

Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes

Marine microorganisms: a reservoir of biotechnologically-interesting hydrolases

Isabelle Rodrigues Lopes¹, Anna Luiza Bauer Canellas¹, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira², Marinella Silva Laport^{*1}

¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.*

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

* Autor correspondente: **Marinella Silva Laport**

E-mail: marinella@micro.ufrj.br

Citação:

Lopes, IR; Canellas, ALB; de Oliveira, BFR; Laport, MS. Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes. *Revista da Biologia*. 2023. vol. 22 p 32-46. <https://doi.org/10.11606/issn.1984-5154.v22p32-46>

Editora: Juliana Sobre de Barros
Diagramador: Henrique Rodrigues Veira

Recebido: 10 Mês 2020
Aceito: 09 Mês 2021

Resumo: Esta revisão tem por objetivo fornecer uma revisão narrativa atualizada acerca de enzimas hidrolíticas (agarases, amilases, celulases, esterases, lipases, peptidases e quitinases) isoladas do microbioma marinho. Esses biocatalisadores apresentam propriedades bioquímicas únicas, como halotolerância, extremos de pH, temperatura e barofilia, que os tornam atraentes para uso em diversos setores industriais, estimulando futuras aplicações biotecnológicas. Considerando o vasto repertório enzimático dos diversos membros das comunidades microbianas vivendo no ambiente marinho, salienta-se a imprescindibilidade de acessar esse habitat, mais especificamente essas unidades biocatalíticas. Com a devida atenção voltada ao viés industrial, novos biocatalisadores serão descobertos com sucesso nas comunidades microbianas marinhas, desde a confirmação de sua atividade até a comprovação de seu emprego prático nos setores de interesse e geração de propriedade intelectual.

Palavras-chave: ambiente marinho; aplicações biotecnológicas; biocatalisadores; enzimas hidrolíticas; indústria.

Abstract: This review aims to provide an updated narrative review about hydrolytic enzymes (agarases, amylases, cellulases, esterases, lipases, peptidases, and chitinases) isolated from the marine microbiome. These biocatalysts have unique biochemical properties, such as halotolerance, extremes of pH, temperature, and barophilicity, which make them attractive for use in several industrial sectors and stimulating future biotechnological applications. Considering the vast enzymatic repertoire of the various microbial communities living in the marine environment, it is highlighted the importance of harnessing this habitat, specifically these biocatalytic units. Consequently, with proper attention to the industrial perspective, new biocatalysts will be successfully discovered in the marine microbial communities, confirming their practical and valuable activity application to the attractive sectors and generating intellectual property.

Keywords: marine environment; biotechnological applications; biocatalysts; hydrolytic enzymes; industry.



Copyright: © 2023. É permitido copiar, distribuir e modificar o material disponível, desde que seja dado crédito (link para o material original). Licença Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

1. INTRODUÇÃO

O antropólogo Helmreich definiu de forma simples a biotecnologia marinha como "uma extensão natural das práticas culturais de coleta de alimentos do oceano", resumindo as origens desse campo e seu profundo significado para a sociedade humana (Helmreich, 2003).

As fontes marinhas geralmente são representadas por microrganismos, plantas e animais e a alta tolerância ao sal, barofilia, adaptabilidade ao frio e facilidade de cultivo em grande escala são características que chamam a atenção dos pesquisadores (Trincone, 2010). Essas propriedades

não são tão comumente encontradas em ambientes terrestres, pois os organismos marinhos prosperam em habitats como fontes hidrotermais, cavernas oceânicas e algumas áreas com elevada pressão atmosférica e ausência de luz (Ghosh *et al.*, 2005).

Muitos organismos multicelulares marinhos, como algas, plantas, esponjas, peixes, camarões e caranguejos, foram estudados para explorar o arsenal molecular do universo marinho. No entanto, os produtores de biomoléculas de relevância biotecnológica que mais se destacam são os microrganismos, incluindo bactérias, arqueias e fungos. Os microrganismos são capazes de fornecer números impressionantes de biocatalisadores com uma ampla gama de aplicações em diversos setores, como alimentos, ração animal, detergentes, biocombustíveis, produtos químicos finos e farmacêuticos (Trincone, 2010).

Além de serem encarregadas de reações bioquímicas específicas ligadas aos processos metabólicos das células, uma enzima marinha é uma molécula proteica única com propriedades que refletem o habitat natural do organismo produtor, o qual, compreende um meio aquoso com alta concentração de sais (Sarkar *et al.*, 2010). As enzimas marinhas apresentam novas características bioquímicas e estereoquímicas quando comparadas com as demais enzimas isoladas de ecossistemas não-marinhos (Trincone, 2013). Tendo em vista as propriedades bioquímicas únicas das enzimas marinhas, sua demanda industrial está aumentando continuamente, sendo impulsionada pela necessidade crescente de soluções sustentáveis no mundo contemporâneo.

As características exclusivas das enzimas, como alta especificidade, ação rápida e biodegradabilidade, permitem que processos industriais funcionem em condições de reação moderadas, com rendimentos aprimorados e geração de resíduos reduzida (Gurung *et al.*, 2013). Em contrapartida, mesmo levando em consideração todas as vantagens, as enzimas naturais não atendem muitas vezes a todos os requisitos de um processo industrial e precisam de mais adaptações ou redesenho para ajustar às propriedades catalíticas essenciais nessas condições (Brahmachari *et al.*, 2017). Apesar do sucesso de algumas enzimas de origem marinha terem chegado ao mercado, há ainda uma relativa carência de estudos para descoberta de novos biocatalisadores microbianos desses habitats.

Nesse contexto, a presente revisão objetiva apresentar o vasto e quase inexplorado potencial do repertório enzimático do microbioma marinho, abordando as principais características das hidrolases agarase, amilase, celulase, esterase, lipase, peptidase e quitinases, ressaltando sua importância nos âmbitos industrial e biotecnológico. As hidrolases são utilizadas em múltiplos setores industriais, e aqui, as enzimas isoladas de organismos marinhos e caracterizadas bioquimicamente foram destacadas quanto às suas potencialidades, como aquelas que são candidatas para o emprego em diversas indústrias e com exemplos de patentes ativas recentemente descritas. Dessa forma, esperamos que essa revisão contribua em instigar futuras pesquisas nessa

direção, especialmente em um país com a biodiversidade marinha tão rica e única como o Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo constitui uma revisão narrativa da literatura com caráter amplo que se propõe a transmitir o conhecimento acerca de enzimas hidrolíticas (agarases, amilases, celulases, esterases, lipases, peptidases e quitinases) isoladas do microbioma marinho. Para a seleção de artigos científicos, no período entre dezembro de 2019 a julho de 2020, foram utilizadas as bases de dados Pubmed e Google Scholar. Para a delimitação da pesquisa foram empregados os seguintes termos, considerando o texto inteiro: “marine hydrolytic enzymes” (média de resultados em ambas as bases de dados: 107 publicações); “agarase” (média de resultados: 170); “marine amylase” (média de resultados: 178); “marine cellulase” (média de resultados: 149); “marine esterase” (média de resultados: 780); “marine lipase” (média de resultados: 249); “marine peptidase” (média de resultados: 882); “marine peptidase” (média de resultados: 882); “marine quitinase” (média de resultados: 257); “hydrolytic enzymes” (média de resultados: 15000). Os critérios de inclusão foram: artigos de pesquisa em inglês publicados no período entre 2010 e 2020 que abordassem as enzimas hidrolíticas agarases, amilases, celulases, esterases, lipases, peptidases e quitinases isoladas do microbioma marinho; e fornecimento de informações acerca das suas características, ressaltando sua importância nos âmbitos industrial e biotecnológico. No total, foram utilizadas 119 publicações e, em casos específicos conforme citados no texto, publicações anteriores ao ano de 2010 foram incluídas neste artigo de revisão.

3. RESULTADOS

3.1 Enzimas microbianas

Atualmente, os catalisadores biológicos são divididos em sete classes pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês, “International Union of Biochemistry and Molecular Biology”): oxido-redutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5), ligases (classe 6) e translocases (classe 7) (Brahmachari *et al.*, 2017; Tipton, 2019).

A humanidade vem utilizando esses catalisadores biológicos na vida cotidiana desde os tempos pré-históricos. Exemplos representativos do uso de enzimas incluem a clarificação, filtração e produção de vinhos e cervejas e a panificação e fermentação do açúcar no álcool por levedura, já observados no Egito Antigo para preservação de alimentos e bebidas (Cornish-Bowden, 2011).

Além da maior especificidade em relação ao substrato, as enzimas podem apresentar vantagens adicionais em relação aos catalisadores químicos (sintéticos ou inorgânicos), catalisando reações químicas de maneira mais sustentável, apresentando elevada eficiência em algumas condições moderadas de pH,

temperatura e pressão (Gurung *et al.*, 2013). Características como alta seletividade e a biodegradabilidade atraem a atenção para seu emprego em processos industriais, oferecendo baixa toxicidade e impacto ambiental reduzido. Consequentemente, elimina-se o uso de solventes orgânicos e a liberação dos produtos tóxicos gerados mediante emprego de enzimas, em contrapartida dos catalisadores de origem química (Robinson, 2015; Chapman, Ismail e Dinu, 2018).

