após 72h o fungo *R. arrhizus* apresentou alto crescimento 3+ principalmente nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, demonstrando uma adaptabilidade mais estreita quando se refere a temperatura, diferentemente das bactérias estudadas que cresceram nas 3 temperaturas, com exceção apenas no meio para produção de tanases. Shiozaki et al. (2008) descreveram o crescimento de *R. arrhizus* em meio de cultura contendo pireno como fonte adicional de carbono. O seu crescimento em diferentes condições de temperatura pode fazer dela uma ótima opção para o cultivo em larga escala principalmente se for de enzimas do tipo ureases. Assim como o *R. arrhizus*, as bactérias apresentaram crescimento celular do tipo 3+, em temperaturas variando de 37°C a 45°C, sendo descrita previamente a grande capacidade de crescimento desses microrganismos em condições desfavoráveis de fonte de carbono (VASCONCELOS et al, 2009).

Os halos transparentes de degradação da gelatina, presente como única fonte de carbono, não foram distinguíveis em nenhuma placa de crescimento analisada apesar do crescimento dos microrganismos. Este fato pode ter sido devido à inabilidade dos microrganismos testados em degradar tal composto durante o período de 72h, estando o crescimento celular relacionado com a capacidade dos microrganismos em utilizar metabolicamente as outras substâncias presentes no meio de cultura em detrimento da utilização do indicador (gelatina). Também é sugerido que os microrganismos avaliados possam ter degradado de forma bastante suave a gelatina, o que tornou difícil a identificação dos halos que comprovariam a presença de proteases. Na literatura, a produção de proteases vem sendo descrita para diferentes microrganismos (NASCIMENTO e MARTINS, 2004; NAJAFI et al., 2005; FERRACINI-SANTOS e SATO, 2009; SANGEETHA et al., 2010). Havendo a descrição do uso de amido, glicose e caseína como fontes principais de carbono, e nitrato de amônio e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Sendo sugeridos testes adicionais em presença de diferentes fontes de

carbono e nitrogênio para confirmar a não produção de proteases pelos microrganismos testados.

AMILASES

Na diversa gama de enzimas existentes as amilases apresentam grande importância para a biotecnologia com um amplo campo de aplicações. Na indústria de alimentos são empregadas na liquefação do amido para a obtenção de glicose, em produtos de panificação, em cervejarias e bebidas fermentadas, em cereais para alimentação infantil como também são aplicadas na ração animal.

Os resultados de crescimento para as placas de teste de amilases demonstraram que *R. arrhizus* apresentou crescimento de nível 3+ nas temperaturas de 28 e 37°C mas não apresentou crescimento a 45°C. Diferentemente das bactérias *B. licheniformis* que aumentou de nível 2+ para 3+ e *G. stearothermophilus* que aumentou de 1+ para 2+ entre 37° e 45°C, respectivamente (Tabela 1).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas (GOPINATH et al., 2017). A presença de amilase observada no crescimento de *B. licheniformis*, corrobora com a literatura que descreve esse microrganismo como grande produtor de amilases comerciais (RODRÍGUEZ et al., 2006). A não produção de amilase por *R. arrhizus*, em nenhuma das condições avaliadas sugere que sejam testadas outras fontes de carbono como indutoras da produção da respectiva enzima, visto que em trabalho de Moreira et al, (2001) foi induzida a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em meio contendo α -metil-D-glicosídeo, um análogo sintético da maltose. Embora tenham sido descritas bactérias termofílicas produtoras de amilases (GORLACH-LIRA e COUTINHO, 2007), para as condições avaliadas *B. licheniformis* e *G. stearothermofilus* não foram capazes de degradar o amido à temperatura de 45°C. Sugerindo que para que estas bactérias expressem amilases eficientemente seja preferível a incubação em temperaturas abaixo de 45°C.

UREASES

As ureases são enzimas que catalisam a hidrólise do nitrogênio em compostos de amônia, utilizando a uréia e substratos protéicos de baixo peso molecular. Tem grande importância na agricultura sendo muito utilizada em processos envolvendo o aumento da fertilização em solos ricos contendo diversos minerais.

