

Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases

Screening of filamentous fungi for the production of amylases, proteases, cellulases, and pectinases

Nara Elisandre Griebeler^[a], Valéria de Bortoli^[a], Angela Luiza Astolfi^[a], Naionara Ariete Daronch^[a], Adriane Cristina Schumann^[a], Ludmila Noskoski Salazar^[a], Rogério Luis Cansian^[a], Geciane Toniazzo Backes^[a], Jamile Zeni^{[a]*}

^[a] Departamento de Ciências Agrárias (Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS - Brasil.

* Autor para correspondência: jamilezeni@uricer.edu.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi selecionar fungos filamentosos, potencialmente capazes de produzir amilases, proteases, celulasas e pectinases. A seleção de micro-organismos com atividade enzimática foi realizada por plaqueamento dos isolados em meio sólido com diferentes fontes de carbono e posterior medida do diâmetro do halo de degradação. Foram selecionados 180 isolados de fungos filamentosos, dos quais 12,2% produziram proteases, 17,2% amilases, 27,2% celulasas e 32,7% pectinases. Desse total, 10,7% não foram capazes de produzir as enzimas testadas. Dois isolados apresentaram atividade para todas as enzimas avaliadas, a qual, embora não tenha sido elevada, pode indicar potencial para a aplicação industrial desses isolados, visto que a utilização de uma única cepa fúngica seria suficiente para a degradação de vários tipos de substratos.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Fungos filamentosos. Seleção.

Abstract

The aim of this research was to select filamentous fungi potentially capable of producing amylases, proteases, cellulases, and pectinases. The selected microorganisms were screened for enzymatic activity by plating the isolates on a solid medium with different carbon sources and measuring the diameters of degradation. The screening and isolation of 180 microorganisms showed that 12.2% of the microorganisms produced proteases, 17.2% amylases, 27.2% cellulases, and 32.7% pectinases; 10.7% did not produce any of these enzymes. Two isolates showed activity, albeit not elevated, towards all the evaluated enzymes. This suggests a potential industrial application of these isolates, as these two fungal strains would be sufficient for the degradation of various substrate types.

Keywords: Enzyme activity. Filamentous fungi. Screening.



Introdução

O crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia estimula a descoberta de novos micro-organismos produtores de enzimas que apresentem alta produtividade, especificidade e estabilidade das enzimas. As enzimas têm sido usadas, em grande escala, na indústria de tecidos (celulases), detergentes (proteases e lipases), de alimentos e bebidas (amilases, pectinases, proteases e celulases), de couro (proteases e lipases) (Pasha et al., 2013; Soares, 2010) e na dieta de ruminantes para o aumento da digestibilidade (enzimas fibrolíticas) (Martins et al., 2006).

Enzimas fibrolíticas, tais como celulases e xilanasas, associadas a outras enzimas, são adicionadas na ensilagem com a finalidade de melhorar o processo fermentativo, a composição química das silagens resultantes e a performance animal (McDonald et al., 1991). Entre as características melhoradas, a redução do teor de fibra é uma das mais importantes.

Amilases, proteases, pectinases e celulases podem ser originárias de plantas, animais e micro-organismos. As microbianas são produzidas principalmente por bactérias e fungos, representando a mais ampla classe de enzimas aplicadas no ramo da biotecnologia e química orgânica (Moreno et al., 2013; Chandra et al., 2010).

As celulases são as enzimas utilizadas na indústria têxtil, de papel e celulose e na dieta de ruminantes, associada a outras enzimas (xilanase, pectinase, amilase, protease, etc.) (McDonald et al., 1991) Atuam na hidrólise de substratos celulósicos e compreendem um complexo de enzimas celulolíticas compostas por endoglucanase ou endo-1,4- β -glucanase, exoglucanase ou exo-1,4- β -glucanase, celobiose ou β -glucosidase e exoglucosidase ou exo-1,4- β -glucosidase (Sadhu e Maiti, 2013).