As enzimas podem ser produzidas tanto por microrganismos procarióticos, como bactérias e arqueias, quanto eucarióticos, como leveduras e fungos filamentosos. Os microrganismos são a principal fonte de enzimas industriais, visto que o número de enzimas que podem ser recuperadas economicamente de plantas e animais é limitado (Souza e Magalhães, 2010; Adrio e Demain, 2014). Dentre as vantagens das enzimas microbianas em relação às enzimas vegetais e animais, salienta-se sua maior estabilidade, fácil manuseio, produção facilitada em larga escala e mais econômica, variabilidade bioquímica, dependendo de um menor tempo e espaço devido à sua alta consistência e fácil manipulação genética (Schafer, Borchert e Nielsen, 2007; Nigam, 2013).

Além disso, o uso industrial de enzimas microbianas está recebendo mais atenção devido à sua atividade catalítica, especificidade, não toxicidade, natureza ecológica e relação custo-benefício (Singh, Singh e Pandey, 2019). Cerca de 50 % das enzimas utilizadas nas indústrias são obtidas de fungos, 35 % de bactérias e apenas 15 % de plantas e animais (Saranraj e Naidu, 2014; Thapa *et al.*, 2019). A maioria das enzimas comercialmente relevantes foram obtidas a partir de linhagens do gênero *Bacillus* e *Streptomyces*, e os principais fungos produtores são representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* (Sanchez e Demain, 2017).

O mercado mundial de enzimas expandiu em grande parte devido a dois fatores. Um deles foi o próprio aumento da população global, em que alguns estudos fizeram uma previsão de um crescimento de 28% na população mundial de 2015 a 2030. O segundo fator consistiu no aumento da consciência ambiental por conta dos consumidores e legislações mais rigorosas, levando a uma pressão pública e política. Isso vem promovendo uma maior procura de produtos e serviços gerados por uma miríade de processos industriais e, eventualmente, na implementação gradativa de enzimas na indústria (Singh *et al.*, 2016; Chapman, Ismail e Dinu, 2018).

Assim, esse aumento da demanda por enzimas no mercado global em todas as áreas em ritmo acelerado nos próximos anos, juntamente com a atualização das aplicações enzimáticas em processos industriais levará a um maior investimento em enzimas com alto desempenho, garantido por suas características específicas. Esse processo acarretará em um maior comprometimento com pesquisas focadas na exploração de novos biocatalisadores (Li, Yang e Yang, 2012; Brahmachari *et al.*, 2017).

De acordo com o relatório mais recente publicado pela Allied Market Research, o mercado global de enzimas

foi avaliado em US\$ 8,63 bilhões em 2019, e está projetado para atingir US\$ 14,5 bilhões até 2027. Algumas companhias monopolizam o mercado mundial de enzimas, como a dinamarquesa Novozymes que detém uma participação estimada de 48% no mercado global de enzimas (The Novozymes Report, 2018). Seguida de outras empresas com relevantes contribuições nessa área, tais como Koninklijke DSM NV (Holanda), DowDuPont Inc. (Estados Unidos da América - EUA), BASF SE (Alemanha), Advanced Enzyme Technologies Ltd. (Índia), AB Enzymes GmbH (Alemanha), Codexis, Inc. (EUA), Amano Enzyme, Inc. (China), Hoffmann-La Roche Ltd. (Suíça) e Thermo Fisher Scientific Inc. (EUA) (Allied Market Research, 2019).

As principais aplicações das enzimas industriais estão nos setores de papel, têxtil, detergente, alimentos, bebidas, rações animais, biocombustíveis e farmacêutica. Nesse aspecto, alimentos, rações e bebidas representam o maior segmento com receita de quase US \$ 1,2 bilhões somente no ano de 2011, com previsão anterior de crescimento para US \$ 2,0 bilhões até 2020. Em seguida, vem a indústria de detergentes, cujo mercado global foi avaliado em mais de US\$ 1,3 bilhões em 2017 (Guisan e Exposito, 2020).

As hidrolases representam a maioria das enzimas industriais em atual emprego comercial, aproximadamente cerca de 75% do total, consistindo majoritariamente nas peptidases, polissacaridases e lipases (Li, Yang e Yang, 2012; Arbige, Shetty e Chotani, 2019). Essas hidrolases são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como ilustrado na **Fig. 1**.

3.2 Enzimas microbianas marinhas

É previsto que o mercado global de biotecnologia marinha, estimado em US\$ 4,1 bilhões em 2015, possa chegar a US\$ 6,4 bilhões em 2025, com a identificação de novas enzimas derivadas de habitats marinhos (Smithersgroup, 2015; Di Donato *et al.*, 2019). No entanto, os mais variados ambientes marinhos ainda permanecem praticamente inexplorados biotecnologicamente, principalmente quando comparados aos ecossistemas terrestres (Ambrosino *et al.*, 2019). Acredita-se que essa enorme diversidade dos ambientes marinhos associada às demandas urgentes de alternativas cada vez mais sustentáveis irão suscitar em um estrondoso crescimento da biotecnologia marinha na próxima década (Daniotti e Re, 2021).

Oceanos e mares cobrem aproximadamente 71% da superfície da Terra, representando o maior e mais promissor reservatório aquático de biodiversidade do planeta (Zhao, 2011). Esses ambientes oferecem diversas condições únicas e frequentemente hostis para os organismos que o habitam. Os oceanos incluem extremos de luz, temperatura, pressão e salinidade. Regiões ricas em nutrientes coexistem com locais onde esses recursos são escassos ou relativamente incomuns. De modo amplo, todos as classes de microrganismos capazes de sobreviver a esses extremos ambientais, os extremófilos, podem ser



Fig. 1: Panorama geral das aplicações industriais das hidrolases agarase, celulase, amilase, esterase, lipase, protease e quitinase. Os quadros indicam os diferentes setores industriais e os asteriscos coloridos indicam qual a respectiva enzima utilizada na aplicação apresentada.

encontrados em ecossistemas marinhos, abrindo múltiplos caminhos para sua exploração biotecnológica (Imhoff, Labes e Wiese, 2011; Poli *et al.*, 2017).

No curso da evolução, o microbioma marinho se adaptou para desenvolver capacidades metabólicas únicas para garantir a sobrevivência em diversos habitats relativamente pobres em nutrientes. Além de produzir uma variedade de metabólitos distintos quando comparados aos produtos microbianos terrestres (Faulkner, 2000; Zehr, Weitz e Joint, 2017). Esses simbiontes microbianos possuem um repertório biomolecular, como enzimas e vias metabólicas específicas, nas quais muitas vezes servem para atender às demandas de seus respectivos hospedeiros (Ghosh *et al.*, 2005; Trincone, 2010). Diante da inexplorada diversidade metabólica desses microrganismos, esta pode ser aproveitada como uma fonte de potenciais enzimas naturalmente adaptadas para

certas necessidades industriais, constituindo consequentemente, alternativas mais vantajosas do que seus homólogos terrestres (Harrison et al. 2013; Ferrer *et al.*, 2018) (**Fig. 2**).

Considerando que a maioria dos processos industriais são conduzidos em condições adversas, como extremos de pHs (ácidos ou básicos), temperaturas (baixas e/ou altas) e salinidade elevada, existe um maior interesse nas chamadas “enzimas extremas” ou “extremoenzimas”, que são muito resistentes às condições extremas (Dumorné *et al.*, 2017). Microrganismos extremófilos e microrganismos simbióticos (arqueias e bactérias marinhas, como *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Staphylothermus*, além de actinobactérias e fungos) são fontes da maioria das enzimas marinhas com propriedades químicas e perfil de atividades biocatalíticas inéditas. Algumas dessas vêm sendo pesquisadas e até utilizadas em setores industriais, como alimentício e de detergentes (Trincone, 2011; Sana, 2013; Parages *et al.*, 2016).

O registro de patentes de enzimas hidrolíticas derivadas de microrganismos marinhos vêm aumentando nos últimos anos, conforme listado na **Tab. 1**, que sumariza as patentes para as hidrolases, mais especificamente abordadas nessa revisão, presentes no banco de dados Espacenet Patent publicado no intervalo de 2019-2020 (Disponível em: https://worldwide.espacenet.com/patent/?locale=en_EP).

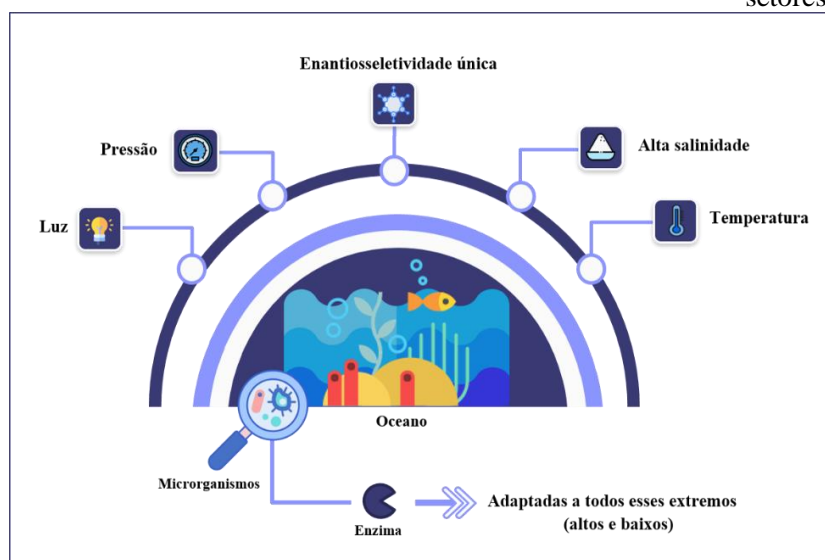


Figura 2. Características das enzimas microbianas marinhas e do ambiente marinho. Desenho esquemático do ecossistema marinho e suas características extremas indicadas pelas linhas azuis, bem como as enzimas produzidas pelas comunidades de microrganismos presentes nesses habitats e suas propriedades.

