

SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. PARA PRODUÇÃO DE ESTERASES E MELHORAMENTO DE *Bacillus cereus* (C124)

SELECTION OF *Bacillus* spp. FOR ESTERASE PRODUCTION AND GENETIC IMPROVEMENT OF *Bacillus cereus* (C124)

Analucia Longman Mendonça*, Rosa de Lima Ramos Mariano**,
Janete Magali de Araújo*** & Uided Maaze T. Cavalcante**

*ITEP, Depto. de Química e Biotecnologia, Cidade Universitária, 50740-540, Recife, PE. **UFRPE, Depto. de Agronomia, Fitossanidade, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE. ***UFPE, Depto. De Antibióticos, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE.

ABSTRACT

Forty-four *Bacillus* spp. strains obtained from sugar cane derivatives and residues, six of them isolated in this work, were tested using Tween 80 as substrate (agar-Tween 80 medium), in order to determine their esterase activity through the enzymatic index averages. After statistic analysis, *B. cereus* (C124) strain, which presented better results, was submitted to genetic improvement by treatment with ultraviolet light (UV). The survival curve pointed out 28" as the time necessary to obtain 30% of survivors. Fifty survivors and the wild strain C124 were compared in relation to their esterase activity as mentioned previously. The wild strain and the mutant C124UV35, which showed enzymatic index average higher than C124, were characterized in polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE). Electrophoretic patterns for total proteins of wild and mutant strain showed different profiles according to number, position and intensity of bands. For esterase, the bands varied only in intensity.

Key words: Bacteria, genetic improvement, *Bacillus* spp., *B. cereus*, esterase.

INTRODUÇÃO

As esterases catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres alifáticos e aromáticos e a ação destas enzimas é geralmente restrita a ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas. Estas enzimas são amplamente distribuídas nos organismos vivos, como em tecidos de vertebrados, insetos, plantas, frutas cítricas, micobactérias, fungos, e em mamíferos. As esterases vêm sendo estudadas pelo seu potencial em desenvolver aroma em alimentos e na maturação de certos queijos, e, algumas esterases como a lidocaína, procaína e fenacetina possuem importância farmacológica. As esterases podem ser obtidas de microrganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, etc. (KRISCH, 1971; MATSUNAGA *et al.*, 1974; McKAY, 1993; LAMBRECHTS *et al.*, 1995).

Segundo CHRISTOV & PRIOR (1993), as esterases produzidas por microrganismos, inclusive *Bacillus subtilis*, estão envolvidas na degradação de xilana, com potencial de aplicação na nutrição animal, na indústria de polpa e papel, na síntese de derivados de carboidratos e, quando combinadas com xilanases e celulases, podem também ser aplicadas na bioconversão

* Autor para correspondência

dos resíduos lignocelulolíticos na fermentação de açúcares produzindo uma variedade de combustíveis e produtos químicos.

O desenvolvimento de mutantes para produção de enzimas comerciais constitui uma importante estratégia, que conduz frequentemente a um rendimento muito maior que o das linhagens selvagens. Através da engenharia genética foi desenvolvida a primeira enzima lipolítica, a Lipolase, produzida em escala industrial desde 1988, para a indústria de detergentes (UNDERKOFER, 1976; AUNSTRUP, 1979; GALZY, 1985; NOVO NORDISK, 1992).

MENDONÇA *et al.* (1996) realizaram pesquisa com quarenta e quatro linhagens de *Bacillus* spp., avaliando a produção de proteases, enzimas muito utilizadas na indústria de detergentes. Estas mesmas linhagens foram testadas no presente trabalho quanto à produção de esterases, visando a obtenção de uma linhagem produtora de proteases e esterases. Assim, os objetivos do presente trabalho foram isolamento e caracterização semiquantitativa de linhagens de *Bacillus* spp. quanto à produção de esterases; obtenção e seleção de mutantes com maior produção de esterases e comparação dos padrões eletroforéticos para proteínas totais e esterases da linhagem selvagem e do mutante selecionado.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens utilizadas. Foram utilizadas quarenta e quatro linhagens selvagens de *Bacillus* spp. (Tabela I) isoladas e identificadas como descrito por MENDONÇA *et al.* (1996).