As amilases formam o principal grupo de enzimas utilizado na indústria de alimentos, principalmente em panificação e biscoitaria (Deb et al., 2013). As amilases hidrolisam os amidos e são classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido (Pathak e Narula, 2013; Guimarães et al., 2006).

As proteases ou enzimas proteolíticas são usadas em processos industriais de tratamento de couro e peles, na formulação de detergentes, na indústria de

alimentos, assim como na panificação, juntamente com as amilases, sendo responsáveis pela hidrólise do glúten e no processamento de carnes, conservas e peixes (Kudryavtseva et al., 2010).

As enzimas pectinolíticas são produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias (Kumar e Suneetha, 2014). São muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau para melhorar a extração de óleos vegetais; na extração de polpa de tomate e no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel (Kumar e Suneetha, 2014).

O isolamento e seleção de micro-organismos pode facilitar a descoberta de novas enzimas com características desejáveis (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enantiosseletividade). Além disso, pode abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais (Damaso et al., 2012).

Inúmeras metodologias podem ser usadas para seleção de micro-organismos através da determinação da presença de enzimas extracelular. Dentre estas, está incluída a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrões, Tween 80, e corantes que possibilitam a maior visualização da reação de hidrólise (Damaso et al., 2012).

Desta forma, este estudo teve como objetivos isolar e selecionar novos micro-organismos, potenciais produtores de enzimas extracelulares e avaliar a capacidade destes na produção das enzimas amilases, proteases, celulases e pectinases produzidas pelos fungos filamentosos crescidos em meio sólido com diferentes fontes de carbono e proteína.

Materiais e métodos

Isolamento, identificação e manutenção de micro-organismos

Os micro-organismos foram isolados a partir de várias fontes como o solo, o óleo de oliva,

queijo, extracto de tomate, óleo de soja, nata de leite, carne, farelo de soja, e os meios de cultura contaminada.

As amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo PDA e incubadas a 30 °C por até 7 dias. Após o crescimento de diversos micro-organismos, estes foram repicados isoladamente para placas com meio de cultivo PDA e incubadas a 30 °C durante 7 dias. Este procedimento foi repetido até o isolamento completo dos micro-organismos. Depois deste passo, as culturas foram codificadas numericamente para facilitar identificação futura.

As colônias foram transferidas para tubos contendo meio de cultivo inclinado PDA, para fungos filamentosos, e incubados a 30 °C por 48 horas. Após o crescimento foram armazenadas as culturas selecionadas a 4 °C. A pureza das cepas foi verificada através de exame microscópico.

Os micro-organismos selecionados como promissores (do halo mais o desvio padrão) para pectinases, amilase, celulase a produção de protease em termos de atividade foram identificados pela técnica de microcultivo. Os fungos foram inoculados sobre uma fatia de agar colocada sobre uma lamela de vidro esterilizada e coberto por uma lamela esterilizada. A lâmina foi então colocada numa placa de Petri, e o conjunto foi então incubado durante 5 dias a 25 °C. A lamela com as hifas foi retirada e corada com o corante azul de algodão. A identificação do gênero de fungos foi fundamentada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo de estruturas de frutificação das seguintes estirpes e a chave de investigação de gêneros (Barnett e Hunter, 1998).

Seleção dos micro-organismos

Para a seleção dos micro-organismos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases, os mesmos foram incubados em meio sólido específico para a indução da bioprodução de cada enzima e analisada a formação do halo.

Para avaliar a atividade de amilase, os isolados foram cultivados em meio mínimo (MgSO_4 0,5g.L⁻¹; NaNO_3 3,0g.L⁻¹; KH_2PO_4 1,0g.L⁻¹; KCl 0,5g.L⁻¹, Fe_2SO_4 0,01 g.L⁻¹) (Rottava et al., 2010) suplementado por amido, sendo incubada a 25 °C durante 7 dias. Depois, realizou-se a revelação do halo de

degradação do amido. Para isso, foram vertidos 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e a atividade amilolítica detectada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada (Deb et al., 2013).

