

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO
DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE
DIFERENTES FONTES**

ANA PAULA FERNANDES

2009

ANA PAULA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES FONTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso
de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para
obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Dra. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Fernandes, Ana Paula.

Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos
isolados de diferentes fontes / Ana Paula Fernandes. – Lavras:
UFLA, 2009.

58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Microrganismos. 2. Aplicações biotecnológicas. 3. Enzimas. 4.
Amilases. 5. Celulares. 6. Lipases. 7. Proteases. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.225

ANA PAULA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES FONTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de junho de 2009.

Prof. Luís Roberto Batista - DCA/UFLA

Prof. Carlos José Pimenta - DCA/UFLA

Prof^ª. Cristina Ferreira Silva e Batista - DBI/UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun
DCA/UFLA/EPAMIG
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Todo sonho só se torna real quando você reúne forças para concretizá-lo.

DEDICO

A DEUS,

POR ME GUIAR NA ESCOLHA DOS CAMINHOS CERTOS A

SEGUIR,

AOS MEUS PAIS

QUE SEMPRE ME APOIARAM.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, por ter me dado saúde, coragem, sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade da realização do curso.

À Capes pelo auxílio financeiro.

À Pesquisadora Sara Maria Chalfoun, pela confiança, paciência e orientação nos momentos em que eu estava perdida e também pelo carinho e amizade.

Ao Professor Luís Roberto Batista, pelos ensinamentos na identificação dos fungos, amizade e paciência.

A minha família em especial ao meu pai Antônio Fernandes Filho e a minha mãe Maria Aparecida Alves, meus irmãos Lucas Fernandes e Ana Flávia Fernandes. E ao Márcio Fernandes por estar do meu lado.

À Dra. Deila Magna dos Santos Botelho amiga, que me ajudou muito na análise estatística.

Ao Dr. Marcelo Cláudio Pereira na aquisição dos materiais.

Ao estagiário e futuro engenheiro agrônomo Carlos Eduardo Rouco.

À Ms. Virgínia Guerra Elizei pela amizade sincera.

Às laboratoristas Tina, Cleusa e Vicentina.

Ao pessoal do Laboratório da EPAMIG: Marcinho, Daniel, Pedro Paulo, Carol, Sabrina, Luciana, Lívia, Claudinha e D. Maritiz.

Às colegas de república Tauana, Maísa, Andressa e Gleice que fizeram silêncio quando precisei estudar.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Luís Roberto Batista, Prof. Dr. Carlos José Pimenta e Prof^a. Cristina Ferreira Silva e Batista pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ludwing, Edinho e Juliano do Departamento de Fitopatologia.

Enfim, todos aqueles que contribuíram de maneira direta ou indiretamente para realização deste trabalho, o meu muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | i |
| LISTA DE FIGURAS..... | ii |
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Enzimas..... | 3 |
| 2.2 Enzimas de origem vegetal e animal..... | 5 |
| 2.3 Enzimas microbianas..... | 6 |
| 2.4 Fungos..... | 8 |
| 2.5 Importância biotecnológica das enzimas..... | 11 |
| 2.6 Importância da manipulação genética em microrganismos..... | 12 |
| 2.7 Principais enzimas utilizadas nas indústrias..... | 12 |
| 2.7.1 Amilases..... | 12 |
| 2.7.1.1 Aplicações biotecnológicas das amilases..... | 14 |
| 2.7.2 Celulases..... | 14 |
| 2.7.2.1 Aplicações biotecnológicas das celulases..... | 15 |
| 2.7.3 Lipases..... | 16 |
| 2.7.3.1 Aplicações biotecnológicas das lipases..... | 17 |
| 2.7.4 Proteases..... | 18 |
| 2.7.4.1 Aplicação biotecnológica das proteases..... | 19 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Local de realização do trabalho..... | 20 |
| 3.2 Microrganismos..... | 20 |
| 3.3 Isolamento dos fungos de alimentos..... | 20 |
| 3.4 Identificação dos fungos..... | 21 |
| 3.5 Determinação do potencial de produção..... | 22 |
| 3.5.1 Teste enzimático para amilase..... | 22 |
| 3.5.2 Teste enzimático para celulase..... | 23 |
| 3.5.3 Teste enzimático para lipase..... | 23 |
| 3.5.4 Teste enzimático para protease..... | 24 |
| 3.6 Determinação enzimática..... | 25 |
| 3.7 Delineamento experimental e análise estatística..... | 26 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 46 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |
| ANEXO..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Classificação Internacional das enzimas | 5 |
| TABELA 2 | Produção de amilases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático | 28 |
| TABELA 3 | Produção de celulases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático | 30 |
| TABELA 4 | Produção de lipases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático | 34 |
| TABELA 5 | Produção de proteases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático | 39 |
| TABELA 6 | Isolados fúngicos que apresentaram índice enzimático $\geq 2,00$ | 44 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Teste semiquantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de Iodo 0,1% pelos microrganismos: *Curvularia* sp. (A) e *Penicillium aurantiogriseum* (B).....28
- FIGURA 2 Teste semiquantitativo de produção da enzima celulase após revelação com solução de vermelho congo 0,1% pelos microrganismos: *P. solitum* (A), *Aspergillus niger* (B), *A. foetidus* (C) e *A. niger* Agregados.....31
- FIGURA 3 Teste semiquantitativo de produção da enzima lipase pelos microrganismos: *Cladosporium cladosporioides* (A), *C. cladosporioides* (B), *A. niger* (C) e *P. solitum* (D).....36
- FIGURA 4 Teste semiquantitativo de produção da enzima protease pelos microrganismos: *P. variabile* (A), *P. roqueforti* (B), *P. brevicompactum* (C) e *P. aurantiogriseum* (D).....41