Caracterização semiquantitativa de *Bacillus* spp. quanto à produção de esterases. Para a caracterização semiquantitativa das linhagens de *Bacillus* spp. quanto à produção de esterases foi utilizado o método de difusão em ágar com modificações e a atividade esterásica foi testada utilizando Tween 80 como substrato (meio ágar-Tween 80) (SIERRA, 1957; MENDONÇA *et al.*, 1996). O índice enzimático foi estimado medindo-se os dois diâmetros perpendiculares dos halos de degradação e da média computada, subtraindo-se o diâmetro do crescimento bacteriano. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente ao acaso com quarenta e quatro tratamentos e seis repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias.

Melhoramento genético de *Bacillus cereus* (C 124). Inicialmente foi realizada a curva de crescimento da linhagem selvagem de *B. cereus* (C 124), selecionada entre as melhores produtoras de esterases, para se determinar o número de células viáveis na suspensão a ser utilizada na irradiação com UV (KIRÁLI *et al.*, 1974). Para obtenção da curva de sobrevivência

foi utilizada a metodologia de AZEVEDO & COSTA (1973). De acordo com os dados obtidos através da curva de sobrevivência da linhagem C124, esta cultura foi submetida à radiação UV por 28" que corresponde a uma sobrevivência de 30 %. Dentre os sobreviventes foram escolhidas ao acaso, cinquenta colônias que foram testadas quanto à produção de esterases em comparação com a linhagem selvagem, conforme descrito por MENDONÇA *et al.* (1996). Os resultados foram analisados estatisticamente como no item anterior. Para verificação de auxotrofia do mutante selecionado, a linhagem C124 e o mutante selecionado foram cultivados por 24 h em meio AN e transferidos para placas de Petri com meio mínimo de Davies e para meio completo AN, utilizado como controle, sendo incubados por 24 h a $\pm 28^{\circ}\text{C}$.

Determinação dos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida (PAGE). A determinação dos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas totais e esterases da linhagem selvagem C124 e do mutante selecionado C124UV35 foi realizada segundo PACCOLA-MEIRELLES *et al.* (1988). Na corrida para proteínas totais foi utilizado dodecil sulfato de sódio (SDS). As determinações quantitativas de proteínas nos extratos celulares de cada amostra foram realizadas de acordo com LOWRY *et al.* (1951) e a concentração utilizada foi de 75 $\mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização semiquantitativa das linhagens selvagens de *Bacillus* spp. quanto à produção de esterases. Os resultados de atividade esterásica, expressos na forma de índice enzimático, mostram que as linhagens *Bacillus* sp. (C117) e *B. cereus* (C124) apresentaram os maiores índices, 1,07 e 0,93 cm, respectivamente (**Tabela II**). C124 não diferiu estatisticamente de 14 linhagens, as quais também não diferiram das linhagens restantes que apresentaram atividade enzimática positiva entre 0,70 e 0,84 cm.

Com relação a frequência do número de linhagens observou-se que 15, 6, 20 e 3 linhagens apresentaram, respectivamente, dimensão do halo de degradação em classes variando de 0,0 a 0,70; 0,71 a 0,80; 0,81 a 0,90 e 0,91 a 1,10 cm (**Figura I**).

TABELA I - Relação das linhagens selvagens de *Bacillus* spp. utilizadas para avaliação da atividade esterásica