Para detectar a atividade proteolítica, foi utilizado o meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato. As placas foram incubadas durante 7 dias a 25 °C. Após o período de incubação dos isolados neste meio, foi adicionado sobre o mesmo uma solução saturada de sulfato de amônio, cujo precipitado tornou o agar mais opaco e acentuou as zonas claras ao redor das colônias, onde a gelatina foi degradada (Akujobi et al., 2012).

Para a determinação da atividade proteolítica, os isolados foram cultivados em agar carboximetilcelulose. Estes foram incubados por 7 dias a 25 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo em tampão Tris HCl 0,05M, pH 8,5. Após 30 minutos, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5M neste mesmo tampão, para a revelação do halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (Damaso et al., 2012).

Os micro-organismos pectinolíticos foram selecionados em placa com meio constituído de 1,25% de solução de pectina cítrica pH 5,5 (autoclavado separadamente); 50 mM de fosfato de potássio pH 5,5; 6,7 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 0,2% de glicose e 0,5% de agar. Os micro-organismos foram inoculados por picada e incubados a 30 °C por 4 dias. Após incubação, as placas foram reveladas com uma solução 0,05% de vermelho-rutênio por 5 minutos e lavadas com água destilada. A formação de halo vermelho púrpuro ao redor da colônia contrastando com o restante claro da placa significou que o micro-organismo foi capaz de degradar a pectina, ou seja, produtor de pectinase (Reddy e Sreeramulu, 2012).

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético foi realizado o congelamento das linhagens em freezer a -80 °C (MDF – U3086S - Sanyo) (Stanbury et al., 2000).

A análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, foi aplicada para a análise estatística dos dados obtidos. Os dados foram tratados com o auxílio de 6,0 Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Todas as análises foram realizadas considerando um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

A seleção resultou em 180 isolados, 12,2% produziram amilases, 17,2% proteases, 27,2% produziram celulases, 32,7% produziram pectinases e 10,7% não produziram nenhuma dessas enzimas. A frequência de micro-organismos isolados produtores de enzimas foi semelhante à encontrada por outros autores para amilase (17,4%) (Saleem e Ebrahim, 2014), proteases (25%) (Mohanasrinivasan et al., 2012), celulases (33,3%) (Belhamiche et al., 2011) e pectinases (40%) (Guimarães et al., 2006).

Os resultados da seleção de micro-organismos para a produção de amilases estão apresentados na Tabela 1. O diâmetro dos halos dos diferentes

isolados com atividade amilolítica variaram entre 2,2 e 11,06 mm, sem considerar o diâmetro da colônia. Foram considerados com maior potencial de atividade amilolítica 4 isolados (I48, I50, I19 e I210), com diâmetro de halo acima de 7,08 mm (média mais desvio padrão) entre todos os produtores de amilase.

O isolado com a maior atividade amilolítica (I48) apresentou halo com diâmetro próximo ao halo formado pelo fungo *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 (12 mm) conforme descrito por Pasha et al. (2013).

Dentre os micro-organismos selecionados com atividade proteolítica, apenas 5 isolados (I215, I58, I32, I216 e I222) apresentaram diâmetro de halo acima de 10,62 mm (média mais desvio padrão) entre todos os produtores (Tabela 2). Alves et al. (2002) verificaram a produção de proteases por diferentes espécies de *Mucor* spp. cultivadas em meio sólido durante 96 horas. As colônias apresentaram halos que variaram de 30 a 64 mm. Kamat et al. (2008)

Tabela 1 – Diâmetro do halo (mm) dos diferentes micro-organismos isolados com atividade amilolítica

Isolados	Halo (mm)	Isolados	Halo (mm)
I48 (<i>Aspergillus</i> sp.)	11,06±1,1 ^a	I34	4,4±0,4 ^e
I50 (<i>Penicillium</i> sp.)	8±0,8 ^b	I38	3,8±0,4 ^e
I19 (<i>Aspergillus</i> sp.)	7,6±0,6 ^c	I73	3,08±0,3 ^e
I210 (<i>Aspergillus</i> sp.)	7,4±0,7 ^c	I17	3,8±0,4 ^e
I11	5,8±0,6 ^d	I214	3,06±0,5 ^{ef}
I23	5,8±0,6 ^d	I54	3±0,3 ^f
I211	5,8±0,6 ^d	I68	3±0,3 ^f
I27	5,6±0,6 ^d	I71	3±0,3 ^f
I213	5,4±0,8 ^d	I10	3±0,3 ^f
I70	5,12±0,5 ^d	I205	2,4±0,2 ^g
I67	5,1±0,5 ^d	I3	2,2±0,2 ^g

Nota: Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

obtiveram isolados (*Acremonium fusidioides*) com máximo de 4 mm de zona de atividade.

