

MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS E ENZIMAS TERMOESTÁVEIS DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL

Andréia Boechat Delatorre

Doutoranda em Produção Vegetal/UENF/RJ
andriadelatorre@hotmail.com

Silvânia Alves Ladeira

Doutoranda em Produção Vegetal/UENF/RJ
silvanialadeira@gmail.com

Marcela Vicente Vieira Andrade

Doutoranda em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/UFRJ/RJ
Marcelandrade14@yahoo.com.br

João Batista Barbosa

Mestrando em Produção Vegetal/UENF/RJ
joaotla@yahoo.com.br

Meire Lelis Leal Martins

PhD em Biologia Molecular e Microbiologia/University of Sheffield/Inglaterra
meire@uenf.br

RESUMO

Enzimas de microrganismos termofílicos são superiores as enzimas tradicionais porque podem realizar processos industriais nas quais proteínas convencionais são completamente desnaturadas. Portanto, enzimas de microrganismos termofílicos têm grande relevância industrial. Neste contexto este trabalho apresenta algumas destas enzimas de importância industrial bem como suas características e aplicações.

Palavras-chave: Microrganismos termofílicos, amilases, proteases, pectinases, celulases.

ABSTRACT

Enzymes derived from thermophilic microorganisms are superior to the traditional catalysts because they can perform industrial processes under which conventional proteins are completely denatured. Therefore, enzymes from thermophilic microorganisms have industrial relevance. In this work it is presented some of these enzymes of industrial importance as well as its characteristics and applications.

Key words: Thermophilic microorganisms, amylases, proteases, pectinases, cellulases.

1. Introdução

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas acima de 55°C são chamados microrganismos termofílicos e são classificados como bactérias ou *archae*. As enzimas produzidas por estes microrganismos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis (Tolner et al., 1997; Vieille e Zeikus, 1996; Andrade et al., 1999).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos significativamente reduzidos (Haki & Rakshit, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e Antranikian, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação (Nascimento, 2005).

Considerando as aplicações tecnológicas de enzimas sob as condições que a indústria exige, o grupo de enzimas já conhecido não é suficiente. Assim, a busca por novas fontes microbianas é um exercício contínuo (Kumar e Takagi, 1999).

2. Revisão

A vida em ambientes extremos revela-se, cada vez mais, um fascinante campo de investigação das Ciências.

A capacidade de adaptação a alterações ambientais é uma das características mais impressionantes da vida na terra. A adaptação de microrganismos em condições ambientais extremas obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para conseguir a sobrevivência. Estas estratégias implicam na estabilização de todos os componentes celulares de modo que sua funcionalidade seja mantida em condições que seriam danosas para a maioria das biomoléculas dos organismos mesofílicos (Santos et al., 2001).

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados microrganismos termofílicos ou termófilos e são classificados em termófilos moderados, quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55°C; termófilos extremos, quando seu crescimento se dá em temperaturas de 65°C a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando cresce entre 85°C até 110°C. Os microrganismos termófilos moderados podem ser encontrados dentro dos domínios Bactéria, Archaea e Eukarya (fungos filamentosos); os microrganismos termófilos extremos serão encontrados dentro dos domínios Bactéria e Archaea; e os hipertermófilos apenas serão encontrados dentro do domínio Archaea (Madigan e Oren, 1999).

A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos. (Gomes et al., 2007).

As macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos são inativadas irreversivelmente pelo calor, mas em microrganismos termofílicos estes componentes são mais estáveis (Ward e Young, 1988). As enzimas produzidas por estes microrganismos possuem temperatura ótima de atividade próxima a temperatura ótima de seu crescimento (Brock, 1985).

As diferenças entre as membranas de termófilos e de mesófilos consistem, principalmente, na substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, de modo que a membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas. Os ácidos graxos saturados geram ambiente mais fortemente hidrofóbico que os insaturados, auxiliando na estabilidade da membrana em altas temperaturas. (Haki e Rakshit, 2003).

A manutenção da estrutura do DNA é um fator imprescindível para a estabilidade de organismos

termófilos, principalmente dos hipertermófilos. No citoplasma desses últimos tem sido detectada grande quantidade de 2,3-difosfoglicerato cíclico de potássio, cuja função é impedir danos químicos na molécula de DNA, como a despurinação que pode ocorrer em altas temperaturas (Gomes et al., 2007). Ainda, todos os hipertermófilos produzem uma única forma diferenciada de DNA topoisomerase chamada DNA Girase Reversa, a qual introduz superenovelamentos positivos no DNA, em contraste com os superenovelamentos negativos gerados pela DNA Girase convencional. O superenovelamento positivo promove maior resistência do DNA à desnaturação térmica (Haki e Rakshit, 2003; Stetter, 1999). Sequências codificantes de termófilos possuem altos teores de purinas, principalmente adenina (A), sugerindo que esse nucleotídeo exerce função adaptativa de estabilização da estrutura do RNA (Singer e Hickey, 2003).