Nº COLEÇÃO DA UFPE ¹	LINHAGEM	Nº DE ORIGEM ²
483	<i>Bacillus</i> sp.	BT1
484	<i>B. firmus</i>	BT2
485	<i>Bacillus</i> sp.	BM3
486	<i>B. firmus</i>	BM4
487	<i>Bacillus</i> sp.	BM5
488	<i>Bacillus</i> sp.	BM6
434	<i>B. licheniformis</i>	C 1
435	<i>B. subtilis</i>	C 6
436	<i>B. circulans</i>	C 7
438	<i>B. licheniformis</i>	C 65
439	<i>B. licheniformis</i>	C 69
440	<i>Bacillus</i> sp.	C 70
441	<i>Bacillus</i> sp.	C 77
442	<i>Bacillus</i> sp.	C 78
443	<i>B. subtilis</i>	C 81
445	<i>B. circulans</i>	C 86
446	<i>B. firmus</i>	C 101
447	<i>B. pumilus</i>	C 106
448	<i>Bacillus</i> sp.	C 107
449	<i>Bacillus</i> sp.	C 116
450	<i>Bacillus</i> sp.	C 117
451	<i>Bacillus</i> sp.	C 118
452	<i>B. cereus</i>	C 124
453	<i>Bacillus</i> sp.	C 126
454	<i>Bacillus</i> sp.	C 127
455	<i>Bacillus</i> sp.	C 128
456	<i>Bacillus</i> sp.	C 137
457	<i>B. alvei</i>	C 138
458	<i>Bacillus</i> sp.	C 145
459	<i>B. licheniformis</i>	C 156
460	<i>Bacillus</i> sp.	C 176
461	<i>B. alvei</i>	C 177
462	<i>Bacillus</i> sp.	C 179
463	<i>Bacillus</i> sp.	C 185
464	<i>Bacillus</i> sp.	C 186
465	<i>Bacillus</i> sp.	C 187
466	<i>Bacillus</i> sp.	C 188
467	<i>Bacillus</i> sp.	C 189
468	<i>B. subtilis</i>	C 197
469	<i>Bacillus</i> sp.	C 198
470	<i>B. licheniformis</i>	C 199
471	<i>B. firmus</i>	C 200
472	<i>B. pumilus</i>	C 201
474	<i>B. pumilus</i>	C 205

¹ Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.² As linhagens foram denominadas neste trabalho pelas siglas de origem.

TABELA II - Médias dos índices enzimáticos das linhagens selvagens de *Bacillus* spp. em meio ágar -Tween 80

LINHAGEM	MÉDIA ¹ (cm)	LINHAGEM	MÉDIA ¹ (cm)
C117	1,07 a	C128	0,81 efghij
C124	0,93 b	C86	0,80 fghij
C6	0,91 bc	C189	0,79 ghij
C118	0,90 bcd	BM4	0,78 hijk
C138	0,89 bcde	C81	0,78 hijk
C187	0,89 bcde	C186	0,77 ijk
C101	0,88 bcdef	C200	0,77 jk
BM6	0,87 bcdefg	C145	0,70 k
C185	0,86 bcdefgh	C188	0,70 k
C107	0,86 bcdefgh	C127	0,70 k
C201	0,86 bcdefghi	C197	0,70 k
C177	0,85 bcdefghij	C198	0,70 k
C70	0,85 bcdefghij	C176	0,70 k
C106	0,85 bcdefghij	C77	0,70 k
C69	0,85 bcdefghij	C179	0,70 k
C126	0,85 bcdefghij	C205	0,70 k
C156	0,84 cdefghij	BT1	0,70 k
C199	0,84 cdefghij	BT2	0,70 k
C65	0,83 cdefghij	BM3	0,70 k
C116	0,83 cdefghij	C78	0,70 k
C1	0,82 defghij	BM5	0,70 k
C137	0,81 efghij	C7	0,70 k
D.M.S. 5%	0,08		0,08
C.V. = 4,65%			