A atividade celulolítica foi observada em 39 isolados, sendo que destes, 8 isolados (I34, I130, I212, I30, I70, I26 e I23) apresentaram halos maiores a 13,86 mm (média mais desvio padrão) (Tabela 3).

O melhor isolado no presente estudo apresentou halo para atividade celulolítica similar ao halo formado pelo fungo *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 (18 mm) em teste realizado por Pasha et al. (2013).

Dos 59 isolados com atividade pectinolítica, 14 apresentaram potencial de produção de pectinases com diâmetro de halo superior a 16,8 mm (Tabela 4). Reddy e Sreeramulu (2012) obtiveram halos de 10 mm para a atividade pectinolítica de *Aspergillus flavus* and *A. japonicus* e 12 mm para *Chaetomium globosum*.

Alves et al. (2002) estudaram espécies de *Mucor* spp. e confirmaram sua capacidade de produzir pectinase em meio adicionado de pectina cítrica. Após 72 horas de crescimento, observaram halos com diâmetro variando entre 3,7-8,8 cm.

Tabela 2 – Diâmetro do halo (mm) dos diferentes isolados com atividade proteolítica

Isolados	Halo (mm)	Isolados	Halo (mm)
I215 (<i>Penicillium</i> sp.)	23,12±2,4 ^a	I31	3±0,4 ⁱ
I58 (<i>Penicillium</i> sp.)	19,2±1,8 ^b	I34	3±0,3 ⁱ
I32 (<i>Aspergillus</i> sp.)	12,6±1,3 ^c	I36	3±0,3 ⁱ
I216 (<i>Aspergillus</i> sp.)	11,54±1,1 ^c	I26	3±0,3 ⁱ
I222 (<i>Aspergillus</i> sp.)	11,4±1,3 ^c	I65	3±0,3 ⁱ
I211	9,12±0,8 ^d	I219	2,8±0,2 ^{ij}
I217	9,06±0,9 ^d	I210	2,6±0,2 ^j
I76	9±0,9 ^d	I68	2±0,2 ^l
I218	7,8±0,8 ^e	I84	2±0,2 ^l
I213	6,4±0,6 ^{ef}	I25	2±0,2 ^l
I220	5,1±0,5 ^g	I40	2±0,2 ^l
I30	5,1±0,5 ^g	I44	2±0,2 ^l
I15	4,12±0,4 ^h	I54	2±0,2 ^l
I11	3,8±0,4 ^h	I81	1±0,1 ^m
I27	3,8±0,4 ^h	I23	1±0,1 ^m
I2	3,6±0,6 ^{hi}	-	-

Nota: Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Tabela 3 – Diâmetro do halo (mm) dos diferentes isolados com atividade celulolítica