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termo-estabilidade (Gomes et al., 2007; Egorova e Antranikian, 2005).

As proteínas de microrganismos termófilos apresentam seqüências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas. Algumas diferenças na composição de aminoácidos, nos mecanismos de manutenção do enovelamento e da estabilização da estrutura foram constatadas entre enzimas de mesófilos e termófilos, porém, os fatores de pressão seletiva (pressão, pH, temperatura) e as variações filogenéticas devem ser considerados (Niehaus et al., 1999).

A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra. Algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, porém, para a maioria, a desnaturação é irreversível (Gomes et al., 2007).

A estrutura espacial das proteínas é determinada por forças eletrostáticas entre grupos polares e ionizados e por efeitos hidrofóbico envolvendo resíduos apolares (Jaenicke e Bohm, 1998). O efeito hidrofóbico é o principal mecanismo de termoestabilidade intrínseca da proteína e direciona o enovelamento, que resulta na estrutura nativa da molécula e diminui sua tendência ao desdobramento, tornando a molécula menos flexível e menos exposta a degradação por altas temperaturas. Além da diminuição da exposição de aminoácidos termolábeis (Egorova e Antranikian, 2005). A maioria das termozimas descritas apresenta altos teores de aminoácidos hidrofóbicos e com resíduos aromáticos. Os aminoácidos mais hidrofóbicos são Isoleucina (Ile), Valina (Val), Leucina (Leu), Fenilalanina (Phe), Cys e Met. Tanto a integridade dos aminoácidos formadores da proteína, quanto à formação do núcleo hidrofóbico são essenciais para a sua viabilidade (Jaenicke e Bohm, 1998).

A elevada rigidez intrínseca da proteína termofílica, decorrente da estabilidade do enovelamento, requer alta temperatura de atividade (maior que 40 °C) para promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína às temperaturas extremas parece ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (Shiraki et al., 2001). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (Gomes et al., 2007).

Diferentes proteínas são desnaturadas em diferentes temperaturas. O calor fornece energia para romper as interações não-covalentes (pontes de hidrogênio e ligações iônicas), que estabilizam a estrutura nativa da proteína, expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos presentes no seu interior (Araújo, 1995). Um aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode torna-se grande o suficiente para desfazer a estrutura primária da proteína (Campbell, 2001).

O mecanismo de desnaturação por efeito da temperatura é altamente complexo e envolve primeiramente desestabilização da maioria das interações não-covalentes. As pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van der Waals são interações exotérmicas, sendo desestabilizadas à alta temperatura e estabilizadas à baixa

temperatura. Porém, como as pontes de hidrogênio se encontram no interior da cadeia peptídica, elas são mais estáveis em uma faixa mais ampla de temperatura. De outro lado, as interações hidrofóbicas são endotérmicas, sendo estabilizadas em temperaturas elevadas e desestabilizadas em temperatura baixa. Assim, com o aumento da temperatura a estabilidade nestes dois tipos de interações se opõe.

A descoberta de microrganismos termofílicos abriu novas oportunidades para descoberta de enzimas, que apresentam atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999; Andrade et al., 1999; Banerjee et al., 1999).

A descoberta de microrganismos termofílicos abriu novas oportunidades para descoberta de enzimas, que apresentam atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999). As enzimas termofílicas têm se mostrado tolerantes a desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, sendo então, de interesse em síntese orgânica (Atomi, 2005).

Apesar dessas vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de microrganismos termofílicos tem sido muito limitada até agora. As razões para esta contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas, disponíveis em coleções (Aquino, 2000).

Atualmente, novos grupos de pesquisa têm incursionado no campo das temperaturas extremas, particularmente motivados pelos interesses emergentes das bio-indústrias por organismos termofílicos e em particular, por suas enzimas.

O crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por termofílicos é motivado por sua capacidade de trabalhar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (Hough e Danson, 1999).

Enzimas produzidas por microrganismos que crescem sob altas temperaturas apresentam tantas aplicações biotecnológicas quanto maior a termoestabilidade da biocatálise, além de proverem dados sobre as bases intrínsecas da estabilidade protéica.

2.1. Proteases

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo (Banerjee et al., 1999).