3.3 Polissacaridasas

3.3.1 Agarases

As agarases são as principais enzimas encarregadas pela degradação do ágar. Este heteropolissacarídeo complexo é geralmente encontrado na parede celular de algas vermelhas (Rhodophyceae) dos gêneros *Gelidium* e *Gracilaria* (Lee *et al.*, 2017). Estruturalmente, duas classes principais de polissacarídeos compõem o ágar: a agarose e a agaropectina.

A agarose é um polímero linear com alta massa molecular (>100 kDa), geralmente neutro (pH 7,0), constituída de unidades básicas de repetição de um dissacarídeo de β -D-galactopiranosose (G) e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (AHG). Essa unidade dissacarídica é denominada agarobiose se a direção da ligação *O*-glicosídica entre os resíduos de monossacarídeos for α (1 \rightarrow 3) e neoagarobiose (NA2) se a direção da ligação é β (1 \rightarrow 4). A agaropectina segue esse mesmo padrão de arranjo estrutural da agarose, contudo tem uma massa molecular menor (<20 kDa) e um teor de sulfato (SO₄²⁻) entre 5,0 e 8,0 %, o qual é maior do que o da agarose (cerca de 0,15 %) (Usov, 2011).

O ágar requer vários tipos de enzimas para sua hidrólise completa nos monômeros β -D-galactopiranosose (G), 3,6-anidro- α -L-galactose (AHG), L-galactose-6-sulfato (L6S) (Yun, Yu e Kim, 2017). Em geral, as agarases são divididas em duas classes com base no seu padrão de clivagem glicolítica: α -agarases (EC 3.2.1.158), que clivam as ligações α -1,3 e produzem agaroligossacarídeos (AOS); e β -agarases (EC 3.2.1.81), que clivam as ligações β -1,4 e geram neoagaroligossacarídeos (NAOs) como principais produtos (Chi, Chang e Hong, 2012).

Resumidamente, a agarose oligomérica é inicialmente clivada pela enzima α - ou β -agarase. Essa enzima cliva o ágar na ligação α -(1,3) ou β -(1,4), produzindo agarotetraose ou neoagarotetraose (NA4), respectivamente. Este sacarídeo tetramérico, como outras agaroses oligoméricas, é decomposto em agarobiose ou neoagarobiose (NA2) através da ação da α - ou β -agarase, respectivamente. Finalmente, a agarobiose ou neoagarobiose é clivada na ligação β -(1,4) ou α -(1,3) pela β -agarobiose hidrolase ou pela α -neoagarobiose hidrolase para produzir monômeros G ou AHG, respectivamente, que são incorporados nas vias centrais de metabolismo energético dos microrganismos (Chi, Chang e Hong, 2012; Jiang *et al.*, 2020).

Enzimas agarolíticas são encontradas majoritariamente em fontes marinhas, principalmente a partir de bactérias isoladas da água do mar, do sedimento ou da superfície, ou em associação com organismos marinhos (Li *et al.*, 2007). Dentre os principais gêneros bacterianos marinhos produtores de agarase até então relatados, destacam-se *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agarivorans*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Microbulbifer*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Salagentibacter*, *Thalassomonas* e *Zobellia* (Jahromi e Barzkar, 2018). As agarases têm uma ampla variedade de aplicações, tendo sido usadas para recuperação de DNA do gel de agarose, melhoria dos processos extrativos

modernos a partir das algas em que o ágar é encontrado, hidrólise do ágar para produzir oligossacarídeos, os quais possuem diversas atividades fisiológicas e farmacológicas benéficas para a saúde humana (Wang *et al.*, 2004; Gurvan *et al.*, 2006; Jahromi e Barzkar, 2018).

A partir de uma estirpe de *Pseudoalteromonas* sp. NJ21, isolada de sedimento na Antártica, foi isolada uma α -agarase com a capacidade de degradar agarose em NA2 como produto final. Esta enzima é uma candidata interessante para aplicações no setor de cosméticos e de medicamentos, devido às atividades antioxidantes dos oligossacarídeos derivados de agarases bacterianas (Li, Xie e Gao, 2019). A alta resistência das agarases ao sal e aos detergentes também pode ser particularmente útil em aplicações industriais. Uma β -agarase proveniente da bactéria marinha *Cellulophaga algicola* DSM 14237 mostrou alta tolerância ao sal, retendo mais de 70 % da atividade máxima na presença de NaCl a 2 M (Han, Zhang e Yang, 2019), sendo vantajosa em processos que necessitam ocorrer em uma maior concentração de sal.

Outra β -agarase isolada da estirpe marinha *Persicobacter* sp. OCCB-QB2 teve maior atividade em uma concentração de 0,1 % de SDS (do inglês, “*Sodium Dodecyl Sulfate*”) e Triton X-100, quando comparada a sua atividade na ausência destes detergentes (Hafizah, The e Furusawa, 2019). A resistência da agarase aos surfactantes é interessante, pois essas substâncias podem ter um efeito positivo na atividade enzimática, aumentando a estabilidade da enzima, a acessibilidade do substrato à enzima ou até a facilitação da interação enzima-substrato.

Uma estirpe de *Acinetobacter* PS12B, isolada a partir de sedimentos marinhos, evidenciou-se como produtora de uma agarase alcalina e termotolerante promissora, o que a torna interessante para aplicação em processos que ocorram em condições de reação em pH básico. O pH e a temperatura ideais para a atividade da agarase purificada foram de 8 e 40 °C, respectivamente. A atividade enzimática foi estimulada pela presença de íons Fe²⁺, Mn²⁺ e Ca²⁺, enquanto os reagentes redutores β -mercaptoetanol e ditioneitol aumentaram sua atividade em 30 a 40 %. A agarase purificada exibiu tolerância aos detergentes e a solventes orgânicos. Os principais produtos de hidrólise do ágar foram NA4 e também uma mistura de oligossacarídeos mais longos, NA6 e NA7. Os resíduos de alga hidrolisada pela enzima exibiram forte atividade antioxidante *in vitro*. O uso potencial desta enzima é indicado para produzir hidrolisado de algas marinhas com propriedades benéficas à saúde humana, além de aplicações como a produção de biocombustíveis (Leema e Sachindra, 2018; Park, Lee e Hong, 2020).

3.3.2. Quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14) podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade pelo substrato em endoquitinases (EC 3.2.1.14) e exoquitinases. As enzimas endo-quitinolíticas, mais comumente chamadas de quitinases (EC 3.2.1.14), são caracterizadas por sua capacidade de hidrolisar quitina aleatoriamente ao longo da cadeia interna para gerar oligômeros solúveis de

Tabela 1. Patentes encontradas para enzimas hidrolíticas marinhas.

| Palavra-chave | Publicação | Título | Ano |
|----------------------------------|----------------|--|------|
| marine agarase | KR102070415B1 | Novel alpha-agarase and enzymatic preparation of agar derived odd-numbered oligosaccharides using the alpha-agarase | 2020 |
| | CN110724677A | Agarase and preparation method thereof | 2020 |
| | CN110438108A | Beta-agarase, and gene and application thereof | 2019 |
| | CN110438105A | Alpha-agarase, preparation method and application thereof | 2019 |
| | KR101997047B1 | G7 - AgaJ5 A beta-agarase AgaJ5 from <i>Gayadomonas joobiniege</i> G7 and use thereof | 2019 |
| | CN109182305A | Specific Beta-agarase producing neoagarose and application thereof | 2019 |
| | CN109182306A | Beta-agarase with homogeneous degradation products and application thereof | 2019 |
| marine amylase | CN109679937A | Raw amylolytic enzyme with high specific enzyme activity as well as coding gene and application thereof | 2019 |
| marine cellulase | CN111154701A | Strain producing alginate lyase and cellulase, and application of strain in kelp fermentation | 2020 |
| | CN110804560A | Yeast strain 9-1 capable of producing cellulase and protease, application and microbial formulation of yeast strain 9-1 as well as preparation method and application of microbial formulation | 2020 |
| | CN110438136A | Beta-glucosidase as well as gene, amino acid sequence and application of beta-glucosidase mutant | 2019 |
| marine protease | CN110452834A | Protease-producing <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> and application thereof | 2019 |
| | CN110438035A | Protease-producing <i>Marinobacterium georgiense</i> and application thereof | 2019 |
| marine esterase marine lipase | KR102128738B1 | Variants of Esterase Isolated from the Marine Bacterium | 2020 |
| | CN111019921 | High-tolerance lipid hydrolase E93 as well as coding gene and application thereof | 2020 |
| | CN110184254A | Esterase mutant with high alkali resistance and application thereof | 2019 |
| | CN109943550A | Marine bacterium-derived esterase Erp3 and encoding gene and application thereof | 2019 |
| | CN110982804A | Lipase and application thereof in acquisition of DHA enriched glyceride | 2020 |
| marine chitinase | KR20200040101A | Lipase from <i>Croceibacter atlanticus</i> | 2020 |
| | KR102097720B1 | Lipase from <i>Marinobacter lipolyticus</i> | 2020 |
| | CN110540980A | Lipase mutant of marine <i>Streptomyces</i> and application of lipase mutant | 2019 |
| | KR20200027482A | Novel chitinase-producing <i>Salinivibrio</i> sp. <i>Kostichola</i> BAO1801 strain and use thereof | 2020 |
| | CN110423711A | South-pole-derived strain producing low-temperature chitinase and fermentation method thereof | 2019 |
| | CN109897861A | <i>Portunus trituberculatus</i> chitinase gene as well as recombinant expressed protein and application thereof | 2019 |
| | CN109402092A | Chitinase derived from marine environment and gene thereof | 2019 |
| | CN109943553A | Chitinase low temperature resistant mutant and application thereof | 2019 |
| | US2019127715A1 | Recombinant Extracellular Chitinase From <i>Brevibacillus laterosporus</i> For Biological Control And Other Industrial Uses | 2019 |
| | KR102027295B1 | Novel chitinase-producing <i>Salinivibrio</i> sp. strain and use thereof | 2019 |

N-acetilglucosamina (GlcNAc), ao passo que as enzimas exo-quitinolíticas clivam progressivamente duas subunidades das extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de quitina (Jung *et al.*, 2005).

