



## Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo na Amazônia

Prospection of enzymes of industrial interest produced by actinobacteria isolated from soil in the Amazon Biome

S. M. de Oliveira<sup>1</sup>, D. F. da Silva<sup>1</sup>, I. N. dos Santos<sup>1</sup>, C. V. P. Corrêa<sup>1</sup>, T. C. de F. Liberal<sup>1</sup>, F. L. C. Branco<sup>1</sup>, C. N. J. Colares<sup>1</sup>, S.K.S Escher<sup>1,2,3\*</sup>, J. K. Ishida<sup>4</sup>, T. S. Mui<sup>4</sup>, J. M. de Araújo<sup>2</sup>, E. L. C. de Amorim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Saúde Coletiva/Laboratório de Microbiologia/Universidade Federal do Oeste do Pará, CEP 68035-100, Santarém-Pará, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Antibióticos/Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas/Laboratório de Produtos Naturais/ Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>CENA-USP, Centro de Energia Nuclear e Agricultura, Universidade de São Paulo, Piraicaba, Brasil.

\*katrineescher@hotmail.com

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

Enzimas produzidas por microrganismos tem despertado o interesse da indústria biotecnológica por sua vasta possibilidade de aplicação em diversos processos industriais, devido sua estabilidade térmica e química. As actinobactérias são reconhecidas pelo seu potencial na produção de diversos metabólitos bioativos de estrutura química e ação biológica diversificados. Neste estudo foi isolada uma linhagem de actinobactéria rizosférica, caracterizada morfológicamente e por métodos moleculares e avaliado o potencial enzimático por meio da produção de enzimas de interesse industrial. A linhagem de actinobactéria corresponde a *Microbacterium xylanilyticum* e apresenta alto potencial de produção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos como lipases (IE=3,4), pectinases (IE=2,2) e esterases (IE=2,0), além da produção de hemolisina e L-glutaminase que apresenta propriedades antitumoral.

Palavras-chave: *Microbacterium xylanilyticum*, enzimas extracelulares, Amazônia.

Enzymes produced by microorganisms has aroused the interest of the biotechnology industry for its wide potential application in many industrial processes because of its thermal and chemical stability. The actinobacteria are recognized for their potential in the production of various bioactive metabolites of diverse chemical structure and biological activity. In this study we isolated a strain of rhizospheric actinobacteria, characterized by morphology and molecular methods and rated the enzyme potential through the production of enzymes of industrial interest. The strain of actinobacteria corresponds to the *Microbacterium xylanilyticum* and has a high potential for production of enzymes of interest to the food industry as lipases (IE = 3.4), pectinase (IE = 2.2) and esterase (IE = 2.0), and the production of hemolysin and L-glutaminase that exhibits antitumor properties.

Keywords: *Microbacterium xylanilyticum*, extracellular enzymes, Amazon.

### 1. INTRODUÇÃO

Os produtos bioativos podem ser obtidos por meio do metabolismo secundário de diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias, onde se destaca o grupo das actinobactérias. Esse grupo apresenta uma diversidade de bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina em seu de DNA, com ampla capacidade de produzir metabólitos secundários ativos com ação inseticida, antitumoral, antibiótica, vitaminas e enzimas de interesse biotecnológico utilizadas na indústria alimentícia, detergentes, têxteis, papel e celulose como L-glutaminase, xilanases, lipases, celulasas, pectinases, proteases, amilases e quitinases [1-4].

A morfologia dessas bactérias é semelhante a fungos, pois se desenvolvem em forma filamentosa, possuindo micélio com hifas ramificadas no seu crescimento vegetativo [5]. A formação destas hifas é característica neste grupo, sendo que o micélio vegetativo se desenvolve no interior do substrato, o qual é responsável pela sustentação e adsorção de nutrientes. Este fenômeno ocorre através da liberação de enzimas extracelulares que degradam compostos

orgânicos utilizados na sua nutrição [6]. Uma característica marcante deste grupo é a versatilidade metabólica, podendo crescer em temperaturas elevadas e sobreviver a ambientes hostis, o que possibilita a sua ampla distribuição nos diversos ecossistemas [7].