¹Médias de 6 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

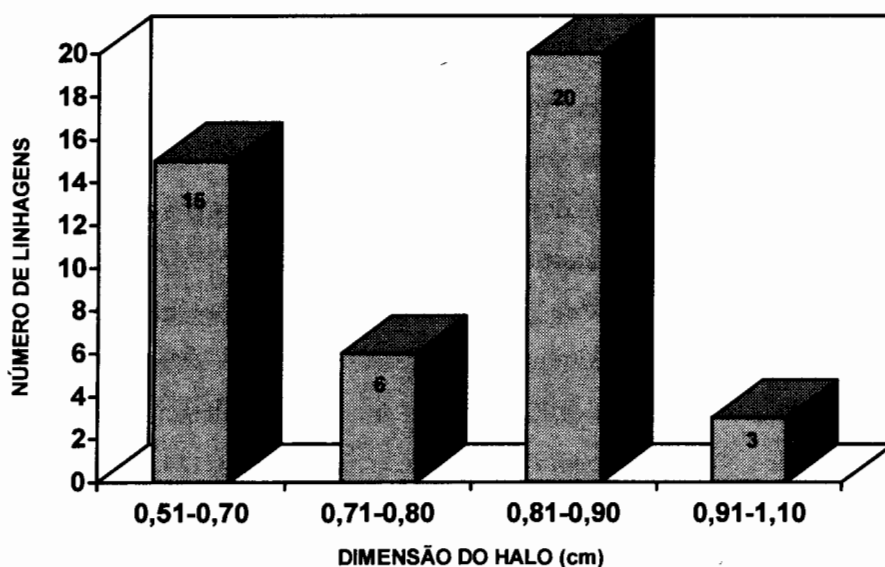


Figura I - Frequência do número de linhagens selvagens de *Bacillus* spp. quanto à dimensão dos halos de degradação produzidos em meio ágar -Tween 80.

Quanto ao método utilizado, os resultados obtidos neste trabalho encontram apoio na literatura, com o relato da utilização de meios sólidos para verificação da atividade enzimática em microrganismos, com resultados positivos. MONTENECOURT & EVELEIGH (1977) utilizaram o teste semiquantitativo por difusão para determinação da produção de celulase por *Trichoderma viride* Pers. : Fr . . DICKMAN & PATIL (1986) também usaram o método de difusão, e obtiveram resposta rápida e eficiente para produção de cutinase por fungos fitopatogênicos. Este método também foi usado por WILLIAMS *et al.* (1990) para seleção de microrganismos produtores de proteases, capazes de quebrar as pontes dissulfídicas de queratina, visando a obtenção de um método alternativo para o aproveitamento das penas em criadouros de aves, através da biodegradação das mesmas por microrganismos com atividade queratinolítica. MENDONÇA *et al.* (1996), testaram as mesmas 44 linhagens quanto a produção de proteases pelo teste semiquantitativo em meios sólidos, observando que *Bacillus cereus* (C124) apresentou o melhor desempenho em meio ágar - hemoglobina.

As esterases são importantes enzimas estudadas tanto no campo científico, como nas aplicações industriais em alimentos, papel e outras (CHISTOV & PRIOR, 1993). A escolha do substrato para a determinação das atividades esterásicas foi direcionada para Tween 80, pois o uso dos Tweens é indicado para o estudo da especificidade das esterases que hidrolizam esteres de ácidos graxos de cadeias curtas, as lipases (enzimas cuja função biológica é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa) e as esterases produzidas por microrganismos podem ser obtidas isoladas ou associadas, e o conceito de ativação interfacial, característico da maioria das lipases, não é suficiente para distinguir entre lipases e esterases, sugerindo a possibilidade da produção de lipases pelos *Bacillus* testados. (KOUKER & JAEGER, 1987; LAMBRECHTS *et al.*, 1995). Diante destes resultados, foi constatada a eficiência da linhagem *B. cereus* (C124) na produção de esterases.

Melhoramento genético de *Bacillus cereus* (C124). Os índices enzimáticos observados durante a caracterização semiquantitativa de esterases em meio sólido, mostraram o bom desempenho da linhagem *B. cereus* (C124), a qual foi conseqüentemente, selecionada para o melhoramento genético. De acordo com a curva de crescimento de C124, foi constatado que 65 % de transmitância correspondeu a uma concentração de células da ordem de 10^7 ufc/ml. Após a realização da curva de sobrevivência de C124 e através da equação obtida por regressão linear: $[Y = 107,84 - 2,795 X \text{ (} R^2 = 0,951 = 95,10\% \text{)}]$, ficou estabelecido o tempo de 28 '' para DL_{70} (dose letal), visando posterior obtenção de mutantes melhorados desta linhagem. Segundo

AZEVEDO (1985), quando se trabalha com produção, deve-se obter mutantes com sobrevivência acima de 10 %, o que está em concordância com o tempo de exposição escolhido. A análise morfológica dos sobreviventes obtidos mostrou características fenotípicas similares, sendo selecionadas ao acaso cinquenta colônias, as quais foram caracterizadas semiquantitativamente quanto à produção de esterases, através das médias dos índices enzimáticos, no meio de cultura utilizado anteriormente. O resultado da análise de variância mostrou que houve diferença estatística significativa entre as médias dos índices enzimáticos dos sobreviventes e a da linhagem selvagem *B. cereus* (C124). As comparações das médias dos índices enzimáticos de C124 e dos sobreviventes (C124UV1 a C124UV50) encontram-se na **Tabela III**.