RESUMO

FERNANDES, Ana Paula. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

As enzimas são macromoléculas protéicas responsáveis pela aceleração das reações químicas que mantêm e regulam os organismos vivos. Ocorrem na natureza e podem ser de fontes vegetais, animais e microbianas. Em razão da grande demanda das indústrias as fontes microbianas são mais usadas. Os fungos filamentosos compõem o grupo de microrganismos com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade e o potencial dos fungos quanto à produção de enzimas extracelulares como amilases, celulases, proteases e lipases. Foram testados fungos isolados de diversas fontes. Os testes foram realizados em meio de cultura sólido específico para cada grupo de enzima. A atividade enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, após cinco dias de incubação em BOD a 25°C. A partir da metodologia executada neste trabalho, conclui-se que dos microrganismos testados quanto ao potencial para a produção das enzimas amilases, celulases, lipases e proteases 16,1%, 25,0%, 22,9% e 7,0% respectivamente apresentaram potencial enzimático ($IE \geq 2,00$). Os fungos *Penicillium roqueforti* (0060M), *Cladosporium cladosporioides* (0032M), *Cladosporium cladosporioides* (0035A), *Cladosporium cladosporioides* (0034A), *Cladosporium cladosporioides* (0033A) e *Aspergillus versicolor* (0031M) apresentaram potencial enzimático positivo para a produção de mais de uma enzima. Os microrganismos testados diferiram quanto ao potencial enzimático mesmo pertencente à mesma espécie. Dentre os isolados testados as espécies que apresentaram os maiores índices enzimáticos foram *Penicillium verrucosum* para atividade amilolítica, *Penicillium crustosum* para atividade celulolítica, *Cladosporium cladosporioides* (0034A) para a atividade lipolítica e proteolítica. Alguns isolados apresentaram potencial enzimático relacionado com as fontes de isolamento dos fungos e outros apresentaram diversidade quanto ao potencial enzimático, independente da fonte de isolamento.

Orientadora: Dra. Sara Maria Chalfoun - DCA/UFLA/EPAMIG.

ABSTRACT

FERNANDES, Ana Paula. **Evaluation of enzymatic potential of filamentous fungi isolated from different sources.** 2009. 58p. Dissertation (Master's in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Enzymes are protein macromolecules responsible for the acceleration of the chemical reactions that maintain and regulate living organisms. They occur in nature and can be from vegetable, animal and microbial sources. Due to high industrial demand the microbial sources are the most used. The filamentous fungi compose the group of microorganisms with highest number of species and present immense variety as to morphology and physiological and biochemical attributes. This study was conducted with the objective of evaluating the capacity and the potential of the fungi as to the production of extracellular enzymes such as amylase, cellulase, protease and lipase. Isolated fungi from several sources were tested. The tests were carried out in solid culture medium specific for each enzyme group. The enzymatic activity was expressed as enzymatic index (EI), by the relationship of the average diameter of the degradation halo and the average diameter of the colony, after five days of incubation in BOD at 25°C. Based on the methodology executed in this work it is concluded that of the microorganisms tested as to the potential for the production of the enzymes amylase, cellulase, lipase and protease 16.1%, 25.0%, 22.9% and 7.0% respectively, present enzymatic potential ($EI \geq 2.00$). *Penicillium roqueforti* (0060M), *Cladosporium cladosporioides* (0032M), *Cladosporium cladosporioides* (0035A), *Cladosporium cladosporioides* (0034A), *Cladosporium cladosporioides* (0033A) and *Aspergillus versicolor* (0031M) presented positive enzymatic potential for the production of more than one enzyme. The tested microorganisms differed as to the enzymatic potential, even those belonging to the same species. Among the isolates tested, the species that presented the highest enzymatic indexes were *Penicillium verrucosum* for amylolytic activity, *Penicillium crustosum* for cellulolytic activity, *Cladosporium cladosporioides* (0034A) for lipolytic and proteolytic activity. Some isolates presented enzymatic potential related to the fungi isolation sources and others presented a diversity as to the enzymatic potential, independent of the isolation source.

Adviser: Dra. Sara Maria Chalfoun – DCA/UFLA/EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas protéicas responsáveis pela aceleração das reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. Elas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana. Estas últimas sendo as mais aplicadas nos processos biotecnológicos industriais, em razão dos vários fatores como: produção em larga escala, grande variedade da atividade catalítica, fácil manipulação genética e ambiental.

Atualmente, as enzimas de origem microbiana são utilizadas no processamento de alimentos, nas indústrias de detergentes, têxtil, rações, produção de fármacos e na biologia molecular.

O mercado global da comercialização de enzimas foi estimado em US\$ 2 bilhões em 2004 e para 2009 é esperado o alcance de quase US\$ 2,4 bilhões. Atualmente, grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras é importada. Isso poderia ser mudado, pois o Brasil possui uma grande biodiversidade de microrganismos que poderiam ser utilizados. As pesquisas que envolvem o estudo e a produção de enzimas com potencial industrial, são importantes visto a constante busca por novos produtos e facilmente acessíveis para um mercado exigente.