Isolados	Halo (mm)	Isolados	Halo (mm)
I34 (<i>Aspergillus</i> sp.)	17,4±1,8 ^a	I205	7,2±0,7 ^g
I130 (<i>Penicillium</i> sp.)	16,4±1,6 ^{ab}	I10	7,2±0,7 ^g
I212 (<i>Aspergillus</i> sp.)	16,2±1,6 ^{ab}	I210	7,08±0,7 ^g
I30 (<i>Aspergillus</i> sp.)	15,8±1,6 ^{bc}	I223	7,1±0,7 ^{fg}
I70 (<i>Penicillium</i> sp.)	15,2±1,4 ^c	I213	6,6±0,6 ^g
I26 (<i>Aspergillus</i> sp.)	15,2±1,5 ^c	I44	6±0,6 ^{gh}
I73 (<i>Penicillium</i> sp.)	14,8±1,4 ^c	I48	6±0,5 ^{gh}
I23 (<i>Aspergillus</i> sp.)	14,4±1,4 ^{cd}	I33	5±0,4 ^h
I103	13±1,2 ^d	I80	4,6±0,4 ^h
I203	11,8±1,1 ^e	I211	4,6±0,4 ^h
I215	11,12±1,1 ^e	I224	3,2±0,3 ⁱ
I42	10±1,0 ^{ef}	I82	3,12±0,3 ⁱ
I221	9,8±1,0 ^f	I41	3±0,2 ⁱ
I225	9,12±0,9 ^f	I204	2,4±0,2 ^j
I216	8,2±0,8 ^f	I9	2,4±0,2 ^j
I28	8±0,8 ^f	I15	2,4±0,3 ^j
I36	8±0,7 ^f	I1	2,2±2,0 ^j
I222	7,8±0,8 ^f	I43	2±0,2 ^j
I31	7,8±0,8 ^f	I20	1±0,1 ^l
I11	7,4±0,8 ^g	-	-

Nota: Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Tabela 4 – Diâmetro do halo (mm) dos diferentes isolados com atividade pectinolítica

Isolados	Halo (mm)	Isolados	Halo (mm)
180 (<i>Penicillium</i> sp.)	30±3,0 ^a	132	7,1±0,7 ^g
161 (<i>Aspergillus</i> sp.)	28±2,7 ^a	142	6±0,5 ^{gh}
174 (<i>Penicillium</i> sp.)	26±2,5 ^{ab}	121	4±0,4 ⁱ
18 (<i>Penicillium</i> sp.)	25±2,3 ^b	1226	4±0,4 ^h
158 (<i>Penicillium</i> sp.)	24±2,3 ^b	12	4±0,3 ^h
167 (<i>Aspergillus</i> sp.)	23±2,2 ^{bc}	127	3,08±0,3 ⁱ
118 (<i>Penicillium</i> sp.)	23±2,2 ^{bc}	148	3,1±0,3 ⁱ
145 (<i>Penicillium</i> sp.)	23±2,2 ^{bc}	1205	3±0,2 ⁱ
146 (<i>Penicillium</i> sp.)	20±1,9 ^c	1203	3±0,2 ⁱ
170 (<i>Penicillium</i> sp.)	19±1,9 ^c	138	2±0,2 ^h
1233 (<i>Aspergillus</i> sp.)	19±1,8 ^{cd}	149	2±0,2 ^j
164 (<i>Penicillium</i> sp.)	18±1,7 ^{cd}	187	2±0,2 ^j
156 (<i>Aspergillus</i> sp.)	18±1,7 ^{cd}	188	2±0,2 ^j
150 (<i>Penicillium</i> sp.)	17±1,7 ^{cd}	13	2±0,2 ^j
113	14±1,3 ^e	1224	2±0,2 ^j
112	11±1,1 ^f	1216	2±0,2 ^j
124	11±1,1 ^f	140	2±0,1 ^j
16	10±1,0 ^f	141	2±0,1 ^j
151	10±0,9 ^f	1229	2±0,1 ^j
169	8,4±0,8 ^g	1232	1,8±0,1 ^j
122	8±0,8 ^g	1231	1,6±0,1 ^{jl}
119	7,4±0,7 ^g	Outros 16 isolados	<1,6

Nota: Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Dos 180 isolados, dois apresentaram atividade para todas as enzimas avaliadas, I211 (*Penicillium* sp.) e I213 (*Paecilomyces* sp.) (Figura 1). Embora a atividade enzimática dessas cepas não tenha sido alta nos diferentes sistemas, o seu amplo espectro de atividade enzimática indica potencial para aplicação, seja no tratamento de resíduos ou na dieta de ruminantes, visando o aumento da digestibilidade de ensilagens, uma vez que o uso de um único micro-organismo seria suficiente para a degradação de diferentes substratos.