A análise da **Tabela III** mostra que o mutante C124UV35 apresentou índice enzimático superior em 47 % ao selvagem *B. cereus* (C124), enquanto que os mutantes C124UV12 e C124UV11 apresentaram também índices enzimáticos superiores a linhagem selvagem em 43 % e 42 %, respectivamente. A obtenção de um mutante, segundo GALZY (1985), só era possível se uma seleção permitisse colocá-lo em evidência.

A utilização de UV como indutor de mutação encontra apoio na literatura como na indução de mutantes produtores de amilase em *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn por meio de diferentes radiações, entre elas UV, realizada por MEYRATH *et al.* (1971). MONTENECOURT & EVELEIGH (1977) usaram o mesmo teste para selecionar mutantes de *Trichoderma viridae* a fim de obter maior produção de celulase. Os mutantes também foram obtidos após radiação UV, porém com taxa de sobrevivência de 0,1 %, apresentando halos duas a três vezes maiores que os parentais. MENDONÇA *et al.* (1996) também apresentaram resultados utilizando UV para indução de mutação, quando compararam a linhagem selvagem *B. cereus* (C124) com mutantes quanto a produção de proteases. O mutante C124UV35 mostrou índice enzimático superior em 50 % ao selvagem no meio ágar-hemoglobina.

A partir dos resultados obtidos, o mutante C124UV35 foi selecionado por apresentar índice enzimático maior que o da linhagem selvagem *B. cereus* (C124), procedendo-se a verificação de auxotrofia. Foi observado o crescimento tanto no meio completo AN quanto no meio mínimo, e portanto o mutante selecionado não foi considerado auxotrófico. A indução de mutação foi realizada para a obtenção de mutantes quanto à produção de esterases, considerando uma sobrevivência de 30 % (AZEVEDO, 1985), obtida após a irradiação com UV.

TABELA III - Médias dos índices enzimáticos de *Bacillus cereus* (C124) e dos sobreviventes em meio ágar-Tween

80

LINHAGEM	MÉDIA ¹ (cm)	LINHAGEM	MÉDIAS ¹ (cm)
C124UV35	0,28 a	C124UV30	0,20 abcd
C124UV12	0,26 ab	C124UV31	0,20 abcd
C124UV11	0,25 abc	C124UV32	0,20 abcd
C124UV15	0,21 abcd	C124UV33	0,20 abcd
C124UV13	0,21 abcd	C124UV34	0,20 abcd
C124UV1	0,21 abcd	C124UV6	0,20 abcd
C124UV10	0,21 abcd	C124UV36	0,20 abcd
C124UV7	0,20 abcd	C124UV37	0,20 abcd
C124UV9	0,20 abcd	C124UV38	0,20 abcd
C124	0,20 abcd	C124UV39	0,20 abcd
C124UV2	0,20 abcd	C124UV40	0,20 abcd
C124UV3	0,20 abcd	C124UV41	0,20 abcd
C124UV4	0,20 abcd	C124UV42	0,20 abcd
C124UV5	0,20 abcd	C124UV43	0,20 abcd
C124UV16	0,20 abcd	C124UV44	0,20 abcd
C124UV18	0,20 abcd	C124UV45	0,20 abcd
C124UV19	0,20 abcd	C124UV47	0,20 abcd
C124UV20	0,20 abcd	C124UV48	0,20 abcd
C124UV21	0,20 abcd	C124UV49	0,20 abcd
C124UV22	0,20 abcd	C124UV50	0,18 abcd
C124UV23	0,20 abcd	C124UV17	0,18 bcd
C124UV24	0,20 abcd	C124UV8	0,18 bcd
C124UV25	0,20 abcd	C124UV26	0,16 cd
C124UV27	0,20 abcd	C124UV46	0,16 cd
C124UV28	0,20 abcd	C124UV14	0,15 d
C124UV29	0,20 abcd		
D.M.S. 5%	0,09		0,09
C.V. = 13,5%			