A seleção de microrganismos com potencial para a produção de enzimas pode ser feita com o uso de meios de cultura sólidos ou líquidos. Os microrganismos devem apresentar bom rendimento na produção da enzima, ser de fácil cultivo, fácil manipulação e, principalmente, serem considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe – Geralmente Reconhecidos Como Seguros).

Os fungos filamentosos compõem o grupo de microrganismos com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e atributos fisiológicos e bioquímicos (Purvis & Hector, 2000).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade e o potencial dos fungos isolados quanto à produção de enzimas extracelulares como amilases, celulasas, lipases e proteases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. A função de um catalisador é aumentar a velocidade de uma reação, tendo um alto grau de especificidade por seus substratos e a velocidade das reações enzimáticas varia de acordo com diversos fatores como concentração de enzima ou substrato, temperatura e pH (Lehninger, 2006).

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos utilizam as enzimas em várias de suas etapas (Pandey et al., 1999).

O uso prático das enzimas tem sido explorado pelo ser humano há milhares de anos (Sharma et al., 2001). De forma direta, via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal; ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. Por outro lado, a produção e uso de enzimas microbianas, sob uma forma controlada, constituem o maior setor da indústria biotecnológica (Neidleman, 1991).

Preparações de enzimas comerciais podem ser derivadas de fonte vegetal, animal ou microbiana, sendo esta última cada vez mais utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se entre outras, as amiloglucosidases termoestáveis, as proteases, as amilases e as pectinases, muito empregadas em processos industriais, visando o aumento da produção e da qualidade, melhorando a coloração ou reduzindo a viscosidade dos produtos (Souza & Sommer, 2002).

Com o advento da engenharia de proteínas, existem importantes aplicações de enzimas na indústria, tais como as proteases e lipases que são usadas na indústria de detergentes, amilases e glucose-isomerase usadas no processamento do amido (Cheetham, 1995).

O mercado de enzimas em 1997 foi estimado em US\$ 1,45 bilhões, sendo 38% desse mercado dominado pelos detergentes bioativos, com especial destaque para as lipases de origem microbiana, por serem economicamente atrativas, apresentarem baixa toxicidade e serem facilmente biodegradáveis, causando menor impacto ambiental (Souza & Sommer, 2002). O segundo maior mercado de enzimas é a indústria de amido (Ghorai et al., 2009).

Conforme reportagem da Business Communications Company, Inc. o mercado global de enzimas foi estimado em US\$ 2 bilhões em 2004 e para 2009 é esperado o alcance de quase US\$ 2,4 bilhões (Rajan, 2004; Hasan et al., 2006).

A base competitiva para se produzir e vender enzimas está na qualidade do produto desejado a um custo aceitável por unidade de produto final. Portanto, é com essa base que se buscam microrganismos para a produção de novas enzimas industriais, utilizando-se normalmente organismos com classificação GRAS - Generally Recognized As Safe (Souza & Sommer, 2002).

As enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes de bactérias e fungos (filamentosos ou leveduras), sendo na sua maioria extracelulares, da classe das hidrolases (Olson et al., 1994; Jaeger et al., 1994).

As enzimas são classificadas de acordo com sua especificidade. Muitas enzimas foram nomeadas empregando o sufixo “ina”, geralmente em seguida do nome da fonte de tal enzima (Lehninger, 2006). Muitos desses nomes são usados até hoje (bromelina, papaína).

As enzimas são classificadas pelas reações que elas catalisam. Antigamente as enzimas eram nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome do substrato, ou a palavra ou frase que descrevia sua atividade. Algumas vezes, a

mesma enzima tinha dois ou mais nomes, ou duas enzimas diferentes tinham o mesmo nome. Em razão de tais ambiguidades e ao número crescente de enzimas recém-descobertas, por acordo internacional, foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas (Lehninger, 2006). Podemos verificar a classificação internacional (segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular - IUBMB) das enzimas observando a tabela abaixo:

TABELA 1 Classificação Internacional das enzimas

| Nº | Classe | Tipo de reação catalizada |
|----|----------------|--|
| 1 | Oxidoredutases | Transferência de elétrons (íon hidreto ou átomo H) |
| 2 | Transferases | Reações de transferência de grupos |
| 3 | Hidrolases | Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água) |
| 4 | Liasas | Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos |
| 5 | Isomerase | Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros |
| 6 | Ligasas | Formação de ligações C-C e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação |

Fonte: Lehninger, (2006).

2.2 Enzimas de origem vegetal e animal

As enzimas de origem vegetal de interesse são, principalmente, as proteases como papaína - extraída do látex do fruto verde do mamão; bromelina - extraída do pedúnculo do abacaxi, ficina - extraída do látex da figueira (Rao et al., 1998) e o malte variedade de enzimas originária da germinação de cereais.

No caso das enzimas vegetais, há a necessidade de grande quantidade de plantas para se obter a quantidade necessária da enzima de interesse. Muitas vezes, isso não é viável como consequência do alto custo da terra e custos operacionais (Colen, 2006).

Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e óleos de sementes, localizadas em diferentes tecidos e, normalmente, ativas durante a germinação (Mukherjee et al., 1994). São obtidas pelo processo de extração e, normalmente, têm sua aplicação na forma bruta (Paques & Macedo, 2006).

Dentre as enzimas de origem animal, tem importância a pancreatina, a tripsina e a quimotripsina, extraídas do pâncreas de suínos; a pepsina extraída da mucosa do estômago de suínos; a renina ou coalho extraída do estômago de bezerros e a catalase extraída do fígado e sangue de animais (Rao et al., 1998).