As proteases formam o grupo de enzimas que ocupa a posição mais privilegiada nos campos fisiológicos e comerciais. São enzimas proteolíticas (catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas) de importância fundamental para o metabolismo e para o sucesso dos processos fisiológicos necessários à manutenção da vida. (Rao et al, 1998, Toshihiko et al, 1999).

A grande variedade de proteases em contraste com sua elevada especificidade de ação tem atraído atenção mundial devido à possibilidade de sua exploração para aplicações fisiológicas e biotecnológicas (Tunga et al., 2003).

As enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas comercialmente e representam cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo, sendo sua aplicação predominante (35%) na indústria de detergentes (Beg et al., 2002).

Rahman et al. (1994) e Razak et al. (1997) reportaram que o *Bacillus stearothermophilus* produziu proteases termoestáveis à uma temperatura ótima de atividade de 60 °C. Gey e Unger (1995) reportaram outra cepa de *Bacillus stearothermophilus* TP26 como sendo produtor de proteases extracelulares com temperatura ótima de atividade a 75 °C. Duas importantes proteases alcalinas utilizadas na indústria de detergentes a subtilisina Calberg, produzida por *Bacillus licheniformis* e subtilisina Novo ou “Bacterial Protease Nagase” (BPN) produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, possuem temperaturas ótimas a 60 °C (Horikoshi, 1990).

Manachini e Fortina (1998) em estudos realizados com uma cepa de *Bacillus licheniformis* SMI 4.C.1. isolado de águas marinhas e produtor de proteases alcalinas, citam que a melhor atividade da enzima foi

observada na temperatura de 70 °C quando o ensaio foi realizado no pH 9 (pH ótimo). A enzima manteve 60% da sua atividade após 30 minutos de aquecimento a 70 °C.

As proteases utilizadas na indústria de detergentes resistem à valores de pH que variam de 9-13, são termoestáveis e consistem geralmente em serino proteases secretadas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. As metaloproteases não podem ser utilizadas devido à presença de agentes quelantes nas soluções de detergentes, que podem reduzir a atividade destas enzimas por sequestrarem os íons metálicos necessários para seu mecanismo catalítico (Wiseman, 1985).

Vários trabalhos mostraram que os íons cálcio possuem um papel importante na estabilização das proteases em temperaturas elevadas. De acordo com Beg e Gupta (2003) os íons cálcio têm sido reconhecidos como estabilizadores de enzimas em elevadas temperaturas, além de contribuírem para o aumento da estabilidade térmica de algumas enzimas. Porém, eles verificaram que a presença destes íons afetou a estabilidade térmica de protease produzida por *Bacillus mojavenensis* somente nas temperaturas de 60 e 65 °C, não sendo encontrado nenhuma interferência ou efeito estabilizador em temperaturas maiores que 70°C. De acordo com o autor, o papel do cálcio na estabilização enzimática está ligado à manutenção da conformação do sítio ativo da enzima em elevadas temperaturas.

Vários pesquisadores (Ghorbel et al., 2003; Khalel e Grupta, 2003; Joo et al., 2002; Singh et al., 2001; Banerjee et al., 1999) tem demonstrado que a adição de metais ao extrato bruto de algumas enzimas, promove o aumento da termoestabilidade das mesmas.

Geralmente ligantes de Ca⁺² são grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e essas ligações aumentam a termoestabilidade das cadeias polipeptídicas por redução de sua flexibilidade (Ward e Young, 1998).

2.2. Amilases

As amilases, tanto no grupo dos eucariotos como no grupo dos procariotos, atuam como uma das principais enzimas responsáveis pela obtenção de energia para as funções metabólicas, a partir do amido como fonte de carbono. Porém, na maioria dos eucariotos, estas enzimas atuam em tecidos ou órgãos específicos, relacionados à nutrição do organismo, o que inviabiliza, na maioria dos casos, a sua extração e purificação para o uso comercial. Assim, os microrganismos termofílicos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas, uma vez que requerem condições muitas vezes mínimas de nutrição e de manutenção, apresentam alta eficiência na produção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular.

As enzimas de maior importância na hidrólise do amido são (Vihinem e Mäntsälä, 1989; Antranikian et al., 1991): α -amilases (E.C.3.2.1.1 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase) - correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 liberando maltose, glicose e dextrina. São produzidas, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus*, e por fungos como os *Aspergillus*; β -amilases (E.C.3.2.1.2 1,4- α -D-glucano maltohidrolase) - exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula liberando maltose, não sendo capazes de hidrolisar ligações α -1,6 dos substratos ramificados. São produzidas por algumas espécies de *Bacillus* e *Clostridium thermosulfurogenes* com características termoestáveis; Glicoamilases (E.C.3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glicohidrolase) - são exoamilases que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio através da hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. Pululanases (E.C.3.2.1.41 pullulan 6-glicohidrolase) - são enzimas desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α ou β -amilase.