As enzimas exo-quitinolíticas clivam progressivamente duas subunidades das extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de quitina. As exo-quitinases são divididas em duas subcategorias, quitobiosidase (EC 3.2.1.29), que libera diacetilquitobiose na extremidade não redutora das microfibrilas de quitina, e *N*-acetilglucosaminidase (EC 3.2.1.30), que cliva *N*-acetilglicossacarídeos para gerar monômeros de GlcNAc (Sahai e Manocha, 1993; Hamid *et al.*, 2013). No entanto, a IUBMB fundiu ambas as subfamílias, EC 3.2.1.29 e EC 3.2.1.30, em uma única categoria, β -*N*-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52). As quitinases são sintetizadas por vários microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos, além de insetos e plantas. Elas foram isoladas de vários microrganismos marinhos, incluindo bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Vibrio*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Streptomyces* e *Alteromonas* e alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus terreus* e *Aspergillus carneus* (Beygmoradi *et al.*, 2018).

As quitinases têm exibido um profícuo potencial quanto ao seu emprego na indústria de alimentos, bem como nos setores biomédicos e da agricultura. As aplicações que usam o processamento baseado em quitinases são econômicos, ecológicos e considerados não danosos ao ambiente (Le e Yang, 2019). A quitina, um biopolímero constituído de *N*-acetil-D-glucosaminas conectadas por ligações β -1,4-glicosídicas, é o segundo polímero de carboidrato mais abundante no mundo (Muzzarelli, 2013), podendo ser encontrados naturalmente como componente essencial em diferentes estruturas vivas.

Este polímero é produzido por diversos organismos marinhos, como moluscos, protozoários, fungos e crustáceos (Ramesh e Tharanathan, 2003). A desacetilação de forma parcial da quitina leva à formação de quitosana, um polissacarídeo catiônico natural. A quitosana e a quitina apresentam propriedades biológicas interessantes, como agentes antimicrobianos, antibacterianos, antivirais, cicatrizantes, hipocolesterolêmico, hemostático e antioxidante (Hamed, Ozogul e Regenstein, 2016). No entanto, a aplicação destes polissacarídeos é limitada por conta da grande viscosidade e da baixa solubilidade em valores de pH neutros. A hidrólise química ou enzimática de quitosana e quitina resulta na geração de quitooligossacarídeos (COS) solúveis em água e significativamente menos viscosos que a quitina e quitosana (Yan e Fong, 2015).

Uma estirpe psicotolerante de *Pseudomonas* GWSMS-1 foi isolada de sedimento marinho e apresentou atividade quitinolítica. A atividade máxima do extrato enzimático bruto foi verificada a 35 °C e pH 4,5, com excelente atividade também sob temperatura baixa, possuindo mais de 50 % de sua atividade máxima a 0 °C. Além disso, a quitinase inibiu significativamente o crescimento dos fungos *Verticillium dahlia* CICC2534

e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerina* CICC2532, responsáveis pela murcha do algodão e da praga do pepino, respectivamente (Liu *et al.*, 2019). A inibição do crescimento desses fungos chama atenção para a possível aplicação da enzima nas plantações de algodão e pepino, na qual poderá impedir a perda desses produtos por conta das doenças.

Em outro estudo, as bactérias *Streptomyces laurentii* SN5 e *Cellulosimicrobium funkei* SN20, isoladas de resíduos de casca de camarão marinho, foram ativas na degradação da quitina, apresentando atividades enzimáticas de 0,533 e 0,537 U/mL, respectivamente. Essas duas estirpes bacterianas chamam atenção por serem boas candidatas para serem aplicadas na produção de quitinase e na reciclagem ambiental de resíduos de quitina descartáveis (como a quitina de resíduos de cascas de camarões), sendo uma alternativa sustentável (Ali *et al.*, 2020).

3.3.3 Holocelulases

As holocelulases são enzimas capazes de degradar a celulose, um polímero de cadeia longa formado por monômeros de glicose, entre 15 a 15.000, unidos por ligações *O*-glicosídicas. Quanto às enzimas do complexo celulolítico, suas principais aplicações incluem as indústrias têxtil, de papel, de celulose, alimentos, ração animal, combustível, além de indústrias químicas no gerenciamento de resíduos e na indústria farmacêutica (Bajaj e Mahajan, 2019).

As holocelulases pertencem à classe das hidrolases e são divididas em três grupos principais: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Wood e Garcia-Campayo, 1990; Yang, El-Enshasy e Thongchul, 2013). As endoglucanases atuam hidrolisando ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando dissacarídeos de cadeia longa (extremidades não redutoras), que são clivadas por exoglucanases ou celobiohidrolases em oligossacarídeos de cadeia mais curta. Existem dois tipos de exoglucanases (1,4-beta-celobiosidase), que atuam de forma unidirecional nos oligômeros de cadeia longa, desde as extremidades redutora (EC 3.2.1.176) ou não redutora (EC 3.2.1.91), liberando celobiose, que é posteriormente hidrolisada em glicose pelas β -glucosidases (Juturu e Wu, 2014; Brahmachari *et al.*, 2017).

Além das celulases de origem terrestre, as celulases microbianas de ambiente marinho também demonstraram uma conversão bem-sucedida da biomassa vegetal à base de celulose em açúcares fermentáveis. Várias fontes microbianas marinhas foram relatadas como produtoras de celulases, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Nesse sentido, destacam-se os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mitococcus*, *Penicillium* e *Trichoderma* e bacterianos *Acetivibrio*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Nocardiopsis*, *Pseudomonas*, *Rumminococcus*, *Streptomyces* e *Vibrio* (Trivedi, Reddy e Lali, 2016; Barzkar e Sohail, 2020).

Um exemplo interessante de celulases com aplicações industriais consiste na estirpe marinha *Bacillus* sp.

OH1666, que produz uma celulase com termoestabilidade e atividade específica em ampla faixa de pH (3,0 a 9,0). Esta enzima demonstrou ser um agente potencial para sacarificação da biomassa de algas marinhas em uma única etapa (Harshvardhan, Mishra e Jha, 2013). Tal característica chama atenção pelo fato da possibilidade de uma sacarificação mais econômica, por conta da necessidade do uso de uma enzima em uma etapa única.

A estirpe *Bacillus carboniphilus* CAS-3, isolada de sedimentos marinhos da costa indiana, foi descrita por apresentar ótima atividade celulolítica com aplicação na sacarificação extensiva de palha de arroz pré-tratada, rendendo cerca de 15,56 g/L de açúcar redutor em 96 h (Annamalai, Rajeswari M, Balasubramanian e 2014). Essa celulase desperta interesse, pois tem potencial de aplicação na produção de açúcares redutores a partir da biomassa celulósica em etanol, um combustível renovável.

Uma β -glucosidase, produzida pela estirpe *Pseudomonas lutea* BG8, foi ativa em uma ampla faixa de temperatura (5 a 30 °C) e aplicada na produção de bioetanol com a proposta de diminuir o consumo de energia. A eficiência da enzima foi por causa da sua eficiência na sacarificação de celulose sob temperatura baixa (Tiwari *et al.*, 2016).

A endoglucanase Bc22Cel tolerante ao sal secretada pela estirpe *Bacillus* sp. SR22, exibiu ampla resistência ao pH e à temperatura, com valores ótimos de atividade de 6,5 e 60 °C, respectivamente. Bc22Cel ainda demonstrou propriedade halofílica considerável, sendo capaz de manter mais de 70% de sua atividade residual, mesmo quando pré-incubada com NaCl a 1,5 M por 1 h. A enzima Bc22Cel foi indicada como uma potencial endoglucanase para aplicações industriais, como a bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em seus derivados em produtos de alto valor agregado (Dos Santos, De Veras e De França, 2018).

Como citado nos exemplos acima, as celulases produzidas por microrganismos isolados de fontes marinhas apresentam potencial de aplicação principalmente na sacarificação de materiais celulolíticos e na geração de biocombustíveis, além de atuarem em ampla faixa de pH e temperatura, o que as tornam bastante interessantes.