A maioria das actinobactérias são aeróbias, heterotróficas e habitam naturalmente o solo. Adaptam-se às diversas condições do ambiente, produzem diversos metabólitos secundários e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas, sendo abundante em solos secos e quentes, e raros em solos turfosos e encharcados [7]. As actinobactérias são saprófitas, porém algumas espécies são patogênicas ao homem, a animais ou plantas. No solo estas bactérias realizam funções importantes no processo de ciclagem de nutrientes, degradando compostos complexos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas. Atuam também na fixação de nitrogênio dentro das raízes de plantas lenhosas não leguminosas, como ocorre no gênero *Frankia* [8].

Dos 23.000 metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos, cerca de 10.000 são metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias, sendo que o gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de mais de 70% destes compostos [9]. O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica dentro deste grupo, pois é responsável por sintetizar metabólitos com atividades antibiótica, herbicida, pesticida, antiparasitária, além de produzirem enzimas de interesse industrial como amilases, celulases, lipases, xilanases [10].

A família *Lauraceae* compreende 49 gêneros e cerca de 3.000 espécies, constituída em sua maioria por árvores e arbustos. Pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais, com alta diversidade de espécies no norte da América do Sul, sudeste da Ásia e Madagascar [11]. Aproximadamente 22 gêneros e cerca de 390 espécies ocorrem no Brasil, com alta diversidade nas florestas pluviais, nas restingas e no Cerrado. O gênero *Aniba* se destaca por apresentar espécies aromáticas de valor econômico, por fornecerem ainda óleos essenciais e alcalóides empregados na perfumaria e fabricação de fármacos, como as espécies *Aniba rosaeodora* (paurosa), *Aniba canelilla* (casca preciosa) e *Aniba parviflora* (macacaporanga) [12,13].

A Floresta Amazônica é conhecida como um dos principais ambientes ricos em plantas e animais com ampla diversidade genética. No entanto, há pouca referência quanto à diversidade microbiana deste bioma. Com base nesse contexto, é importante investigar a biodiversidade autóctone e descrever o seu potencial biotecnológico. Diante disto, este trabalho buscou avaliar a produção de enzimas de interesse industrial produzidas pela actinobactéria *Microbacterium xylanilyticum* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (Macacaporanga), planta nativa do Bioma Amazônia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *Microbacterium xylanilyticum* MPO6 utilizada no presente estudo foi obtida a partir de solo rizosférico de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (Macacaporanga), coletado em zona de transição entre Floresta Densa e uma área com características de cerrado (2°28' 01.28"S; 54°49' 45.32"O), no município de Santarém, PA. A linhagem está depositada na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), preservada em óleo mineral. A permissão para conduzir este estudo foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio pelo número 47530-1.

Para o isolamento da actinobactéria foram coletadas 10g de solo rizosférico da planta e feitas diluições seriadas em tampão fosfato (pH 7,2), para a obtenção das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . O isolamento foi realizado a partir da semeadura de uma alíquota de 100 $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  em placas de Petri (15mmx90mm) contendo o meio de cultura Arginina Levedura Ágar (ALA) [14] acrescido de Nistatina (100 $\mu$ g/mL), e incubadas a 37°C durante 14 dias.

Foram determinadas as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da actinobactéria isolada previamente, tomando como parâmetro o aspecto rígido da colônia sobre o meio de cultura e a formação de micélio aéreo velutino. A linhagem foi cultivada nos meios ISP –

International *Streptomyces* Project [15-17] para determinação da cor do micélio aéreo e vegetativo e a produção de pigmentos.

A identificação da actinobactéria foi realizada por meio de métodos clássicos e moleculares, sendo que a morfologia foi determinada a partir do microcultivo em meio ISP-2 [16,18] e, posteriormente, realizada análise por microscopia de luz comum (400x). A identificação molecular foi realizado a partir de extração do DNA bacteriano a partir de 5 mL de suspensão celular em caldo ISP-2 [19]. Para a reação de amplificação foram utilizados os pares de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R: 95 °C (3''); 35 ciclos de 94 °C (30''), 68 °C (30''), 72 °C (90''); extensão de 72 °C (7'). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> vector utilizando o kit TOPO TA Cloning (Thermo Fisher Scientific 451641). Para o sequenciamento foi utilizado os *primers* M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para os fragmentos subclonados no vetor pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>.