As enzimas de origem animal são subprodutos das indústrias de carne, cujo suprimento é limitado, principalmente para atendimento a uma demanda súbita, em grande escala (Rao et al., 1998).

2.3 Enzimas microbianas

As enzimas estão entre os mais importantes produtos obtidos para a necessidade humana por meio das fontes microbianas (Pandey, 1999). Os microrganismos são atualmente a primeira fonte na indústria de enzimas: 50% são originárias de fungos e leveduras, 35% de bactérias, enquanto o restante de 15% de plantas ou de animais de acordo com Boopathy (1994) citado por Rolle (1998).

De acordo com Bon et al. (2008), preferencialmente, o microrganismo utilizado em um processo de produção enzimática deve apresentar as seguintes características:

- ser seguro sobre o ponto de vista biológico (status GRAS);
- apresentar alta capacidade de síntese e excreção da enzima;
- suportar condições ambientais adversas, relacionados com a pressão osmótica, a temperatura e a força iônica do meio,

- ser totalmente tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas nos processos de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

As enzimas microbianas são produzidas por várias espécies que têm sido reconhecidas como seguras, incluindo alguns fungos como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* e *Mucor miehei* (Reed, 1993).

As enzimas microbianas são frequentemente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, porque apresentam grande variedade da atividade catalítica, maior rendimento, fácil manipulação genética, produção não dependente de flutuações sazonais, rápido crescimento em meio de cultura. Também são mais estáveis que as enzimas de fontes animais e vegetais; são mais fáceis de serem trabalhadas e seguras (Rao et al.,1998; Hasan et al., 1996, Coelho & Nascimento, 2008).

As transformações químicas em moléculas orgânicas mediadas por microrganismos vivos ou catalisadas por enzimas de origem microbiana são alternativas de grande potencial de aplicação na indústria de alimentos (Gaden Júnior, 1985), como, por exemplo, enzimas extracelulares fúngicas como proteases ácidas lipases, nucleases carbohidrases, sendo poucas as enzimas intracelulares de importância.

As enzimas extracelulares possuem uma serie de vantagens sobre as intracelulares: i) são secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular que são difíceis de aplicação em larga escala; ii) o número de enzimas excretadas é limitado, sendo relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento e, por fim, as enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares (Wiseman, 1985; Gacesa & Hubble, 1990).

Atualmente, a seleção de novos microrganismos produtores enzimáticos é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a

otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos (Carvalho, 2007).

2.4 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, geralmente filamentosos, obtêm seu alimento por absorção, podem ser macro ou microscópicos, propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio como fonte de reserva. São organismos largamente distribuídos na natureza como no ar, na água, no solo e podem crescer nos mais diversos substratos (Pelczar, 1998; Putzke & Putzke, 1998; Taniwaki & Silva, 2001; Guerrero & Silveira, 2003).

Impactos negativos ou positivos podem ser atribuídos aos fungos, sendo que os primeiros residem na atuação como agente causador de doenças em plantas (fitopatogênicos), biodeteriorização (podridão ou mofos) ou podem causar doenças nos homens. Os impactos positivos encontram-se nos fatos de que algumas espécies podem servir de alimentos para o homem, e têm sido aproveitadas pela suas atividades metabólicas na produção de enzimas degradativas ou na síntese útil de seus metabólitos (Bennett, 1998).

A atenção focalizada nos fungos em particular é decorrente da produção de enzimas e metabólitos, incluindo antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentícios (Punt et al., 2002). Têm grande importância na indústria de alimentos na produção de cerveja, vinho, destilados, na panificação; na agricultura como agente de controle biológico de pragas e entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados pelo homem (Melo & Azevedo, 1998).

Os fungos filamentosos secretam eficazes enzimas no meio ambiente (Beneett, 1998), que auxiliam na degradação de produtos como a celulose e o

amido (Pelczar, 1996), porém somente 2% dos microrganismos do mundo tem sido testados como fonte de enzimas (Hasan et al., 2006).

O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: 1 - abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como palha de arroz, bagaço de cana, etc) que constitui um substrato de baixo custo para as fermentações, 2 - e a enorme diversidade biológica (Canto & Menezes, 1995).

O gênero *Aspergillus* é o fungo mais importante para a produção comercial de enzimas e tem sido usado já por muitas décadas, para a produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico, sendo considerado um microrganismo GRAS (Schuster et al., 2002). Algumas espécies desse gênero são fonte rica de enzimas como pectinases, proteases e amiloglicosidase, sendo essas enzimas as primeiras a serem exploradas e originalmente produzidas em superfície de cultura Frost & Moss (1987).

O uso de meio de cultura sólido para a detecção de enzimas produzidas por fungos tem sido utilizado há vários anos. Hankin e Anagnostakis (1974) relataram que as enzimas podem ser facilmente detectadas no meio sólido. Geralmente, as enzimas hidrolíticas como, por exemplo: celulasas, xilanasas, pectinases são produzidas por fungos em meio de cultura uma vez que tais enzimas são usadas na natureza pelos fungos para o seu crescimento (Pandey et al., 1999).

O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. O processo de seleção de microrganismos considerados produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa dos microrganismos (Ceska, 1971; Lin et al., 1991).

Para avaliação do potencial enzimático dos fungos, alguns autores (Lealem & Gashe, 1994; Stamford et al., 1998) recomendam o índice enzimático (IE) $\geq 2,00$. Dessa forma, os isolados que exibiram os maiores IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (Oliveira et al., 2006). Terra (2008) considerou o índice enzimático $\geq 2,00$, denominando os microrganismos como um produtor potencial de enzima em meio sólido.