¹ Médias de 3 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Caracterização eletroforética de *Bacillus cereus* (C124) e mutante selecionado. Foram comparados os perfis de bandas de proteínas totais e de esterases para melhor caracterizar a linhagem selvagem C124 e o mutante C124UV35. As Figuras II e IV mostram o padrão eletroforético de proteínas totais e esterases, respectivamente, e a Figura III apresenta o zimograma dos perfis de proteínas totais (Fig. II) com os valores de Rf correspondentes a algumas bandas de C124 e do mutante selecionado.

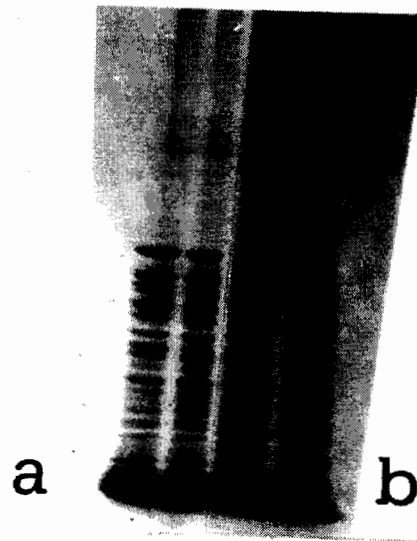


Figura II - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS para proteínas totais de *Bacillus cereus* (C124) e do mutante a = C124 ; b = C124UV35

Rf	C124	C124UV35
0.18		—
0.28		—
0.30	—	—
0.31	—	—
0.33		—
0.38		—
0.40		—
0.41	—	—
0.42	—	—
0.47		—
0.48		—
0.50	—	—
0.51		—
0.52		—
0.55	—	—
0.57	—	—
0.58	—	—
0.60	—	—
0.82	—	—
0.86	—	—
0.94	—	—

Figura III - Zimograma de proteínas totais para algumas bandas de *Bacillus cereus* (C124) e do mutante C124UV35. Rf - Valores de mobilidade relativa de cada banda.



Figura IV - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida para esterases de *Bacillus cereus* (C124) e do mutante a = C124 ; b = C124UV35

A análise do perfil eletroforético para proteínas totais (Figuras II e III) mostrou diferenças entre a linhagem selvagem e o mutante. Nas variações observadas, notou-se a banda de Rf 0,18, presente no mutante e ausente na selvagem. Nas bandas com Rf 0,28 e 0,30 ocorreram diferenças quanto ao aumento da intensidade, apresentado pela linhagem C124UV35, e ausência da banda Rf 0,28 na linhagem selvagem. A banda com Rf 0,41 só foi observada na linhagem selvagem, enquanto que a Rf 0,42 aparece na selvagem e com maior intensidade para o mutante. A banda com Rf 0,51 surgiu somente no mutante C124UV35, porém as de Rf 0,52 e 0,57 foram comuns às duas linhagens, apresentando maior densidade na linhagem selvagem. No entanto, a grande maioria das bandas mostraram padrões similares para as duas linhagens analisadas.

Na análise do padrão eletroforético para esterases (Figura IV), a linhagem selvagem apresentou banda mais densa do que o mutante, o que não implica em variabilidade genética. O uso da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas solúveis em água tem se constituído num instrumento valioso para caracterização e identificação de microrganismos. Segundo SMIBERT & KRIEG (1994), linhagens de uma mesma espécie podem apresentar padrões de proteínas similares que, entretanto, não são necessariamente iguais. Segundo PACCOLA-MEIRELLES *et al.* (1988), a técnica da eletroforese constitui o melhor instrumento para estudos de variação genética, possibilitando a detecção de diferenças através dos padrões

das bandas. As diferenças apresentadas indicam a ocorrência de mutação para uma maior atividade esterásica, apesar dos padrões eletroforéticos mostrarem similaridade entre a linhagem mutante e a selvagem.