Para o completo sequenciamento do 16S rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos [20] 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). O sequenciamento Sanger foi realizado por meio do ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems/Hitashi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>).

A prospecção de enzimas de interesse industrial foi realizada em meio sólido em placas de Petri contendo o respectivo substrato indutivo. A produção de lipase e esterase foi determinada em meio mineral contendo Tween 80 e Tween 20 [21]. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias e o aparecimento de um halo branco difuso contendo oleato de cálcio, indicou a produção das enzimas.

A produção de amilase foi determinada a partir do cultivo em meio Ágar-amido a 30°C por 10 dias [22]. O teste foi revelado com 10 mL de solução de lugol 1% e a descoloração do meio em torno da colônia evidenciou a hidrólise do amido.

A atividade proteolítica foi avaliada utilizando os substratos caseína e gelatina. A degradação da caseína foi determinada em meio à base de: Solução 1 (10g leite desnatado, 90 ml água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97 mL água destilada), mantidas à 30°C por 7 dias. A formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A degradação da gelatina foi avaliada em meio nutriente contendo 12% de gelatina, 0,5% de peptona e 0,3% de extrato de carne, 1000 mL água destilada, incubada a 30°C durante 20 dias. A manutenção da consistência líquida após incubação a 4°C por 24h indicou a produção de gelatinase.

A produção de pectinase foi avaliada após o cultivo em Ágar TSA (1,5 g tripton, 0,5 g peptona de soja, 1,5 g NaCl, 1,5 g de ágar, pH 7,3) suplementado com 1% de pectina cítrica, a 25°C e 30°C por 7 dias. O aparecimento de halo transparente em volta das colônias, após a adição de 10 mL de solução de lugol 1% indicou a hidrólise da pectina. A atividade hemolítica foi analisada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado e incubadas a 30°C por 7 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

A produção da enzima L-glutaminase foi avaliada após cultivo em ágar glutamina [4]. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada por meio da variação e intensidade da cor amarelo para rosa. A determinação do índice enzimático (IE) foi realizada pela relação:  $IE = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{halo}} \times 100$ , sendo com potencial enzimático, aquelas que apresentaram IE acima de 1,5.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Assistat 7.7.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A actinobactéria isolada apresentou melhor crescimento nos meios ISP-1 e ISP-2, com desenvolvimento de colônias ásperas, convexas, circulares, com borda irregular (Figura 1). A

coloração do micélio aéreo formado foi predominantemente branco tornando-se rosa claro após 168h no meio ISP-2. A actinobactéria produz pigmento solúvel no meio ISP2 após 120h, modificando o meio para cor âmbar (Tabela 1).



Figura 1: Morfologia das colônias de *Microbacterium xylanilyticum* com formação do micélio aéreo velutino branco após 167h de cultivo em meio ISP-2.

Tabela 1: Aspectos Macroscópicos da actinobactéria cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	++	Branco	Amarelo	-
ISP2	++	Branco	Amarelo escuro	+
ISP3	-	-	-	-
ISP4	-	-	-	-
ISP5	+	Branco	Amarelo	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; - Ausência de crescimento e Pigmento difuso

Na micromorfologia foi observado cadeias de esporos simples espiraladas, características do filo Actinobacteria, e o sequenciamento de 821 pb, contendo 56,03% de G+C, foi compatível, com 99% de similaridade com o filo Actinobacteria, espécie *Microbacterium xylanilyticum*.

*Microbacterium xylanilyticum* produz as enzimas lipase, esterase, pectinase, amilase, hemolisina, gelatinase e L-glutaminase, apresentando maior potencial enzimático para lipase (IE=3,4), seguido de pectinase (IE=2,2) e esterase (IE=2,0) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise qualitativa da produção de enzimas produzidas por *Microbacterium xylanilyticum*.