Vários trabalhos têm sido realizados quanto as seleção de fungos de interesse biotecnológico, como o trabalho realizado por Guimarães et al. (2006). Esses autores avaliaram 40 isolados fúngicos quanto à produção de enzimas microbianas. As enzimas testadas foram: xilanase, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fitase, pectinase, e amilase. Entre os 40 isolados fúngicos vinte três, destes exibiram potencial enzimático. Níveis significativos de amilase foram produzidos pelas espécies de *Paecilomyces* e *Aspergillus phoenicis*.

Bastos (2004) determinou a produção de enzimas em meio sólido e representou os resultados em uma estimativa baseadas na intensidade da cor, ou pela avaliação do diâmetro dos halos formados nos meios de cultura. Oito isolados de *Crinipellis pernicioso* foram testados quanto à produção das seguintes enzimas: amilases, celulasas, lipases, polifenol-oxidases, peroxidases e esterases, observando-se variabilidade nos resultados quanto à produção dessas enzimas.

Sena et al. (2006) detectaram a produção de amilases, proteases, celulasas em 20 isolados provenientes do solo do semiárido baiano e observaram que 3 isolados apresentaram resultado positivo para celulasas, 12 isolados apresentaram resultados positivos para proteases e não foi constatada a produção de amilases por nenhum dos isolados testados.

Luz et al. (2006) avaliou 29 isolados de fungos endofíticos quanto à produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (amilase, celulase, protease e

lipase), desses isolados apenas 8 produziu atividade lipolítica, não sendo constatado resultado positivo para as demais enzimas em estudo. Esses oito isolados pertencem a gênero *Colletotrichum*, *Glomerela*, *Fusarium*.

Lima-Filho et al. (2003) observaram a produção enzimática de amilase, celulase, protease, e lipase por a 5 isolados de *Coletotrichum* spp. isolados de diferentes frutas. Todos os isolados apresentaram resultados positivos para as enzimas testadas.

2.5 Importância biotecnológica das enzimas

A biotecnologia pode ser definida como a aplicação do sistema biológico em técnicas que são utilizadas no processo industrial. O desenvolvimento da biotecnologia é responsável por enzimas, álcoois, ácidos orgânicos produzidos pelos fungos filamentos (Bennett, 1998).

Atualmente, as enzimas de origem microbiana são utilizadas no processamento de alimentos, na manufatura de detergentes, na indústria têxtil e farmacêutica, terapia médica e na biologia molecular (Coelho & Nascimento, 2008).

As enzimas são usadas também na fabricação de suco de frutas. A adição de pectinases, xilanases, e celulases melhoram a liberação da polpa do suco. As pectinases e amilases são usadas para clarificação de sucos (Ghorai et al., 2009). Em algum estágio ou outro há a utilização das enzimas, seja nas áreas industriais como no meio ambiente ou na biotecnologia alimentar (Pandey et al., 1999).

2.6 Importância da manipulação genética em microrganismos

A exploração e a manipulação da natureza e de seus recursos, de início como simples matéria-prima utilizada na construção de uma base material para as sociedades industrializadas, vêm também servindo como fonte para as experimentações da ciência e tecnologia avançadas, dando origem à fabricação de produtos de alta sofisticação e de elevado valor agregado no mercado mundial (Albagli, 1998).

As modificações genéticas têm sido usadas para melhorar a capacidade de produção e secreção de enzimas por microrganismos. Até o momento, somente um número limitado de espécies de fungos foi explorado como células hospedeiras para a produção de enzimas recombinantes. Enzimas naturais ou recombinantes são, principalmente, produzidas por *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* e também outras espécies (Punt et al., 2002).

A manipulação genética pode aumentar a produtividade e minimizar efeitos na produção de subprodutos indesejáveis (Hasan et al., 2006; Meyer, 2008). Os genes podem ser manipulados em vários sentidos na ordem de melhorar as propriedades das enzimas ou para aumentar o rendimento (Bennett, 1998).

2.7 Principais enzimas utilizadas nas indústrias

2.7.1 Amilases

As amilases são enzimas que hidrolisam a molécula de amido, obtendo assim diversos produtos incluindo as dextrinas e, progressivamente, pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (Gupta et al., 2003). O amido está amplamente distribuído na natureza sendo encontrado, principalmente, em sementes de cereais como milho, trigo e arroz, em tubérculos ou raízes como

batata e mandioca. Constitui a mais importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores (Bobbio & Bobbio, 1995; Moraes, 2004).

O amido é um polímero de resíduo de glicose ligados uns aos outros por meio de ligações glicosídicas, sendo estável em pH alcalino e hidrolisado em pH ácido. Dois tipos de polímeros estão presentes na molécula de amido: amilose e amilopectina, que são diferenciadas pelas várias propriedades físicas particularmente com relação à solubilidade em água e tamanho molecular. A amilose é um polímero linear constituído de unidades de D-glicose unidas por ligações α -1,4; a amilopectina é formada por cadeias curtas de amilose ligadas entre si de modo a formar uma estrutura ramificada por ligações α -1,6 (Bobbio & Bobbio, 1992).

As amilases podem ser divididas em duas categorias, as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido. As exoamilases hidrolisam ligações glicosídicas a partir da extremidade não- redutora da molécula (Gupta et al., 2003).