Na Tabela 1 é observada a prevalência de alto crescimento de todos os isolados nas diferentes condições analisadas, demonstrando a capacidade de utilização da uréia como única fonte de nitrogênio. O *R. arrhizus* a 45°C não

apresentou crescimento, sendo sugerida que a capacidade de *R. arrhizus* em degradar uréia, como fonte de nitrogênio seja dependente da temperatura de incubação. Devido a essa característica é recomendado temperaturas inferiores a 45°C para processos de otimização da produção de ureases por *R. arrhizus* (WFCC/UCP 402). A literatura descreve a influência de fatores ambientais na produção de urease por fungos (PAULA et al, 2006; CERCIANI et al, 2008; PUPIN et al, 2009). O *G. stearothermophilus* apresentou crescimento do tipo 2+ à temperatura de 28°C que pode ter sido devido ao seu menor rendimento metabólico estar associado a temperaturas mais baixas (SANTOS FILLHO e PENA, 2003). Adicionalmente a estes resultados pode-se sugerir que a presença de glicose como fonte de carbono do meio de cultivo para os testes de presença de ureases foi a melhor opção para a promoção do crescimento celular, quando comparado com a composição dos meios de cultura utilizados para os testes de produção de proteases, amilases, lipases e tanases.

Para as bactérias *B. licheniformis* e o *G. stearothermophilus* as temperaturas que apresentaram melhores resultados para a produção de ureases foram de 37 e 45°C, sendo observada média atividade, enquanto que a 28°C foi observada baixa atividade enzimática (Figura 1).

LIPASES

De outro modo, as lipases são enzimas que são usadas em indústrias químicas e de cosméticos, farmacêuticas, indústrias de produção de papel e celulose. Na indústria têxtil as lipases atuam na fiação dos tecidos, na química ela melhora a absorção de tintas sintéticas, apresentam solubilidade em água, contudo catalisam reações que possuem substratos lipofílicos.

Para as condições avaliadas não foi observado crescimento micelial de *R. arrhizus* e foi observado baixo crescimento para *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus*, sendo sugerida dificuldade desses microrganismos em degradar Tween 20, adicionado ao meio de cultura como única fonte de carbono. Embora seja sugerida a produção de lipases por *B. licheniformis* à temperatura de 40°C (SANGEETHA et al., 2010), no presente estudo o isolado apenas apresentou produção de lipase à 28°C, embora tenha havido alto crescimento celular à 45°C (Tabela 1).

Para esta enzima os halos de degradação revelados pelo iodo foram unicamente de nível H2 (média atividade). Em trabalho de Kumari et al. (2009) é sugerido o tamanho do inóculo como fator importante para uma grande produção de lipase. Para *B. licheniformis* a produção de lipase apenas ocorreu à 28°C e para *G.*

stearothermophilus a produção de lipase pôde ser observada em todas as temperaturas avaliadas durante o experimento. Nawani et al. (2006) descreve bactérias termofílicas da família Bacillaceae como produtoras de lipase em temperaturas ótimas de 60°C, sendo sugerido avaliar a atividade da lipase produzida pelo isolado *G. stearthermophilus* em temperaturas acima de 45°C.

TANASES

As tanases são enzimas que têm a função de hidrolisar ésteres de taninos produzindo ácido gálico e glicose. As maiores aplicações destas enzimas são na produção de ácido gálico, no processamento da cerveja e nos processos de clarificação de sucos e chás instantâneos atuando ainda no tratamento de efluentes contaminados com compostos fenólicos

Os microrganismos testados não cresceram no meio utilizado para os testes de produção enzimática de tanases, mesmo ampliando o período de crescimento para 120h. Consequentemente não se fez presente nenhum halo de degradação sendo sugerido que os microrganismos testados não foram capazes de utilizar o ácido tânico como fonte de carbono. Isto pode ter sido devido à composição do meio utilizado, sendo este o único meio a possuir extrato de malte e ácido tânico em sua composição que de alguma forma pode ter influenciado na viabilidade dos inóculos realizados. A literatura descreve diferentes linhagens de *Aspergillus* e *Penicilium* (PINTO et al., 2001; COSTA et al., 2008; MATA-GOMEZ et al., 2009), *Lactobacillus plantarum* (CURIEL et al., 2010), *Serratia sp.* (BELUR et al., 2010) e *Bacillus licheniformis* (MONDAL e PATI 2000; MOHAPATRA et al., 2009) como produtoras de tanases, contudo as cepas de isolados utilizados no presente trabalho não foram capazes de produzir tanases nas condições experimentais (Figura 1).