Alves et al. (2002) estudaram 56 isolados de *Mucor* para produção de amilase, lipase,

poligalacturonase e protease e observaram que a maioria dos isolados fúngicos apresentou capacidade de produção de mais de uma enzima, com predomínio de poligalacturonase (96%), amilase (84%), protease (82%) e lipase (66%).

Guimarães et al. (2006) coletaram e isolaram fungos filamentosos do solo e húmus, plantas e açúcar bagaço de cana de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Quarenta isolados foram examinados quanto à sua capacidade de produzir xilanase, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase. Entre esses, 23 isolados exibiram potencial enzimático.

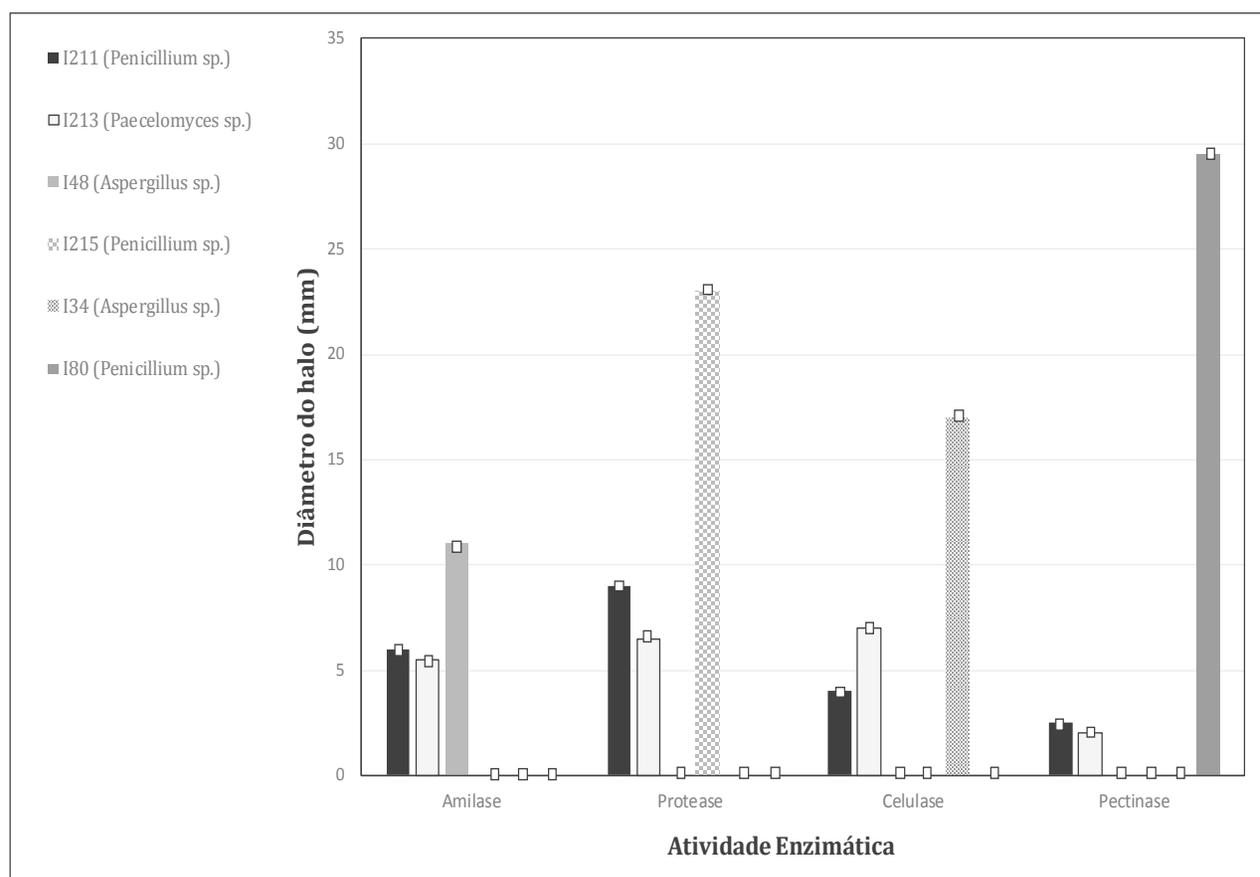


Figura 1 - Espectro de atividade enzimática dos isolados I211 (*Penicillium* sp.) e I213 (*Paecilomyces* sp.) em comparação com os isolados de maior atividade para cada uma das enzimas avaliadas.