As α -amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial. As α -amilases produzidas por várias espécies de *Bacillus* diferem entre si quanto à faixa ótima de pH, temperatura, estabilidade da enzima, além de outros fatores fisiológicos inerentes a cada

espécie. Portanto, as enzimas de diferentes origens têm aplicabilidades específicas em diferentes setores (Chandra et al., 1980).

Uma grande variedade de microrganismos produz um ou mais tipos de amilases, e sabe-se que as amilases produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que as produzidas pelos microrganismos mesofílicos. Essas amilases termoestáveis são de grande interesse na indústria de processamento do amido, uma vez que a temperatura de gelatinização do mesmo fica em torno dos 70°C.

Inúmeros trabalhos têm reportado a produção de amilases por microrganismos termofílicos. Campbell (1995) isolou e purificou α -amilase produzida pelo *Bacillus coagulans*. Esta enzima mantém 90% da sua atividade após uma hora a 90°C. Hartman et al. (1995), verificaram que α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* permaneceu ativa após 12 horas a 90°C. A enzima produzida por este microrganismo é mais termoestável do que a secretada pelo *Bacillus subtilis*.

Madsen et al (1973) e Chiang et al (1979) isolaram de diferentes linhagens de *Bacillus licheniformis* uma α -amilase termoestável e ativa em solução de amido a temperaturas superiores a 100°C, que recebeu a denominação comercial de Thermamyl e Taka Therm.

Amilase de *Bacillus* sp. PN5 teve sua atividade evidenciada a 90°C. Após 6 horas de incubação nesta mesma temperatura a enzima ainda exibia 90% de atividade (Saxena et al., 2007).

As amilases, principalmente a α -amilase, apresentam amplo espectro de aplicações industriais como na indústria de alimentos, para a obtenção de xaropes ricos em glicose e frutose que, posteriormente, são utilizados como adoçantes em refrigerantes; panificação, onde melhoram as características organolépticas do produto; têxtil, para degradar o amido que é aplicado nos fios protegendo-os de danos estruturais durante a tecelagem; papel, na remoção da camada de amido utilizada para proteção do mesmo contra danos mecânicos durante o processamento e também nas etapas de finalização da sua produção; detergentes, na remoção de manchas amiláceas (Kirk et al., 2002, Gupta et al., 2003; Kandra, 2003).

A produção industrial de glicose tem início com a liquefação do amido, geralmente realizada em dois passos: um primeiro estágio de 5 a 15 minutos a 105-107°C, seguido de um segundo estágio de 60 a 80 minutos à 95-98°C, em concentrações de amido de no máximo 38% e pH com valores entre 5,8 e 6,2. As α -amilases termoestáveis, derivadas geralmente de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus stearothermophilus*, são adicionadas ao processo gerando, ao final da liquefação, um hidrolisado claro, negativo ao teste com iodo e com valor de aproximadamente de 10 a 18 (valor equivalente em dextrose, que se refere à porcentagem de açúcares redutores, calculado como glicose) (Brumm, 1998). O objetivo da liquefação é converter uma suspensão concentrada de amido granular purificado em uma solução de solúveis, ou seja, dextrinas com comprimentos de cadeias curtas (Crabb e Mitchinson, 1997).

Na indústria de detergentes as α -amilases têm sido utilizadas em detergentes em pó de lavanderias desde 1975. Hoje em dia 90% dos detergentes líquidos contêm α -amilase. Elas são utilizadas em detergentes para remoção de manchas contendo amido, chocolate, comida de bebê, entre outras (Kottwitz et al., 1999). Uma moderna tendência entre consumidores é de usar água fria para lavar roupas e louças. Nessas baixas temperaturas, a remoção do amido das roupas e porcelanas torna-se mais problemática. Detergentes contendo α -amilase otimizam o trabalho em temperaturas moderadas e pH alcalino podendo ajudar a resolver esse problema.

2.3. Pectinases

A aplicação comercial das pectinases iniciou por volta de 1930 com a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 1960, a composição química dos tecidos de plantas foi elucidada e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (Ortega et al., 2004).