As amilases são as mais antigas na indústria de enzimas e fazem parte da classe das hidrolases. Podem ser derivadas de diversas fontes como animais, plantas e microrganismos. No entanto, as fontes microbianas são as mais utilizadas devido à produção em larga escala (Gupta et al., 2003).

As enzimas amilolíticas mais utilizadas são aquelas produzidas por fungos filamentos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (Pandey et al., 1999).

O uso do amido degradado por enzimas foi à primeira aplicação em larga escala de enzimas microbianas na indústria alimentícia (Bennet, 1998).

2.7.1.1 Aplicações biotecnológicas das amilases

As amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxtil, de papéis, de couro, de detergentes, na indústria de bebidas como cervejas e bebidas destiladas, na indústria alimentícia, pães, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, indústria química e farmacêutica e na produção de ração animal (James & Lee, 1997; Gupta et al., 2003; Pandey et al., 2005).

O fungo do gênero *Aspergillus* possui papel importante na indústria biotecnológica, tendo sua aplicação no processamento do amido para a produção de xarope de glicose. Várias espécies têm sido usadas para a produção de metabólitos secundários e várias enzimas hidrolíticas, sendo a glicoamilase (também chamada de amiloglicosidase) a mais importante. A espécie *Aspergillus niger* tem sido usada principalmente na produção comercial de glucoamilase extracelular, embora *Rhizopus* sp. também tem sido relatado na produção dessa enzima (James & Lee, 1997).

2.7.2 Celulases

A celulose é a mais abundante fonte renovável de energia da Terra. (Bhat & Bhat, 1997). Grande número de fungos e poucas bactérias são capazes de degradar a celulose para seu crescimento e produção completa de celulases (Enari & Markkanen, 1977).

Na natureza, a celulose, polissacarídeo mais abundante, é degradada pela hidrólise enzimática das celulases, um complexo celulolítico composto por endo- β -1,4-glicanases (E.C.3.2.1.4), celobio-hidrolases (E.C.3.2.1.91) e β -glicosidades (E.C.3.2.1.21), que atuam em sinergismo (Bhat, 2000).

Em geral, os fungos são considerados grandes produtores de celulases, sendo utilizados na produção de enzima-padrão, como no caso das celulases de

Thricoderma reesei, produzidas pela SIGMA-ALDRICH. Têm sido investigadas, principalmente, no que diz respeito ao seu potencial como aditivos na indústria de detergentes, na indústria têxtil, e também na bioconversão de biomassa agrícola em produtos com alto valor comercial (Coelho & Nascimento, 2008).

2.7.2.1 Aplicações biotecnológicas das celulases

As celulases apresentam largas aplicações nos setores industriais, como na indústria de alimentos (extração de suco de frutas e óleo de sementes, na clarificação de sucos); rações, como suplemento para ruminantes; na indústria têxtil, de combustíveis e na indústria química (Bhat, 1997; Bhat & Bhat, 2000). São utilizadas também na produção de glicose, de proteínas unicelulares ou na obtenção de produtos químicos como etanol (Wiseman, 1985).

As celulases têm sido usadas para melhorar a palatibilidade de baixa qualidade de vegetais, incremento do flavor de cogumelos, promover a extração de produtos naturais e alterar a textura de alimentos (Bigelis, 1993).

Hoje em dia, uma das principais aplicações das celulases é na indústria têxtil, onde a necessidade de altas temperaturas (50-65°C) e pH requer a utilização de enzimas termofílicas (Bhat, 2000).

Uma aplicação na indústria têxtil é no processamento de têxtil de fibras celulósicas com o objetivo de: (1) eliminar microfibrilas superficiais e criar uma superfície mais lisa, (2) aumentar o brilho; (3) evitar formação de pelotamento; (4) desbotar peças confeccionadas (principalmente por denim); (5) obter um aspecto de tecido usado (Andreaus & Cavaco-Paulo, 2008).

2.7.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilglicéóis para liberar ácidos orgânicos e glicerol (Ionita et al., 1997). A função biológica das lipases é hidrolisar triacilglicéóis para formar ácidos graxos livres, di, mono acilglicéóis e glicerol.

São produzidas por animais, plantas e microrganismos. Comercialmente, as lipases são obtidas de microrganismos que produzem uma grande variedade de lipases extracelulares (Sharma et al., 2001); uma vez que têm alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produtos, grande versatilidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (Illanes, 1994).

As lipases tradicionalmente têm sido obtida de pâncreas de animais. O inicial interesse em enzimas microbianas foi decorrente da escassez de pâncreas e a dificuldade de colecionar material disponível (Hasan et al., 2006).

As enzimas lipolíticas estão atualmente recebendo muita atenção com o rápido desenvolvimento da tecnologia de enzimas. Elas constituem um importante grupo de biocatalizadores para aplicação biotecnológica (Hasan et al., 2006).

Os microrganismos, possuindo as características essenciais para que possam ser usados em processos biotecnológicos, podem ser isolados, purificados e selecionados a partir de fontes naturais que podem ser o solo, a água, plantas e animais. Os fungos produtores de lipases podem ser isolados de resíduos industriais gordurosos, de solos contaminados com óleo, de fábrica de processamento de óleos vegetais e laticínios (Sharma et al., 2001).

Fungos de diversos gêneros têm sido demonstrados como bons produtores de lipases; entre eles podemos citar: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus*

niger, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembetii*, *Penicillium roqueforti* e a levedura *Candida rugosa*, que estão sendo comercializados para o processamento de óleos, gordura e queijos etc (Jaeger et al., 1999).