Conclusão

Dos 180 isolados, 2 micro-organismos codificados I211 (*Penicillium* sp.) e I213 (*Paecilomyces* sp.) apresentaram atividade para todas as enzimas avaliadas. Embora a atividade desses isolados não tenha sido alta nos diferentes sistemas, seu amplo espectro de atividade enzimática indica potencial para sua aplicação industrial.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- Akujobi CO, Odu NN, Okorundu SI, Ike GN. Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment. *Journal of Research in Biology*. 2012; 2(2):077-082.
- Alves MH, Campos-Takaki GM, Porto ALF, Milanez AI. Screening of *Mucor* sp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002; 33(4):325-330. doi:10.1590/S1517-83822002000400009.
- Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1986.
- Belhamiche N, Duchiron F, Benallaoua S. Screening of fungal strains producing cellulases by solid fermentation. In: Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 2011 Oct 4-7; Arcachon, France. France: ICMBMP7; 2011. p. 163-167.
- Chandra M, Kalra A, Sharma PK, Kumar H, Sangwan RS. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy*. 2010; 34(5):805-811. doi:10.1016/j.biombioe.2010.01.024.
- Damaso MCT, Terzi SC, Farias AX, Oliveira ACP, Fraga ME, Couri S. Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012; 55(4):513-520. doi:10.1590/S1516-89132012000400005.
- Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SMA. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus*. 2013; 2:154-166. doi:10.1186/2193-1801-2-154.
- Guimarães LHS et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37(4):474-480. doi:10.1590/S1517-83822006000400014.
- Kamat T, Rodrigues C, Naik CG. Marine-derived fungi as a source of proteases. *Indian Journal of Marine Sciences*. 2008; 37(3):326-328.
- Kudryavtseva NN, Gvozdeva EL, Sof'in AV, Valueva TA. The influence of cultural medium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010; 46(3):324-330. doi:10.1134/S0003683810030130.
- Kumar PG, Suneetha V. A cocktail enzyme – pectinase from fruit industrial dump sites: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2014; 5(2):1252-1259, 2014.
- McDonald P, Henderson AR, Heront SJE. The biochemistry of silage. 2nd ed. Marlow: Chalcome, 1991.
- Mohanasrinivasan V, Shankar V, Elizabeth R, Soumya AR, Devi CS. Isolation, screening and identification of protease producing fungi from rhizosphere soil and optimisation of pH, incubation time and inducer concentration for enhanced protease production. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012; 3(2):B784-793.
- Moreno ML, Pérez D, García MT, Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*. 2013; 3(1):38-51. doi:10.3390/life3010038.
- Pasha KM, Anuradha P, Rao DS. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013; 4(2):B1205-1209.
- Pathak S, Narula N. Optimization of pH for the production of amylase by soil mycotic flora of Jabalpur region. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013; 2(1):17-22.

- Reddy PL, Sreeramulu A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2012; 1(3):186-193.
- Rottava I et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (-) β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol. *LWT - Food Science and Technology*. 2010; 43(7):1128-1131. doi:10.1016/j.lwt.2010.03.001.
- Sadhu S, Maiti TK. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*. 2013; 3(3):235-258. doi:10.9734/BMRJ/2013/2367.
- Saleem A, Ebrahim MKH. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*. 2014; 8(2):90-97. doi:10.1016/j.jtusci.2013.09.002.
- Soares IA et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2010; 30(3):700-705. doi:10.1590/S0101-20612010000300021.
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of fermentation technology*. 2nd ed. Burlington: Butterworth Heinemann, 2000.

Recebido em: 03/12/2014
Received in: 12/03/2014

Aprovado em: 25/05/2015
Approved in: 05/25/2015