Enzimas	Diâmetro da colônia (mm)	Halo enzimático (mm)	Índice Enzimático (mm)
Lipase	12,6 ±1,26	42,5±4,33	3,4
Esterase	17,7±8,15	35,0±0,00	2,0
Amilase	23±9,61	30,3±3,79	1,3
Pectinase	16,6±2,84	37,5±7,50	2,2
Hemolisina	9,1±0,76	11,2±0,76	1,2
Caseinase	-	-	-
Gelatinase		+	
L-glutaminase		+	

+ presente; - ausente

O filo Actinobactéria produz uma diversidade de enzimas como estratégia nutricional para a obtenção de fontes de carbono e nitrogênio [23]. A prospecção de enzimas hidrolíticas como lipases, amilases e proteases são uma alternativa viável para o tratamento de esgotos e efluentes de indústrias de doces, sorvetes, laticínios e carnes, uma vez que para este fim não é necessário a etapa de purificação, diminuindo, portanto os custos de aplicação [24].

As pectinases são enzimas líticas que hidrolisam compostos pécnicos. São produzidas por fungos, bactérias e vegetais [25] e tem ação enzimática nos tecidos vegetais a nível de lamela média onde estão presentes compostos pécnicos como pectato de cálcio e pectato de magnésio [26]. Estas enzimas líticas são ativas no processo de compostagem, atuando na degradação de matéria orgânica, contribuindo para o ciclo natural do carbono [27,28]. As pectinases têm atraído a atenção por sua aplicação biotecnológica como catalisador biológico em diversos processos industriais, com grande aplicação na indústria de fabricação de sucos [29] e na produção de vinho como clarificador e estabilizador de cor do vinho tinto [30].

A enzima L-glutaminase (E.C. 3.5.1.2) apresenta atividade antitumoral, especialmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) [31,32] e atividade antiviral contra HIV [33,34]. É também utilizada na indústria de alimentos, tendo sua aplicação na intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina. Poucos estudos relatam a produção de enzimas pelo gênero *Microbacterium* sp., especialmente de espécies isoladas do solo. Kim *et al.* (2005) [35] descreveram pela primeira vez cepas de *Microbacterium xylanilyticum* presentes em biofilme de um reator de membrana utilizado para tratamento de águas residuais, sendo determinadas apenas a produção das enzimas amilase e xylanase. A espécie *M. xylanilyticum* se diferencia de outras espécies como *Microbacterium soli* por produzir as enzimas esterase, lipase e gelatinase [36].

#### 4. CONCLUSÃO

*Microbacterium xylanilyticum* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) do bioma Amazônia, produz enzimas extracelulares de interesse alimentício e farmacêutico, sendo descritos neste estudo a produção de enzimas hidrolíticas, lipolíticas e antitumorais.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in egypt. *Microbiol Res.* 2015;175:34-47, doi:10.1016/j.micres.2015.03.002
2. Kim BY, Zucchi TD, Fiedler HP, Goodfellow M. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:279-283, doi: 10.1099/ijs.0.029983-0
3. Rahman MA, Choi YH, Pradeep GC, Choi YS, Choi EJ, Cho SS, Yoo JC. A novel low molecular weight endo-xylanase from *Streptomyces* sp. Cs628 cultivated in wheat bran. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;173(6):1469-1480, doi: 10.1007/s12010-014-0916-0
4. Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram S. L-glutaminase producing actinomycetes from marine sediments—selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci.* 2010;4(5):698-705.
5. Adegboye MF, Babalola OO, Ngoma L, Okoh AI. Analysis of *Streptomyces* spp. native to mahikeng soils in south Africa. *J Pure Appl Microbiol.* 2012;6(3):1001-1010.
6. Lima SMA. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria actms-9h isolada da rizosfera de *Paulinia cupana* kunth. Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial-UFPE; 2013.93 p.
7. Silva VMA, de Brito FAE, Ramos KA, da Silva RM, Martins CM, Martins SCS. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido (Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid). *R. Bras. Geogr. Fís.* 2015;8:560-572.
8. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock.* Artmed; 2004.
9. Arasu MV, Duraipandiyar V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. Eri-3 isolated from western ghats rock soil (India). *J. Mycol. Méd./J. Med. Mycol.* 2009;19(1):22-28.