Na extração de sucos de uva para produção de vinhos, a fruta macerada é submetida a um tratamento térmico de 80°C para desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do "pulp wash", a polpa da laranja resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90 °C para desnaturar a pectina esterase da fruta, que causa problemas de coagulação da pectina. Além da desnaturação das

enzimas, o tratamento térmico tem por finalidade a pasteurização dos sucos e mostos, a fim de reduzir microflora contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50 °C para tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis. O uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos (Gomes et al., 2007).

As pectinases são responsáveis pela degradação de pectina, uma molécula complexa, constituída basicamente por polissacarídeos estruturais parcialmente metoxilados, os quais estão presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Atualmente estas enzimas possuem várias aplicações biotecnológicas sendo consideradas como destaque no setor industrial. Assim, encontram aplicação na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, na extração de óleos essenciais, na produção de alimentos para recém-nascidos, na fermentação do café e cacau, além de outras, como na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho e o ramie (Ustok et al., 2007).

A pectina desmetoxilada é chamada ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Microrganismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, ou mesmo, pela ação da enzima pectinaesterease (EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeliminativa (Sharma e Satyanarayana, 2006).

A classificação das enzimas pécticas envolve dois grupos, a saber: a) aquelas que promovem a despolimerização das ligações glicosídicas do polímero péctico por hidrólises (hidrolases) ou por ação transeliminativa (liases), e b) as que promovem a saponificação das substâncias pécticas (pectinaesterases). (As hidrolases são denominadas poligalacturonases e são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a cadeia de pectato, em endopoligalacturonases (endo-PG) ou poli (α-1,4-D-galacturonato) glicano-hidrolase (EC 3.2.1.15), as quais produzem uma série de oligogalacturonatos, tais como, mono, di, tri, e os tetragalacturonatos e exopoligalacturonases (exo-PG), classificadas como poli (α-1,4-Dgalacturonato) galacturono-hidrolase (EC 3.2.1.87) que atuam nas extremidades da cadeia de pectato (Jayani et al., 2005).

Comparativamente com outras enzimas, poucos trabalhos têm sido reportados sobre a produção de pectinases por via biotecnológica. Destes, a maior parte envolve a produção de pectinases por microrganismos mesofílicos (Ali e Brady, 1982). Entretanto, enzimas de microrganismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por causa de suas características especiais, como estabilidade térmica e às altas mudanças de pH.

A produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo pectina cítrica foi estudada por Cordeiro e Martins (2009). A temperatura ótima desta enzima foi 70 °C. A enzima manteve 62% e 58% de sua atividade máxima quando incubada por 2 horas a 40 e 90 °C, respectivamente. O pH ótimo para atividade da enzima foi 7,0. A enzima manteve 90% e 75% de sua atividade máxima quando incubada a pH8,0 e 8,5, respectivamente, por 24 horas, a temperatura ambiente.

Temperaturas ótimas de 60°C foram relatadas para pectinases de *Bacillus* sp. MG-cp-2 (Kapoor et al. 2002) e *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg et al. 2001), enquanto que temperaturas ótimas mais baixas entre 45°C e 50°C foram relatadas para pectinases de *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al. 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Blanco et al. 1998), respectivamente.

A utilização de enzimas termoestáveis como a poligalacturonase em diversos processos industriais é vantajosa, porque altas temperaturas podem ser empregadas no processo com a conseqüente redução do risco de contaminação microbiana, a maior parte dos reagentes torna-se mais solúvel difundindo-se mais rapidamente e assim permitindo que concentrações maiores destes compostos possam ser usadas, aumento da taxa de transferência e aumento da solubilidade dos substratos, etc (Wang et al. 2007).

2.4. Celulases

Celulases são enzimas capazes de atuar sobre os materiais celulósicos promovendo sua hidrólise. Neste processo estão envolvidos três principais grupos de enzimas: β-1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4), β-1,4-exoglucanase, que são representadas pelas celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) e o grupo representado pelas β-1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21). (Lynd et al, 2002). As carboximetilcelulases (β-1,4-

endoglucanase) clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglicanases) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Por outro lado, as β -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e os hidrolisam a glicose. (Phillipidis e Smith, 1995; Teeri, 1997; Lynd et al. 2002; Howard et al., 2003; Bisaria e Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000; Lee et al., 2002; Lynd et al., 2002).