3.3.4. Amilases

As enzimas amilolíticas atuam na catálise da hidrólise do amido, um carboidrato constituído por cadeias de alfa-D-glucose que podem ser lineares (amilose) ou ramificadas (amilopectina), podendo ser α -, β -, ou γ -amilases, de acordo com o tipo de ligação que são capazes de clivar. As α -amilases endo-específicas (EC 3.2.1.1) hidrolisam as ligações α -1,4 internas nas cadeias de amilose/amilopectina para produzir produtos como glicose e maltose (Kandra, 2003) e as pululanases (EC 3.2.1.41) atuam apenas em ligações α -1,6 das ramificações, originando maltodextrinas de cadeia linear. As amiloglucosidases exo-específicas ou glucoamilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as cadeias amilose/amilopectina da extremidade não redutora e liberam uma unidade de glicose por vez (Sundarram e Murthy, 2014).

Além dessas, existem diferentes tipos de exoamilases como β -amilases (EC 3.2.1.2) e maltotetra-hidrolases (EC 3.2.1.60), que atacam as extremidades não redutoras pela hidrólise de ligações α -1,4-glucana e liberam oligômeros de duas e quatro unidades de glicose, respectivamente (Suriya *et al.*, 2016). Em adição, a α -glucosidase (EC 3.2.1.20), uma exo-hidrolase, cliva unidades de glicose a partir da extremidade não redutora de α -1,4 de oligossacarídeos e polissacarídeos de fragmentos de amido (Isaksen, Cowieson e Kragh, 2010).

A aplicação de amilases expandiu-se em muitos campos, como na química clínica, medicinal e analítica, bem como na sua tradicional aplicação na sacarificação de amido e nas indústrias têxtil, alimentícia, de fabricação de cerveja e destilados, no tratamento de materiais celulósicos, couro, detergentes e indústria farmacêutica (Souza e Magalhães, 2010; Mehta e Satyanarayana, 2016).

Amilases são produzidas por várias bactérias, fungos e espécies geneticamente modificados de microrganismos. Dentre as espécies bacterianas, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* e várias outras espécies desse gênero são amplamente utilizados para a produção comercial da enzima. As fontes fúngicas de amilase estão restritas a estirpes terrestres, principalmente a espécies de *Aspergillus* e a poucas espécies de *Penicillium*, sendo *Penicillium brunneum* uma delas (Sundarram e Murthy, 2014; Gopinath *et al.*, 2017).

Atividade sob baixas temperaturas, tolerância ao sal, pH e com termoestabilidade de amilases específicas de diferentes espécies de bactérias, fungos e leveduras marinhas são características interessantes para inúmeras indústrias. As principais fontes microbianas de origem marinha para a produção de α -amilases são variadas espécies de *Bacillus* e de β -amilase são *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* sp. e *Rhizopus japonicus* (Suriya *et al.*, 2016; Trincone, 2018).

Um exemplo de aplicação biotecnológica desta enzima é para a produção de pululano, um polissacarídeo composto de unidades de maltotriose produzida por *Aureobasidium pullulans*. No estudo de Lu e colaboradores (2010), uma α -amilase isolada da estirpe marinha adaptada a frio *Pseudoalteromonas arctica* GS230 foi produzida por expressão heteróloga e aplicada na hidrólise do amido a partir de batata crua. Os produtos da hidrólise foram usados para produção de pululano por uma estirpe marinha de *Aureobasidium*. Pela flexibilidade de suas unidades interligadas de maltotriose, o pululano possui propriedades interessantes na produção de filmes transparentes finos, resistência ao óleo e impermeabilidade ao oxigênio, além de sua importante utilização nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (Wu *et al.*, 2016).

A amilase HP664 produzida pela bactéria marinha *Catenovolum* sp. OX3, demonstrou-se ativa de 20 a 50 °C e possui tolerância a álcalis e solventes orgânicos, propriedades especialmente interessantes para produção de biocombustíveis a partir de amido. Após sua expressão heteróloga, a enzima recombinante foi aplicada na produção de bio-hidrogênio e obteve um rendimento 3,73

vezes superior ao controle sem o tratamento com HP664, através da fermentação por espécies de *Clostridium* (Wu, Mao e Sun, 2017). Essas características também foram verificadas na amilase alcalofílica LaaA proveniente de *Luteimonas abyssii*, uma bactéria isolada de sedimento de ambientes profundos. Especialmente sob baixas temperaturas, LaaA pode manter mais de 38 % da atividade máxima a 10 °C, o que significa que pode ser usada de forma a economizar energia. A amilase foi capaz de manter sua atividade sem cálcio, além de se manter altamente ativa mesmo em baixas temperaturas, características favoráveis na indústria de detergentes (Song *et al.*, 2016).

Uma nova α -amilase (AmyZ1) foi isolada da estirpe *Pontibacillus* sp. ZY de mar profundo AmyZ1 recombinante mostrou alta atividade enzimática nas faixas de pH 6,0-7,5 e temperaturas de 25 a 50 °C, sendo a atividade ideal a pH 7 e 35 °C. Semelhante à maioria das α -amilases, a atividade de AmyZ1 foi aumentada (2,4 vezes) na presença de 1,0 mM de Ca²⁺. Utilizando amido de arroz cru como substrato, a atividade específica de AmyZ1 foi de 12.621 \pm 196 U/mg, muito maior do que outras hidrolases com especificidade para amido cru já relatadas. Além disso, ao hidrolisar o amido de milho cru usando a combinação de AmyZ1 e glucoamilase comercial, a taxa de hidrólise atingiu 75 % após 4,5 h de reação, notavelmente mais elevada do que a obtida nas indústrias de processamento de amido (Fang, Xue e Deng, 2019). Dessa forma, essa enzima pode ser uma boa candidata a ser utilizada para realizar a hidrólise do amido no meio industrial, com uma atividade específica bem alta.

3.3.5. Carboxietilsterases

Dois classes principais de hidrolases são de extrema importância: esterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico) e lipases (EC 3.1.1.3, hidrolases de triacilglicerol) (Bornscheuer, 2002). As lipases são principalmente ativas contra substratos insolúveis em água, como triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres "simples" e geralmente apenas triglicerídeos compostos por ácidos graxos menores que C6 (Ali, Verger e Abousalham, 2012).

3.3.6. Esterases

As esterases (EC 3.1.1.1) são amplamente empregadas nas indústrias têxtil, de alimentos e bebidas, de laticínios, médica e farmacêutica, de cosméticos e perfumes (Panda e Gowrishankar, 2005), compreendendo um grupo diverso de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ligações éster. Essas enzimas exibem alta especificidade regional- e estereoespecificidade, o que as tornam atraentes biocatalisadores na produção de compostos opticamente puros na síntese química fina (Lopes *et al.*, 2011).

As esterases já foram extensivamente isoladas de plantas, animais e microrganismos. Dentre os microrganismos marinhos produtores de esterase, chamam a atenção estirpes dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Thalassospira*, *Oleispira*,

Erythrobacter, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Pseudoalteromonas*. A maior parte das esterases bacterianas marinhas são halotolerantes e tolerantes em diferentes solventes orgânicos, atuam em uma ampla faixa de pH e mantêm a tolerância em temperaturas relativamente baixas (< 20 °C). Exemplos notórios de suas aplicações englobam a síntese de isômeros farmacologicamente ativos, degradação de poliésteres, degradação de xenobióticos e imobilização de biocatalisadores em interfaces não-aquosas (Sayali e Satpute, 2013; Barzkar *et al.*, 2021).

As enzimas lipolíticas com características físico-químicas únicas estão ganhando mais destaque por sua imensa importância industrial. A partir da bactéria marinha *Psychrobacter pacificensis*, uma nova esterase recombinante, Est11, foi capaz de hidrolisar ésteres de cadeia curta (C2 a C8) e exibiu uma atividade ótima contra o éster de butirato (C4), sob temperaturas de 25 a 30 °C e pH 7,5. Est11 reteve mais de 70 % de sua atividade original a 10 °C, sugerindo que era uma esterase "adaptada ao frio". A enzima foi altamente ativa e estável sob alta concentração de NaCl (5 M) e a incubação com etanol, isopropanol, propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila e glicerol produziu efeitos positivos notáveis na atividade da enzima. Essa nova enzima esterolítica com propriedades como adaptabilidade a baixas temperaturas, tolerância ao sal e a solventes orgânicos é uma candidata interessante para atender às necessidades de diversos processos industriais severos (Wu *et al.*, 2015a).

Outra esterase microbiana marinha de *Pseudomonas oryzihabitans* HUP022 isolada de grandes profundidades no Oceano Pacífico exibiu uma ampla tolerância a maioria dos solventes orgânicos, surfactantes e íons metálicos testados. Essa esterase é um biocatalisador com excelente potencial na síntese assimétrica nas indústrias química e farmacêutica e poderia ser um substituto aos métodos tradicionais que causam poluição ambiental (Wang *et al.*, 2016). Sendo assim, além de conseguir atuar em condições adversas de solventes e outras substâncias, a enzima também contribuiria com a redução da poluição.