2.7.3.1 Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases têm sido empregadas nas indústrias de alimentos, de detergentes, oleoquímica, farmacêutica, de química fina, cosméticos, polpa, papel e couro e no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras (Hasan et al., 2006; Carvalho et al., 2005).

Na indústria de alimentos atua na fabricação de pães para melhorar a textura da massa. Na indústria de laticínios as lipases são empregadas na hidrólise de gordura do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijo e no desenvolvimento de sabores e aroma (Freire & Castilho, 2008).

Outras aplicações na indústria de alimentos têm sido também utilizadas no desenvolvimento de flavor de manteiga e leite. Seu emprego também tem sido recomendado para processos de fabricação de queijo e iogurtes (Hofelmann et al., 1985 citado por Colen, 2006).

Na indústria de detergentes, o emprego de lipases como componente funcional da formulação, é responsável pela venda de cerca de 1000 toneladas de lipases por ano ou cerca de 32% das vendas totais de lipases (Sharma et al., 2001).

As lipases microbianas, em sua grande maioria, são produzidas pelas espécies dos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (Miura et al., 1997).

A utilização de lipases tem um futuro promissor, no entanto, a taxa do progresso é lenta. Um dos fatores que limitam é custo relativamente alto das lipases (Sharma et al., 2001).

2.7.4 Proteases

As peptidases, peptídeos-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos de proteínas (Vermelho, 2008). Rao et al. (1998) definem as proteases como enzimas degradativas que catalisam a hidrólise total das proteínas e representam um dos três maiores grupos das indústrias das enzimas.

Muitos microrganismos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para a multiplicação celular (Vermelho, 2008).

Desde que as proteases são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos, elas são ubíquas, sendo encontradas em grande diversidade de fontes tal como plantas, animais e microrganismos. As proteases de origem vegetal são papaína, bromelina, queratinases e ficina, já as de origem animal são representadas por pancreatina, tripsina, quimotripsina, pepsina e renina. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana (Rao et al., 1998).

As proteases são classificadas de acordo com: o tipo de reação que catalisam, a natureza química do sítio catalítico e relações evolutivas estruturais (Rao et al., 1998).

De acordo com o a faixa de pH na qual apresenta maior atividade, as proteases podem ainda ser inicialmente classificadas em proteases ácidas, básicas ou neutras. As ácidas são representadas principalmente pelas

aspárticoproteases e possuem atividade na faixa de pH 2,0-6,0. As proteases neutras possuem atividade em pH neutro na faixa de 6,0-8,0 e incluem, principalmente, as cistínoproteases, metaloproteases e algumas serinoproteases. Já as proteases alcalinas possuem maior atividade na faixa de pH 8,0-13 e são representadas principalmente pelas serinoproteases. Podem ser ainda divididas em dois grupos principais: as exopeptidases e as endopeptidases (Gupta et al., 2003; Rao et al., 1998).

2.7.4.1 Aplicação biotecnológicas das proteases

As proteases possuem grande variedade de aplicações, principalmente na indústria de detergentes e de alimentos, porém pode-se ressaltar outras aplicações no tratamento de couro, processos de biorremediação, na indústria farmacêutica na produção de medicamentos (Rao et al., 1998).

As proteases microbianas são usadas na panificação, para aumentar a hidrólise parcial e a elasticidade do glúten, assim facilitando a expansão da massa (Ward et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do trabalho

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do EcoCentro/EPAMIG, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

3.2 Microrganismos

Os fungos foram obtidos de alimentos (amendoim, embutido de carne, pães), alguns isolados foram cedidos pela Micoteca da EPAMIG, e outros foram isolados de câmara de maturação de queijos e solo.

3.3 Isolamento dos fungos de alimentos

Os fungos utilizados para os testes enzimáticos isolados de alimentos foram obtidos de diversas fontes, como amendoim, frutos de café, embutidos de carne, fungos de ambiente de câmara de maturação de queijos, frutas, vegetais e pães em processo de decomposição.

Para o isolamento de fungos presentes no amendoim, utilizou-se a técnica de plaqueamento direto, de acordo com Samson et al. (2000). As amostras passaram por um processo de desinfestação superficial que consiste na imersão dos grãos em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4% por 2 minutos, enxague das amostras em água destilada estéril, plaqueamento em meio de cultura DRBC (Dicloram Rosa de Bengala Cloranfenicol). Para as amostras de frutos de café utilizou-se o método de *Bloter test*.

Os fungos isolados de ambiente de câmara de maturação de queijos foram obtidos por meio do contato de placas de Petri, contendo o meio de cultura DRBC com o ar, por meio da técnica de sedimentação em placa, de acordo com Samson et al. (2000). As placas de Petri foram colocadas abertas dentro da câmara de maturação de queijos por 15min, em seguida as placas foram fechadas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da EPAMIG.

Os fungos isolados de frutas, vegetais e pães em decomposição o plaqueamento foi direto em meio de cultura MA2% (20 g de Extrato de Malte, 20g de ágar e 1L de água destilada).

Para o isolamento dos fungos de embutidos de carne, utilizou-se o método de diluição seriada e plaqueamento em profundidade. As peças passaram antes pelo processo de desinfestação superficial. As placas de Petri continham meio de cultura (Batata Dextrose - Ágar- BDA, com adição de cloranfenicol) e 100µL do material.

Após o isolamento das amostras de amendoim, frutos de café, embutidos de carne, dos fungos de ambiente de câmara de maturação de queijos, frutas, vegetais e pães, as amostras foram incubadas em BOD 25°C, durante cinco dias. Posteriormente, foi realizada a análise, a seleção, a purificação e a identificação das espécies.