10. Rodrigues AAC, Bezerra Neto E, Coelho RS. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Tracheiphilum* em caupi: Eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopat Brasil*. 2006;31(5):492-499.
11. Madriñán S. *Rhodostemonodaphne* (Lauraceae). *Flora Neotrop*. 2004;1-102.
12. Marques CA. Importância econômica da família lauraceae lindl. *Floresta e Ambiente*. 2001;8(1):195-206.
13. Barroso G. Sistemática de angiospermas do Brasil. Rio de Janeiro, vol 2, Imprensa universitária UFV; 1991.
14. Nonomura H, Ohara Y. The distribution of actinomycetes in soil. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. *J Ferm Technol*. 1969;47:463-469.
15. Shirling EB, Gottlieb D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Intern J Syst Bacteriol*. 1966;16(3):313-340.
16. Krieg NR. Bergey's manual of systematic bacteriology. London, vol 4, Williams and Wilkins; 1989.
17. Petrova D, Vlahov S. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21e producer of thermostable collagenase. *J Culture Collections*. 2013;3-9.
18. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. Gram-positive cocci. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed Baltimore: Ed Williams e Wilkins. 1994;544-551.
19. Stirling D. Dna extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*. 2003;226:3-54.
20. Lane D. 16s/23s rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. 1991;125-175.
21. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1957;23(1):15-22.
22. Conn H, Jennison M, Weeks O. Routine tests for the identification of bacteria. *Manual Microbiol Methods*. 1957;6:140-188.
23. Korn-Wendisch F, Kutzner H, Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer K. The family streptomycetaceae. *The Prokaryotes*. 1992;2:921-995.
24. Rigo E, Rigoni RE, Lodea P, Oliveira Dd, Freire DM, Luccio MD. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environ. Eng. Sci*. 2008;25(9):1243-1248. doi:10.1089/ees.2007.0197.
25. Whitaker JR. Microbial pectolytic enzymes. In: *Microbial enzymes and biotechnology*. Springer, 1990. p.133-176.
26. Kashyap P, Sabu A, Pandey A, Szakacs G, Soccol CR. Extra-cellular l-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 2002;38(3):307-312. doi:10.1016/S0032-9592(02)00060-2
27. Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol. J*. 2009;9-18.
28. Wei Y-S, Fan Y-B, Wang M-J, Wang J-S. Composting and compost application in China. *Resour., Conserv. Recycl*. 2000;30(4):277-300. doi:10.1016/S0921-3449(00)00066-5
29. Kashyap D, Chandra S, Kaul A, Tewari R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. Dt7. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2000;16(3):277-282. doi:10.1023/A:1008902107929
30. Revilla I, José GS. Addition of pectolytic enzymes: An enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2003;38(1):29-36.
31. Roberts J, MacAllister TW, Sethuraman N, Freeman AG. Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. In: *Google Patents*, 2001.
32. Koibuchi K, Nagasaki H, Yuasa A, Kataoka J, Kitamoto K. Glutaminase, its gene and a method of producing it. In: *Google Patents*, 2004.
33. Sabu A, Keerthi T, Kumar SR, Chandrasekaran M. L-glutaminase production by marine *beauveria* sp. Under solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2000;35(7):705-710. doi:10.1016/S0032-9592(99)00127-2
34. PLNSN SD, Siddalingeshwara K, Karthic J, Pramod T, Vishwanatha T. Antitumour property l-glutaminase on from *aspergillus oryzae* through submerged fermentation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2014;3(3):819-823.
35. Kim KK, Park HY, Park W, Kim IS, Lee S-T. *Microbacterium xylanilyticum* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from a biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2005;55(5):2075-2079.
36. Srinivasan S, Kim MK, Sathiyaraj G, Kim Y-J, Jung S-K, In J-G, Yang D-C. *Microbacterium soli* sp. Nov., an  $\alpha$ -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2010;60(3):478-483. doi: 10.1099/ij.s.0.012526-0