Uma esterase recombinante, EstLiu, isolada a partir de *Zunongwangia profunda* mostrou a maior atividade a 30 °C. Além disso essa enzima manteve mais de 90 % de sua atividade na faixa de 20 a 40 °C, e exibiu especificidade ampla a substratos com a maior atividade hidrolítica contra butirato de *p*-nitrofenil (C4). A atividade ótima da enzima foi em pH 8 e a 30 °C, com termoestabilidade e inativação acelerada acima de 60 °C. EstLiu apresentou uma atividade residual impressionante de 75 % a 0 °C e reteve sua atividade original também frente a 50 % (v/v) de etanol, isopropanol, DMSO e etileno glicol, bem como na presença de Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 (Rahman *et al.*, 2016). Essa esterase demonstra ser muito interessante, principalmente por conta da sua atividade a 0 °C, possibilitando a sua aplicação em reações sob baixas temperaturas.

3.3.7 Lipase

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) têm sido utilizadas em uma ampla variedade de aplicações

nas áreas de farmácia, química fina, alimentos, cosméticos, meio ambiente e energia (Robic *et al.*, 2017). Elas pertencem à classe das serina hidrolases e catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol, diacilgliceróis, monogliceróis e ácidos graxos livres. Além disso, as lipases catalisam a hidrólise e a transesterificação de outros ésteres, bem como a síntese de ésteres e exibem propriedades enantiosseletivas (Treichel *et al.*, 2009).

Geralmente, a hidrólise das ligações éster ocorre na interface entre uma fase de substrato insolúvel e a fase aquosa em que as enzimas lipolíticas permanecem dissolvidas. Na natureza, as lipases apresentam variações quanto as suas especificidades de reação. Algumas têm afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (C2, C4, C6, C8 e C10), enquanto outras têm preferência por ácidos graxos insaturados (oleico, linoleico, linolênico, etc.), e existem até mesmo aquelas que são inespecíficas e dividem aleatoriamente os ácidos graxos dos triacilgliceróis (Brahmachari *et al.*, 2017).

Utilizando métodos de comparação baseados em sequência, novas famílias de enzimas lipolíticas foram integradas ao sistema prévio de classificação, consistindo atualmente em 35 famílias e 11 subfamílias de lipases verdadeiras (Hitch e Clavel, 2019). As lipases são onipresentes, sendo produzidas por uma variedade de organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos. Várias lipases de bactérias marinhas já foram descritas, possuindo tolerância a variadas concentrações salinas, pH levemente ácido/alcalino e baixa temperatura. As principais bactérias marinhas produtoras de lipases pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (Treichel *et al.*, 2009; Sathishkumar *et al.*, 2015; Javed, Azeem e Hussain, 2018).

Enzimas psicrófilas são interessantes por apresentarem atividades sob baixas temperaturas (0 a 12 °C), características interessantes por minimizarem os requisitos de energia e por reduzir o risco de contaminação microbiana. O uso de enzimas ativas sob temperaturas baixas é quase obrigatório no processamento de carnes e frutos do mar e particularmente atraente em formulações para detergentes ativos a baixa temperatura (Sarmiento, Peralta e Blamey, 2015).

A lipase recombinante de *Colwellia psychrerythraea*, uma bactéria psicrófila, exibiu condições ideais de atividade sob pH 7 e a 25 °C, retendo mais de 80 % da atividade entre 5 °C e 15 °C. Essas características foram consideradas promissoras para o tratamento de águas residuais com altas concentrações de lipídeos, pois a temperatura da drenagem de águas residuais é relativamente baixa (Watanabe, Yamaoka e Fukunaga, 2002). A lipase produzida por uma estirpe de *Pseudomonas otitidis* isolada de sedimento marinho apresentou uma atividade específica de 5647 U/mL com azeite de oliva como substrato, e reteve a maior parte de sua atividade em pH 5 a 9, em uma faixa de temperatura entre 30 °C e 80 °C, e na presença de solventes orgânicos apolares (Navvabi *et al.*, 2018).

Um total de 20 estirpes bacterianas marinhas foram obtidas do Mar Mediterrâneo e foram avaliadas quanto à produção de lipases. Todas as estirpes apresentaram

capacidade lipolítica e a produtora mais promissora foi identificada como *Bacillus cereus*. Os fatores mais significativos que afetaram a produção da lipase foram as concentrações de FeSO₄, KCl e concentrações de azeite e óleos de sésamo, milho, palma, coco, e de semente de algodão. A imobilização por adsorção em suporte esponjoso aumentou a atividade da lipase em 2,8 vezes em comparação com as células livres. Seguidamente à um teste para o tratamento de águas residuais oleosas com essa lipase, as eficiências de remoção da demanda biológica de oxigênio, sólidos totais em suspensão e óleo e graxa foram de 87, 63, 90 e 94,7 %, respectivamente. Essa enzima lipolítica de *B. cereus* também poderia ser empregada para aplicações futuras no tratamento de esgoto (Hassan, Abd El Latif e Ali, 2018).

Conforme apresentado nos exemplos acima, as lipases de origem marinha são enzimas bem interessantes, podendo utilizar diferentes substratos, até mesmo aqueles encontrados no nosso dia a dia, como o azeite de oliva. Um diferencial quando comparadas as lipases de origem não marinha é a atuação em uma ampla faixa de temperatura e pH, com aplicações tanto industriais quanto ambientais.

3.3.8. Peptidases

As peptidases ocupam uma posição central em relação às suas aplicações em campos fisiológicos e comerciais, em que mais de 60 % do mercado mundial de enzimas é dedicado a produção comercial dessas enzimas (Sanchez e Demain, 2017). No geral, as peptidases são aplicadas nos setores industriais de alimentos, bebidas, laticínios, alimentação animal, detergentes, indústria de couro, têxtil e farmacêutica (Badgujar e Mahajan, 2010). Elas agrupam um grupo grande e complexo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (Trincone, 2012). A IUBMB e o MEROPS, bancos de dados que auxiliam na classificação de enzimas proteolíticas e seus inibidores, recomendam exclusivamente a adoção do termo “peptidase” para denominar todas as proteases (McDonald, Boyce e Tipton, 2009; Rawlings *et al.*, 2018).

Assim, as peptidases são classificadas com base no tipo de ligação que catalisam, nos mecanismos químicos de catálise e na estrutura molecular e por homologia de sequência aminoácídica (Barrett e Rawlings, 2007). De forma ampla, no que diz respeito as reações catalisadas, as peptidases podem ser do tipo endopeptidases (EC 3.4.21-99), quando clivam em regiões internas do peptídeo ou exopeptidases (EC 3.4.11-19) (Sakamoto, Suzuki e Iizuka, 2014). Os microrganismos contribuem com dois terços da produção comercial de peptidases e representantes do gênero *Bacillus* são os dominantes na produção dessas enzimas, principalmente utilizadas nas formulações de detergentes para a remoção de manchas de sangue de tecidos, produção de peptídeos bioativos, processamento de alimentos, reações enantiosseletivas e depilação de peles na indústria têxtil (Contesini, Melo e Sato, 2018).

Alguns microrganismos marinhos como *Streptomyces fungicidicus*, espécies de *Bacillus*, *Pyrococcus furiosus* e *Thermococcus*, são os mais descritos como produtores de peptidases (Barzkar *et al.*, 2018). A peptidase do hipertermófilo marinho

Staphylothermus marinus é patenteada (Garabed Antranikian e Michael Klingeberg; Thermostable protease from *Staphylothermus*; WO1991019791A1, 1991; PCT), tendo um pH ótimo na faixa alcalina e temperatura ideal de 95 °C. Mais especificamente, a presente invenção se refere a uma protease termoestável de *Staphylothermus marinus*, um processo para a preparação dessas enzimas e composições detergentes compreendendo essas enzimas. Além disso, também é relatado o uso de enzimas proteolíticas partir de bactérias hipertermofílicas, como *Pyrococcus furiosus* ou *Thermococcus* na formulação de detergentes (Kelly *et al.*, 1995; Trincone, 2012).

Uma peptidase marinha psicrófila foi isolada de *Flavobacterium* YS-80 na costa oeste chinesa. A peptidase purificada sob condições otimizadas de fermentação apresentou características que conferiam uma estrutura total estável e menos flexível, resultando em maior estabilidade térmica. Essa estabilidade a temperatura é uma característica essencial em processos industriais que demandam de mais tempo para ocorrer, não ocorrendo perda significativa da atividade enzimática ao longo do tempo (Zhang, Sun e Li, 2011).

A estirpe marinha *Pseudoalteromonas* sp. 129-1 teve sua peptidase alcalina extracelular purificada, a qual manteve atividade e estabilidade consideráveis em uma ampla faixa de temperatura (10 a 60 °C), e pH (6 a 11) e a atividade ótima foi detectada na temperatura de 50 °C e pH 8. O inibidor da metaloprotease ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês “*ethylenediamine tetraacetic acid*”) não apresentou efeito inibitório na atividade da peptidase, mesmo em concentrações de até 15 mM, enquanto o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, do inglês, “*phenylmethylsulfonyl fluoride*”), um inibidor comum de serina protease, inativou consideravelmente a enzima (Wu *et al.*, 2015b).

Foi observada alta estabilidade da protease na presença de surfactantes (SDS, Tween 80 e Triton X-100) e agente oxidante (H₂O₂). Além disso, a peptidase foi tolerante a maioria dos solventes orgânicos testados, o que desperta interesse para possível utilização da enzima em reações que necessitem da presença desses solventes. Curiosamente, o biofilme de *P. aeruginosa* PAO1 foi bastante reduzido na presença de 0,01 mg/mL da peptidase e quase completamente dissolvido na concentração de 1,0 mg/mL, indicando uma possível aplicação dessa protease no setor biomédico (Wu *et al.*, 2015b).