As celulasas, juntamente com as hemicelulasas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e são amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria. Na indústria de alimentos, são empregadas nos processos de extração e clarificação de sucos de frutas. As celulasas são também empregadas na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão, rações animais, produtos estimuladores de ensilagem, adjuvante para o malte da cerveja e no tratamento de lixo orgânico (Bhat, 2000). Também são empregadas em formulações de detergentes domésticos e industriais. Na área energética, as celulasas vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando à fabricação de produtos de interesse, tal como etanol (Kubicek *et al.*, 1993). Celulasas são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas. Em 2008, estas enzimas movimentaram um montante de USD 1,35 milhões (Pereira Jr et al., 2010).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas (Castro et al., 2010; Lynd et al., 2002). Para a degradação da celulose microcristalina, que é insolúvel em água devido a sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulasas termoestáveis ativas a altas temperaturas (Haki e Rakshit, 2003). Devido a este fato, as celulasas termoestáveis de microrganismos termofílicos passaram a ser mais estudados e caracterizados (Krishna e Varma, 1990; Maheshwari *et al.*, 2000).

A pesquisa por celulasas termoestáveis têm-se intensificado nos últimos anos e o domínio *Archae* tem sido pesquisado com maior ênfase. Genes codificadores de enzimas celulásicas de microrganismos termófilos degradadores de celulose foram clonados e as enzimas correspondentes purificadas e caracterizadas (Niehaus et al., 1999). Entre os microrganismos do domínio *Archae*, incluem-se *Pyrococcus furiosus* e *Pyrococcus horikoshi*, espécies do gênero *Sulfolobus* como produtores de β -glicosidases e o gênero *Thermotoga*, com suas endoglicanases e exoglicanases sendo purificadas e caracterizadas (Niehaus et al., 1999; Haki e Rakshit, 2003).

Alem de serem novas opções para a produção de celulasas termoestáveis, os microrganismos termofílicos, sintetizam celulasas resistentes a valores de pH alcalino e ácido. Também conseguem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menores riscos de contaminação por outros microrganismos.

Makky (2010) investigou a produção de celulasas (avicelase) pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana de açúcar. Esta enzima apresentou pH e temperatura ótimas para atividade a 7,0 e 50°C, respectivamente. Alem disso, mostrou boa estabilidade entre temperaturas variando de 30-80°C.

A temperatura e o pH para a atividade ótima da enzima carboximetilcelulase produzida por *Bacillus* sp VGI foi 65°C e 9-10, respectivamente (Singh et al., 2001). Para a cepa *Bacillus* ferm bp-3431, foi 55°C (Saito et al. 1994) a pH 9,5-10,5, 45°C para *Bacillus* sp. KSM-S237 a pH 8,6-9,0 (Hakamada et al., 1997) e 40°C para *Bacillus* sp. CBS 670.93 a pH 6-10 (Van Solingen 1999). Em relação a estabilidade térmica, a carboximetilcelulase de *Bacillus* sp VGI apresentou uma meia vida de 720 min a 60° C, 420 min a 70° C, 180 min a 80°C, 70 min a 90°C e 12 min a 100°C. Alem disso, mais de 75% de atividade foi retida até mesmo após 6 horas de incubação a 60° C entre valores de pH de 7 a 10.

Celulasas produzidas pela bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527 demonstraram boa atividade entre temperaturas de 50 a 70 °C com máxima atividade a 70 °C. Embora as atividades foram drasticamente reduzidas a 80 °C, 25% do potencial máximo celulolítico foi ainda retido até mesmo a 100 °C, tornando estas enzimas muito promissoras para a engenharia genética de proteínas, a fim de melhorar sua tolerância para a degradação de celulose a altas temperaturas (Liang et al., 2010).

3. Conclusões

Microrganismos termofílicos vêm sendo investigados em função, principalmente, das bio-indústrias emergentes. O grande interesse está relacionado ao seu crescimento em várias escalas e à otimização dos bioprocessos sob condições de altas temperaturas. Particularmente, a descoberta de enzimas termoestáveis vem revolucionando o mercado industrial, com suas inúmeras aplicações biotecnológicas. Estas enzimas são principalmente hidrolases extracelulares e incluem as proteases, amilases, pectinases e celulases e têm recebido considerável atenção da indústria por serem termoresistentes e por possuírem características importantes como estabilidade à temperatura e ao pH. Por isso, o isolamento de bactérias termofílicas para a produção de enzimas com novas propriedades é um objeto de grande relevância para a comunidade científica.