Conclusões

Os isolados *Rhizopus arrhizus*, *Bacillus licheniformis*, e *Geobacillus stearothermophilus* demonstraram serem indicados para testes adicionais de potencial produção biotecnológica em larga escala de amilases, ureases e lipases. Por outro lado, não se deve esperar muito benefício industrial na produção de proteases e tanases, visto que não foi observada a presença de halos de degradação para estas enzimas. O *Rhizopus arrhizus* deve gerar melhor produção de ureases, o *Bacillus licheniformis* deve ser utilizado na produção de amilases e ureases e o *Geobacillus stearothermophilus* na produção de ureases e lipases. Dito isto, é importante ressaltar a competência destes organismos em produzir certos tipos de enzimas que possuem interesse industrial para estudos futuros.

Referências

- ANBU et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. **BioMed Research International**, 2016.
- BELUR, P. D.; GOPAL, M.; NIRMALA, K. R.; BASAVARAJ, N. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.4, p.732-736, 2010.
- CENCIANI, K.; FREITAS, S. S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Microbial enzymatic activity and thermal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Scientia Agricola**, v.65, n.6, p.674-680, 2008.
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.2, p.399-404, 2008.
- DIAS, R. F. e DE CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. **Rev. Virtual Quim.** v.9, n.1, p.410-430, 2017.
- FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H.H. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.1, p.54-60, 2009.
- GHAZALA, I. et al. Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.59, 2016
- GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**. p.2017:127, 2017.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.135-141, 2007.
- GUPTA, R.; PARESH, G.; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003.
- KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação Parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p.287-292, 2004.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for

- synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1349-1356, 2009.
- MATA-GOMEZ, M.; RODRIGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNANDEZ, M.A.; RODRIGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C.N. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p. 987-996, 2009.
- MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular Biology of Microbial Ureases. **Microbiology Reviews**, v.59, p.451-480, 1995.
- MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Effect of amino acids on tannase biosynthesis by *Bacillus licheniformis* KBR6. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v.42, n.2, p.172-175, 2009.
- MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.223-232, 2000.
- MOREIRA, F. G.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; RAMOS, E. P.; PERALTA, R. M. The use of alpha-methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus sp* in solid-state and submerged fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.15-19, 2001.
- NAJAFI, M.F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, n.2, p.79-85, 2005.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2 crescido em soro de água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.582-588, 2006.
- NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp*. **Brazilian journal of microbiology**, v.35, n.1-2, p. 91-96, 2004.
- NAWANI, N.; SINGH, R.; KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp*: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.5, p.559-565, 2006.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.

- PAULA, A. M.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia e Agricultura Ambiental**, v.10, n.2, p. 448-455, 2006.
- PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; TERZI, S. C.; COURI, S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.24-26, 2001.
- PUPIN, B.; FREDDI, O. S.; NAHAS, E. Microbial alterations of the soil influenced by induced compaction. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.33, n.5, p.1207-1213, 2009.
- SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. **Brazilian journal of Microbiology**. v.41, n.1, p.179-185, 2010.
- SANTOS FILHO, G. C.; PENNA, T. C. V. Validação do processamento térmico de um produto protéico vegetal enlatado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas**, v.39, n.4, p.391-401, 2003.
- SINGH, R. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech**. v.6, n.2, p:174-176., 2016.
- SHIOSAKI, R.K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; OKADA, K.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOSTAKAKI, G.M. Monitoring the effect of pyrene on the germination and radial growth of the wild and mutant strains of *Rhizopus arrhizus* UCP402. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v.51, n.3, p.613-621, 2008.
- VASCONCELLOS, S. P.; CEREDA, M. P.; CAGNON, J. R.; FOGGIO, M.A.; RODRIGUES, R.A.; MANFIO, G. P.; OLIVEIRA, V. M. *In vitro* degradation of linamarin by microorganisms isolated from cassava wastewater treatment lagoons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.4, p.879-883, 2009.