Nesse âmbito, as enzimas fibrinolíticas consistem em um alvo interessante na área de biocatalisadores terapêuticos. Uma peptidase fibrinolítica foi purificada a partir da actinobactéria marinha *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1 isolada de sedimento da costa sudeste da Índia. As condições ideais de cultivo para a produção de peptidase fibrinolítica foram com glicerol, farelo de soja, pH 7,2, a 37°C e a quantidade máxima de proteína atingida foi 1945,79 mg/mL. Após os procedimentos de otimização, a produção da enzima fibrinolítica foi melhorada em torno de 13 %. Essa protease fibrinolítica mostrou ser um agente trombolítico potencial com alta eficiência de lise de coágulo (Verma *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de revisão buscou abordar as principais características das enzimas microbianas marinhas, mais especificamente da classe das hidrolases, evidenciando sua relevância para os campos biotecnológicos e industriais. Apesar de muitas informações serem conhecidas a respeito das enzimas das demais fontes, aquelas provenientes do ambiente marinho não são bem elucidadas, tendo em vista que esse ecossistema é escassamente explorado quando comparado com os demais. Justamente os oceanos, que cobrem uma área tão grande do mundo e apresentam características diversas e hostis, são uma excelente fonte de microrganismos, capazes de produzir variados tipos de moléculas com propriedades interessantes, destacando os exemplos de hidrolases abordadas ao longo desta revisão.

Essas hidrolases apresentam propriedades muito relevantes no campo industrial, como tolerância a sal e solventes orgânicos e atividades em condições extremas de pH e temperatura. Além disso, essas enzimas são produzidas naturalmente pelos microrganismos, de acordo com o ambiente no qual estão inseridos, sendo obtidas de fontes naturais, e podem ter sua produção controlada e ajustada de modo a favorecer suas diversas características vantajosas aqui relatadas.

Sendo assim, em virtude dos aspectos aqui elucidados, a ampliação dos conhecimentos acerca do potencial biotecnológico do ambiente marinho deve ser estimulada, já que esse pode abrigar possíveis produtores de exoenzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, com características únicas, biodegradáveis, e de possível produção em larga escala. Portanto, explorar a atividade das enzimas microbianas se torna uma excelente alternativa para serem empregadas no contexto industrial.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às seguintes agências de fomento pelas bolsas de produtividade e de formação de recursos humanos na pós-graduação: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processos: 88887.613830/2021-00 e 88887.613831/2021-00), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo: 306395/2020-7) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, processos: E-26/200.948/2021, E-26/211.284/2021 e E-26/202.144/2020).

REFERÊNCIAS

- Adrio JL, Demain AL. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1): 117-139.
- Ali M, Aljadaani S, Khan J, Sindi I, Aboras M, Aly M. 2020. Isolation and Molecular Identification of Two Chitinase Producing Bacteria from Marine Shrimp Shell Wastes. *PJBS*, 23(2): 139-149.
- Ali YB, Verger R, Abousalham A. 2012. Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. *Methods in Molecular Biology*, 861: 31-51.

<https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>.

Acesso em 11/05/2020.

Ambrosino L, Tangherlini M, Colantuono C, Esposito A, Sangiovanni M, Miralto M. 2019. Bioinformatics for Marine Products: An Overview of Resources, Bottlenecks, and Perspectives. *Marine Drugs*, 17(10): 576.

Annamalai N, Rajeswari M, Balasubramanian T. 2014. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass and Bioenergy*, 68: 151-160.

Arbige M, Shetty J, Chotani G. 2019. Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends in Biotechnology*, 37(12): 1355-1366.

Badgajar S, Mahajan R. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9): 2048.

Bajaj P, Mahajan R. 2019. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21): 8711-8724.

Barrett A, Rawlings N. 2007. 'Species' of peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 388: 1151-1157.

Barzkar N, Homaei A, Hemmati R, Patel S. 2018. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*, 22(3): 335-346.

Barzkar N, Sohail M. 2020. An overview on marine cellulolytic enzymes and their potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16): 6873-6892.

Barzkar N, Sohail M, Tamadoni Jahromi S, Gozari M, Poormozaffar S, Nahavandi R, Hafezieh M. 2021. Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(4): 1187-1214.

Beymoradi A, Homaei A, Hemmati R., Santos-Moriano P, Hormigo D, Fernández-Lucas J. (2018). Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23): 9937-9948.

Brahmachari G, Demain A, Adrio J. 2017. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production. (Biocatalysis for Industrial Applications)*. 1st Edition. EUA: Academic Press, pp. 1-37.

Bornscheuer U. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Microbiology Reviews*, 26(1): 73-81.

Chapman J, Ismail A, Dinu C. 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6): 238.

Chi W, Chang Y, Hong S. 2012. Agar Degradation by Microorganisms and Agar-Degrading Enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94: 917-30.

Contesini FJ, Melo RR, Sato HH. 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 321-334.

Cornish-Bowden A. 2011. *History of Enzyme Chemistry*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd. p1-3.

Daniotti S, Re I. 2021. Marine Biotechnology: Challenges and Development Market Trends for the Enhancement of Biotic Resources in Industrial Pharmaceutical and Food Applications. A Statistical Analysis of Scientific Literature and Business Models. *Marine Drugs*, 19(2): 61.

Di Donato P, Buono A, Poli A, Finore I, Abbamondi G, Nicolaus B, Lama L. 2019. Exploring Marine Environments for the Identification of Extremophiles and Their Enzymes for Sustainable and Green Bioprocesses. *Sustainability*, 11: 149.

Dos Santos Y, De Veras B, De França A. 2018. A New Salt-Tolerant Thermostable Cellulase from a Marine *Bacillus* sp. Strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7): 1078-1085.

Dumorné K., Córdova C, Astorga-Eló M., Renganathan P. 2017. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4): 649-659.

Fang W, Xue S, Deng P. 2019. AmyZ1: a novel α -amylase from marine bacterium *Pontibacillus* sp. ZY with high activity toward raw starches. *Biotechnology Biofuels*, 12: 95.

Faulkner D. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Natural Product Reports*, 17: 1-6.

Ferrer M, Méndez-García C, Bargiela R, Chow J, Alonso S, García-Moyano A, Bjerga G, Steen I, Schwabe T, Blom C. 2018. Decoding the Ocean's Microbiological Secrets for Marine Enzyme Biodiscovery. *FEMS Microbiology Letters*, 366(1): fny285.

Ghosh D, Saha M, Sana, B, Joydeep M. 2005. Marine Enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 96: 189-218.

Global Markets Insights. 2020. Global Enzymes Market Growth 2018-2024 Industry Share Analysis. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/marketresearch/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>. Acesso em 28/04/2020.

Gopinath SC, Anbu P, Arshad MK, Lakshmi Priya T, Voon CH, Hashim U, Chinni SV. 2017. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *Biomed Research International*, 2017: 1272193.

Guisan, MC, Exposito, P. 2020. Food, Agriculture, Production, Population And Poverty In The World, 2000-2017: Priorities For Sustainable Development. *Regional and Sectoral Economic Studies*, 20(1): 137-150.

Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 1-18.

Gurvan M, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, Helbert W. 2006. Bioconversion of red seaweed galactans: A focus on bacterial agarases and carrageenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 23-33.

- Hafizah N, The A, Furusawa G. 2019. Biochemical characterization of thermostable and detergent-tolerant β -agarase, PdAgaC, from *Persicobacter* sp. CCB-QB2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3): 770–781.
- Hamed I, Ozogul F, Regenstein J. 2016. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science and Technology*, 48: 40-50.
- Hamid R, Khan M, Ahmad M, Ahmad M, Abidin M, Musarrat J, Javed S. 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 5, p21–29.
- Han Z, Zhang Y, Yang J. 2019. Biochemical Characterization of a New β -Agarase from *Cellulophaga algicola*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9): 2143.
- Harrison J, Gheeraert N, Tsigelnitskiy D, Cockell C. 2013. The limits for life under multiple extremes. *Trends in Microbiology*, 21(4): 204–212.
- Harshvardhan K, Mishra A, Jha B. 2013. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 93: 51–56.
- Hassan S, Abd El Latif H, Ali S. 2018. Production of Cold-Active Lipase by Free and Immobilized Marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Helmreich S. 2003. Trees and Seas of Information: Alien Kinship and the Biopolitics of Gene Transfer in Marine Biology and Biotechnology. *American Ethnologist*, 30: 340-358.
- Hitch T, Clavel T. 2019. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. *PeerJ Preprints*, 7: e27725v1.
- Imhoff J, Labes A, Wiese J. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances*, 29(5): 468–482.
- Isaksen M, Cowieson A, Kragh K. 2010. Starch- and protein-degrading enzymes: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2: 85-95.
- Jahromi S, Barzkar N. 2018. Future direction in marine bacterial Starch- and protein-degrading enzymes: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use agarases for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16): 6847-6863.
- Javed S, Azeem F, Hussain S. 2018. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132: 23–34.
- Jiang C, Liu Z, Cheng D, Mao X. 2020. Agarose degradation for utilization: Enzymes, pathways, metabolic engineering methods and products. *Biotechnology Advances*, 45: 107641.
- Jung, WJ, Kuk, JH, Kim, KY, Kim, TH, Park, RD. 2005. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(2): 274-280.
- Juturu V, Wu J. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188–203.
- Kandra L. 2003. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666: 487–498.
- Kelly R, Robinson A, Blumentals I, Brown S, Anfinsen C. 1995. Proteolytic enzymes from hyperthermophilic bacteria and processes for their production, US5391489. *Biotechnology Advances*, 13(3): 600-600.
- Le B, Yang S. 2019. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9).
- Lee WK, Lim YY, Leow AT, Namasivayam P, Ong Abdullah J, Ho CL. 2017. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydrates Polymers*, 15: 23-30.
- Leema R., Sachindra N. 2018. Purification and Characterization of Agarase from Marine Bacteria *Acinetobacter* sp. PS12B and Its Use for Preparing Bioactive Hydrolysate from Agarophyte Red Seaweed *Gracilaria verrucosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1): 66-84.
- Li J, Xie M, Gao Y. 2019. Identification and biochemical characterization of a novel exo-type β -agarase Aga3463 from an Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 162–170.
- Li J, Han F, Lu X, Fu X, Ma C, Chu Y, Yu W. 2007. A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with β -agarase. *Carbohydrate Research*, 342(8): 1030–1033.
- Li S, Yang X, Yang S. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2: 1–11.
- Liu K, Ding H, Yu Y, Chen B. 2019. A Cold-Adapted Chitinase-Producing Bacterium from Antarctica and Its Potential in Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. *Marine Drugs*, 17(12): 695.
- Lopes D, Fraga L, Fleuri L, Macedo G. 2011. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3): 603–613.
- Lu M, Wang S, Fang Y, Li H, Liu S, Liu H. 2010. Cloning, expression, purification, and characterization of cold-adapted α -amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230. *The protein journal*, 29(8): 591-597.
- McDonald A, Boyce S, Tipton K. 2009. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Research*, 37: D593-D597.
- Mehta D, Satyanarayana T. 2016. Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 28(7): 1129.