AGRADECIMENTOS

A equipe de trabalho agradece o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Fundação Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco (ITEP) e do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUNSTRUP, K.. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. In: WINGOARD, L.; KATCHALASKI-KATZIR, E. ; GOLDSTEIN, L. **Appl. Biochem. Bioeng.** New York: Academic Press, 1979. V. 2, p. 27 - 69.
- AZEVEDO, J. L. Mutação e agentes mutagênicos. In: **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba : Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1985. Cap. 12, p. 11-16.
- AZEVEDO, J. L. De ; COSTA, S. O. P. Da. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo : Ed. Da Universidade de São Paulo/Companhia Editora Nacional, 1973. P.154-161.
- CHRISTOV, L. P. ; PRIOR, B. A. Esterases of xylan - degrading microorganisms: Production, properties and significance. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 15, June, p. 460 - 475, 1993.
- DICKMAN, M. B. ; PATIL, S. S. A rapid and sensitive plate assay for the detection of cutinase produced by plant pathogenic fungi. **Phytopathol.**, St. Paul, v.76, n.5, p.473-475, 1986.
- GALZY, P. A engenharia genética. In: SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo, Manole, 1985. Cap. 1, parte IV, p. 281-288.
- KIRÁLY, Z. ; KLEMENT, Z. ; SLYMOSY, F. ; VÖROS, J. **Methods in plant pathology**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing , 1974. Cap. VI, p.161-166.
- KOUKER, G. ; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, Jan., p.211 - 213, 1987.
- KRISCH, K. Carboxylic ester hydrolases. In: **The enzymes**. New York: Academic Press, 1971. V. V, p. 43 - 69.
- LAMBRECHTS, C.; ESCUDERO, J.; GALZY, P. Purification and properties of three esterases from *Brevibacterium* sp. R 312. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 180 - 188, 1995.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, 1951, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MATSUNAGA, A.; KOYAMA, N.; NOSOH, Y. Purification and properties of esterase from *Bacillus stearothermophilus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 160, p. 504 - 513, 1974.
- McKAY, A. M. A review: Microbial carboxylic ester hydrolases (E.C. 3.1.1) in food technology. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 1 - 6, 1993.
- MENDONÇA, A. L.; MARIANO, R. L. R.; ARAUJO, J. M. ; CAVALCANTE, U. M. T. *Bacillus* sp. produtores de proteases: Isolamento, caracterização e melhoramento de *B. cereus* (C124). **Arq. Biol. Tecnol.** Curitiba, v. 39, p. 359-372, 1996.

- MEYRATH, J.; BAHN, M.; HAN, H. E. ; ALTMANN, H. Induction of amylase-producing mutants in *Aspergillus oryzae* by different irradiations. **Int. At. Energy Agency**, Vienna, v. 134, n. 14, p. 137-155, 1971.
- MONTENECOURT, B. ; EVELEIGH, D. E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 1, p. 178 - 183, 1977.
- NOVO NORDISK **Enzimas - campos de aplicación**. Bioindustrial Group. Bagsvaerd, 1992. p. 2-48.
- PACCOLA - MEIRELLES, L. D. ; VALARINI, M. J. ; AZEVEDO, J. L. ; ALFENAS, A. C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos**. Piracicaba : Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz , 1988. 54 p.
- SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antoine Van Leeuwenhoek**. Amsterdam, v. 23, p. 15-22, 1957.
- SMIBERT, R. M. ; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In: **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington : American Society of Microbiology, Washington, 1994. cap. 25.
- UNDERKOFER, L. A. Microbial enzymes. In: MILLER, B. M. ; LITSKY, W. **Industrial microbiology**. New York: Mc Graw-Hill, 1976. cap. 7, p. 128-164.
- WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; MacKENZIE JR., J. M. ; SHIH, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v. 56, n. 6, p. 1509 - 1515, 1990.

Received: 11 August 1997;

Revised: 23 September 1997;

Accepted: 03 June 1998.