4. Referências

- ALI, Z. M.; BRADY, C. J. Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruits. *Aust J Plant Physiol.* V. 9, p. 155-169, 1982.
- ANDRADE, C. M. M. C., PEREIRA-JR., N., ANTRANIKIAN, G. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia.* V. 30, p. 287-298, 1999.
- ANTRANIKIAN, G. Microbial degradation of starch, Microbial degradation of natural products (Winkelmann, G., ed.) pp. 28256, Weinheim, Germany. 1991
- AQUINO, A. C. M. M; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology Biotechnology.* v. 61, p. 323-328, 2003.
- ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. Viçosa-UFV, *Imprensa Universitária*, p. 335, 1995.
- ATOMI, H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Microbiology.* v. 9 166-173, 2005.
- BANERJEE, U. C., SANI, R. K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35:213-219, 1999.
- BEG, Q. K.; GUPTA, R. (2003). Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* v. 32, p. 294-304, 2003.
- 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. 78, p. 289-295, 2002.
- BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BLANCO, M.; URIOS, A.; MARTINEZ, A. New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutat. Res.* v. 413, p. 95-101, 1998.
- BISARIA, V. S. & GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 3, p. 90-104, 1981.

- BROCK, T. D. Life at high temperatures. *Science*. v. 230, p. 132-138, 1985.
- BRUMM, P. J. Enzymatic production of dextrose. *Cereal Food World*, v. 40, p. 804-807, 1998.
- Campbell, M. K. *Bioquímica*. 3 Ed. Editora Artmed. Porto Alegre. P. 752, 2001.
- CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiology Biotechnology*. v. 37, p. 151-158, 2010.
- Chandra P, Ioffe LB, Sherrington D. Possible glassiness in a periodic long-range Josephson array. *Phys Rev Lett*. v. 75, n. 4, p. 713-716, Jul, 1995.
- CORDEIRO, C. A. M. & MARTINS, M. L. L. (2009). Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 135-141, 2009.
- CRABB, W. D. & MITCHINSON, C. Enzyme involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, v. 2, p. 252-256, 1997.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial *Química Nova*. V. 30, No. 1, 136-145, 2007.
- GHORBEL, B., KAMOUN, A. S.; NASRI, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 32, p. 513-518, 2003.
- CHIANG, J. P., ALTER, J. E., STERNBERGELKHAMR, T. (1979) Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Die Starke*. v. 31, p. 86-92, 1979.
- EGOROVA, K. & ANTRANIKIAN, G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol*. V. 8, n. 6, p. 649-655, 2005.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- GEY, M. & UNGER, K. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. *J. Chromatogr*. V. 166, p. 188-193, 1995.
- HAKAMADA, Y.; KOIKE, K.; YOSHIMATSU, T.; MORI, H.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM- 237. *Extremophiles*. v. 1, p. 151-156, 1997.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. V. 89, p. 17-34, 2003.
- HARTMANN, M.; MILLER, R.E.; TOENNIES, J.P.; VILESOV, A. Rotationally Resolved Spectroscopy of SF₆ in Liquid Helium Clusters: A Molecular Probe of Cluster Temperature. *Phys. Rev. Lett*. V. 75, p. 1566-1569, 1995.
- HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 735-750, 1999.
- HOUGH, D. W.; DANSON, M.J. Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*, v. 3, p. 39-46, 1999.

- HOWARD, R. L.; MASOKO, P.; ABOTSI, E. Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. V. 2, n. 9, p. 296-300, 2003.
- JAENICKE, R. & BÖHM, G. The stability of Proteins in Extreme Environments. *Currents Opinion in Structural Biology*. V. 8, p. 738-748, 1998.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. V. 40, p. 2931–2944, 2005.
- JOO, H.; KUMAR, C. G.; PARK, G.; KIM, K. T.; PAIK, S. R.; CHANG, C. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 155-159, 2002.
- KANDRA, L. α -Amylases of medical and industrial importance. *J. of Mol. Struct. :Theochem*. v. 487, p. 666-667, 2003.
- KHALIL B. Q. & GUPT, R. Purification and characterization of an oxidation-stable thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzymes and Microbiol. Technology*. V. 32, p. 294-304, 2003.
- KIRK, O., BORCHERT, T.V., FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 343-351, 2002.
- KOTTWITZ, B., SPECKMANN, H.-D., MAURER, K.-H., AND NITSCH, C. Detergents containing amylase. WO99/63039 (patent). *International search report*. Henkel KgaA, Düsseldorf, Germany, 1999.
- KRISHNA L.; GUPTA V. K.; MASAND M. R. Pathomorphological study of possible glanders in solipeds in Himachal Pradesh. *Ind. Vet. J.* v. 69, p. 211-214, 1992.
- KUBICEK C. P.; MESSNER R.; GRUBER F.; MACH R.L; KUBICEK-PRANZ E.M. (). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 15, p. 90–99, 1993.
- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. (). Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. V. 17, p. 561-594, 1999.
- LEE, D. W.; KIM, H. W.; LEE, K.W.; KIM, B. C.; CHOE, E. A.; LEE, H.S.; KIM, D. S.; PYUN, Y. R. Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 29, p. 363-371, 2001.
- LIANG, Y., FENG, Z., YESUF, J., BLACKBURN, J.W. Optimization of Growth Medium and Enzyme Assay Conditions for Crude Cellulases Produced by a Novel Thermophilic and Cellulolytic Bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 60, p. 1841–1852, 2010.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN, Z. Y. L, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. *American Society for Microbiology*. v. 66, n.3, p. 506-577, 2002.
- MADIGAN, M. T. & OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles, *Current Opinion in Microbiology*. v. 2, p. 265-269, 1999.