- Muzzarelli R. 2013. Deacetylation of chitin. In: Chitin. Elsevier. p96.
- Navvabi A, Razzaghi M, Fernandes P, Karami L, Homaei A. 2018. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*, 70: 61–70.
- Panda T e Gowrishankar B. 2005. Production and applications of esterases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 67(2): 160-169.
- Nigam PS. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3): 597-611.
- Parages M, Gutiérrez-Barranquero J, Reen F, Dobson A, O’Gara F. 2016. Integrated (Meta) Genomic and Synthetic Biology Approaches to Develop New Biocatalysts. *Marine Drugs*, 14(3): 62.
- Park S, Lee, C, Hong S. 2020. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7): 2815-2832.
- Patentes de hidrolases 2019-2020. Espacenet Patent search, 2020. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/>. Acesso em: 28/06/2023.
- Poli A, Finore I, Romano I, Gioiello A, Lama L, Nicolaus B. 2017. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms*, 16(2): 25.
- Rahman M, Culsum U, Tang W, Zhang W, Wu G, Liu Z. 2016. Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda*. *Enzyme and Microbial Technology*, 85: 1–11.
- Ramesh H, Tharanathan R. 2003. Carbohydrates - the renewable raw materials of high biotechnological value. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23: 149e173.
- Rawlings N, Barrett A, Thomas P, Huang X., Bateman A, Finn R. 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46: D624-D632.
- Robic A, Ullmann C, Auffray P, Persillon C, Martin J. 2017. Enzymes for industrial applications. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 24(4): D404
- Robinson P. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59: 1–41.
- Sahai A, Manocha M. 1993. Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology*, 11: 317-38.
- Sakamoto Y, Suzuki Y, Iizuka I. 2014. S46 Peptidases are the First Exopeptidases to be Members of Clan PA. *Scientific Reports*, 4: 4977.
- Sana, B. 2013. Marine Microbial Enzymes: Biotechnological and Biomedical Aspects. *Marine Microbiology*, 491–508.
- Sanchez S e Demain A. 2017. Useful Microbial Enzymes - An Introduction. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 1–11.
- Saranraj P, Naidu, MA. 2014. Microbial Pectinases: A Review. *Global Journal of Traditional Medicinal Systems*, 3(1): 1-9.
- Sarkar S, Pramanik A, Mitra A, Mukherjee J. 2010. Bioprocessing data for the production of marine enzymes. *Marine Drugs*, 8: 1323–1372.
- Sarmiento F, Peralta R, Blamey J. 2015. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3.
- Sathishkumar R, Ananthan G, Iyappan K, Stalin C. 2015. A statistical approach for optimization of alkaline lipase production by ascidian associated - *Halobacillus trueperi* RSK CAS9. *Biotechnology Reports*, 8: 64–71.
- Sayali P, Satpute S. 2013. Microbial Esterases: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2: 135-146.
- Schafer T, Borchert T, Nielsen V. 2007. Industrial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105: 59-131.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2): 174.
- Singh RS, Singh T, Pandey A. 2019. Microbial Enzymes - An Overview. *Advanced Enzyme Technologies*, 1–40.
- Smithersgroup. 2015. The Future of Marine Biotechnology for Industrial Applications to 2025; SmithersGroup: Akron, OH, USA.
- Song Q, Wang Y, Yin C, Zhang X. 2016. Laa A, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031T. *Enzyme and Microbial Technology*, 90: 83–92.
- Souza P e Magalhães P. 2010. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4): 850–861.
- Sundarram A, Murthy T. 2014. α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2: 166-175.
- Suriya J, Bharathiraja S, Krishnan M, Manivasagan P, Kim S. 2016. Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79: 161-177.
- The Novozymes Report. 2018. Disponível em: https://report2018.novozymes.com/-/media/Report-site-2018/PDF/The_Novozymes_Report_2018.pdf. Acesso em: 20/07/2020.
- Thapa S, Li H, OHair J, Bhatti S, Chen FC, Nasr KA, Johnson T, Zhou S. 2019. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61(8): 579-601.

- Tipton K. 2019. Translocases (EC 7): A new EC Class. ExplorEnz - The Enzyme Database. Disponível em: <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>. Acesso em: 08/09/2020.
- Tiwari R, Pranaw K, Singh S, Nain P, Shukla P, Nain L. 2016. Two-step statistical optimization for cold active β -glucosidase production from *Pseudomonas lutea* BG8 and its application for improving saccharification of paddy straw. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63: 659-668.
- Treichel H, Oliveira D, Mazutti M, Luccio M, Oliveira J. 2009. A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3: 182-196.
- Trincone A. 2010. Potential biocatalysts originating from sea environments. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66: 241-256.
- Trincone A. 2011. Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. *Marine Drugs*, 9(4): 478-499.
- Trincone A. 2012. Some enzymes in marine environment: prospective applications found in patent literature. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(2): 134-148.
- Trincone A. 2013. Marine Enzymes for Biocatalysis, Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes, 1st Edition. Londres: Woodhead Publishing, 576 pp.
- Trincone A. 2018. Update on Marine Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes: Biotechnological Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4): 901.
- Trivedi N, Reddy C, Lali A. 2016. Marine Microbes as a Potential Source of Cellulolytic Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79: 27-41.
- Usov AI. 2011. Polysaccharides of the red algae. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 65: 115-217.
- Verma P, Chatterjee S, Keziah M, Devi S. 2018. Fibrinolytic Protease from Marine *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 16(1): 44-55.
- Wang J, Jiang X, Mou H, Guan H. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *Journal of Applied Phycology*, 16: 333-340.
- Wang Y, Zhang Y, Sun A, Hu Y. 2016. Characterization of a novel marine microbial esterase and its use to make D-methyl lactate. *Chinese Journal of Catalysis*, 37(8): 1396-1402.
- Watanabe S, Yamaoka N, Fukunaga N. 2002. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and expression analysis of the cold-inducible isocitrate lyase gene from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea*. *Extremophiles*, 6: 397-405.
- Wood T, Garcia-Campayo V. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, 1: 147-161.
- Wu G, Zhang X, Wei L, Wu G, Kumar A, Mao T, Liu Z. 2015a. A cold-adapted, solvent and salt tolerant esterase from marine bacterium *Psychrobacter pacificensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 180-187.
- Wu S, Liu G, Zhang D, Li C, Sun C. 2015b. Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1. *Journal of Basic Microbiology*, 55(12): 1427-1434.
- Wu S, Lu M, Chen J, Fang Y, Wu L, Xu Y, Wang S. 2016. Production of pullulan from raw potato starch hydrolysates by a new strain of *Auerobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 740-743.
- Wu Y, Mao A, Sun C. 2017. Catalytic hydrolysis of starch for biohydrogen production by using a newly identified amylase from a marine bacterium *Catenovulum* sp. X3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A): 716-723.
- Yan Q, Fong SS. 2015. Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(31): 1-9.
- Yang S, El-Enshasy H, Thongchul N. 2013. Cellulases: characteristics, sources, production and applications. In: Yang ST, El-Enshasy HA, Thongchul, N. (Eds.), *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. John Wiley e Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Yun E, Yu S, Kim K. 2017. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars. *Applied Microbiology Biotechnology*, 101(14): 5581-5589.
- Zehr JP, Weitz JS, Joint I. 2017. How microbes survive in the open ocean. *Science*, 357(6352): 646-647.
- Zhang C, Sun M, Li T. 2011. Structure Analysis of a New Psychrophilic Marine Protease. *PLoS ONE*, 6(11): e26939.
- Zhao X. 2011. Genome-Based Studies of Marine Microorganisms to Maximize the Diversity of Natural Products Discovery for Medical Treatments. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 1-11.