- MADSEN, G. B.; NORMAN, B. E.; SLOTT, S. A new heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. *Die Starke*. v. 25, p. 304-308, 1973.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p. 461-488, Sept, 2000.
- MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Applied Microbiology*. V. 28, p. 409-413, 1988.
- 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, p. 91-96, 2004.
- NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 51, p. 711-29, 1999.
- ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*. v. 88, p. 209-217, 2004.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N.; (). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos Agroindustriais. *Química Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.
- PHILLIPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 51/52, p. 117-124, 1995.
- RAHMAN, R. N. Z. A.; RAZAK, C. N.; AMPON, K.; BASRI, M.; YUNUS, W. M. Z.; SALLEH, A. B. Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiotechnol.* V. 40, p. 822-827, 1994.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p. 597-635, 1998.
- RAZAK C. N. A. R.; RAHMAN R. N. Z. A.; AMPON K.; BASRI M.; WAN YUNUS W. M. Z.; SALLEH A. B. Production of thermostable alkaline serine protease by a new strain of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biosci.*, v. 6, p. 94-100, 1995.
- RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 58, p. 578-583, 1992.
- SAITO, K.; SEKO, M.; MASATSUJI, E. Detergent comprising isolated cellulase from *Bacillus* ferm bp-3431 or a mutant strain thereof, surfactant & builder. US patent: 5,314,637, 1994.
- SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M.; Extremófilos: Microrganismos à prova de Agressões Ambientais Extremas. *Biotechnologia Microbiana: Boletim de Biotechnologia*. n.2, 2001.
- SAXENA ET AL., K.R. SAXENA, K. DUTT, L. AGARWAL AND P. NAYYAR, A highly and thermostable alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5, *Bioresource Technology* 98 (2007), pp. 260-265, 2007.

- SHARMA, D. C. & SATYANARAYANA, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 727–733, 2006.
- SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA T. Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. *Eur J Biochemistry*. V.268, n. 15, p. 4144–4150, Aug, 2001.
- SINGER, G. A. & HICKEY, D. A. Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*. V. 317, p. 39-47, 2003.
- SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v. 2, p. 27-32, 2007.
- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R.C. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. V. 17, p. 761–765, 2001.
- STETTER, K. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett*. V. 452, p. 22–25, 1999.
- TAKEUCHI, T.; SHUMAN, M.A.; CRAIK, C. H. S. Reverse biochemistry: Use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membranetype serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 96, p. 11054–11061, 1999.
- TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends Biotechnol*. V. 15, p. 160-167, 1997.
- TOLNER, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.118A. v. 3, p. 423-428, 1997.
- TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1553-1558, 2003.
- USTOK F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal Biotechnology*. v. 127, p. 322-334, 2007.
- VAN SOLINGEN, P. Alkaline cellulase and method of producing the same. US patent: 5,856,165, 1999.
- VIEILLE, C. & ZEIKUS, J. G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Tibtech*. V. 14, p. 183-190, 1996.
- VIHINEN, M. & MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. V. 24, p. 329-410, 1989.
- YANNA L.; ZISONG F.; JEMIL Y.; JAMES W.; BLACKBURN. Optimization of Growth Medium and Enzyme Assay Conditions for Crude Cellulases Produced by a Novel Thermophilic and Cellulolytic Bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V. 160, p. 1841–1852, 2010.

WANG, Q.; FAN, X.; HUAB, Z.; CHENB, J. Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. v. 34, p. 107–113, 2007.

WARD, O. P.; YOUNG, M. M. Thermostable Enzymes. *Biotechnology Adv.* V. 6, p. 39-69, 1988.

WISEMAN, A. Manual de Biotecnologia de los enzimas. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, 1985.

ZEILINGER, S.; HALLER, M.; MACH, R.; KUBICEK, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 277, p. 581-588.

WANG, Q; FAN, X; HUAB, Z; CHENB, J. Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 34, p. 107–113, 2007.