3.4 Identificação das fungos

A identificação dos fungos foi realizada com base em exames micro e macroscópicos das colônias baseados em literaturas específicas.

A identificação das espécies dos gêneros *Aspergillus* foi de acordo com Klich (2002) e Christensen (1982); do gênero *Penicillium* de acordo com Pitt (1988), Pitt e Hocking (1997), e Samson & Frisvad (2004), a identificação do

gênero *Fusarium* foi de acordo com Nelson & Toussoun (1983) e Leslie et al. (2006) e para os demais gêneros e espécies utilizou-se Barnett & Barry (1986).

No total, foram identificados 71 fungos, sendo 10 gêneros e 16 espécies. As espécies identificadas encontram-se em Anexo. As colônias puras e identificadas foram preservadas em tubo de ensaio, contendo o meio de cultura MA2%, com a finalidade de manter a pureza e viabilidade dos fungos para posterior determinação das atividades enzimáticas.

3.5 Determinação do potencial de produção

A determinação da atividade enzimática das enzimas amilases, celulases, proteases seguiu a metodologia descrita por Dingle et al. (1953) com modificações. Para a determinação da atividade enzimática de lipases utilizou-se a metodologia descrita por Sierra (1957).

As colônias puras dos fungos foram cultivadas em placas de Petri, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura MEA (20 g de extrato de malte, 1 g de peptona bacteriológica, 20 g de glicose, 20 g de ágar e 1L de água destilada), durante cinco dias em BOD 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

Após este período, as colônias foram repicadas para o centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada enzima. Cada ensaio constituiu de 3 repetições. As placas de Petri contendo as colônias foram incubadas em BOD 25°C durante 5 - 7 dias.

3.5.1 Teste enzimático para amilase

O meio de cultura para a determinar a atividade de amilase foi o Ágar Amido composto por:

Ágar1,8%

Amido1%
Tampão citrato fosfato 0.1 M pH 5.0.....500 mL

O amido e o ágar foram dissolvidos em 500 mL de tampão citrato fosfato, homogeneizados. Após esse processamento, o meio de cultura foi acondicionado em recipiente de vidro e esterilizado a 120°C durante 15 minutos.

Utilizou-se solução reveladora de iodo 0,1N. Os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia.

3.5.2 Teste enzimático para celulase

O meio de cultura utilizado para determinar a atividade de celulase foi o Ágar Carboximetilcelulose preparado com:

Ágar.....1,8%
Carboximetilcelulose.....1,0
Tampão Acetato de Na⁺ 0.1M pH 5.0.....500 mL

A carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de Na⁺ 0.1M pH 5.0 em agitador magnético. Após a dissolução de CMC, foi adicionado o restante do tampão (300 mL) e em seguida o ágar. O meio de cultura foi homogeneizado e esterilizado a 120°C durante 15 minutos.

Para verificar a atividade celulolítica, utilizou-se como solução reveladora vermelho congo 0,1%. Os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo amarelo claro em contraste com o meio de cultura vermelho após a adição da solução reveladora.

3.5.3 Teste enzimático para Lipase

O substrato é o Tween 20 e o meio contém por litro:

| | |
|------------------------|------|
| Peptona | 10g |
| Cloreto de sódio..... | 5g |
| Cloreto de cálcio..... | 0,1g |
| Ágar | 20g |
| pH 6,0 | |

O Tween 20 é esterelizado separadamente por 15 minutos a 15 libras de pressão e 1 mL adicionado a 100 mL de meio esterilizado e resfriado.

A reação enzimática positiva para lipase foi à formação de cristais de sal de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima ou a formação de zonas claras em volta da colônia em razão da completa degradação do sal do ácido gorduroso Hankin & Anagnostakis (1975), não sendo necessária à adição de solução reveladora.

3.5.4 Teste enzimático para protease

O meio consiste em:

| | |
|--|--------|
| Ágar | 1,8% |
| Gelatina..... | 1,0% |
| Leite desnatado | 1,0% |
| Tampão citrato-fosfato 0.1 M pH 5.0..... | 400 mL |

O preparo do meio foi feito com as seguintes etapas:

O ágar foi adicionado em 400 mL de tampão citrato-fosfato 0.1 M, pH 5,0, homogeneizado com bastão de vidro e esterilizado a 120°C, durante 15 minutos.

A solução de gelatina a 10%: foram adicionados 5 gramas de gelatina em 50 mL de solução tampão citrato-fosfato e deixado em repouso durante 3 minutos e em seguida homogeneizada. A solução foi aquecida em banho-maria

para a dissolução completa da gelatina e, posteriormente, esterilizada a 120°C, durante 15 minutos.

À solução de leite desnatado a 10%: foram dissolvidas 5 gramas de leite desnatado em 50 mL de água destilada. A solução foi esterelizada sob vapor fluente (autoclave com válvulas abertas), durante 30 minutos, por dois dias consecutivos.

Para a obtenção do Ágar-Gelatina-Leite as soluções esterilizadas de ágar, gelatina e leite foram misturadas com cuidados assépticos. Obtendo-se volume final de 500 mL de Ágar Gelatina- Leite.

A reação enzimática de protease foi detectada pela modificação química no meio de cultura sólido. A reação positiva foi visualizada como um halo translúcido, não sendo necessária a adição de solução reveladora na superfície do ágar.

3.6 Determinação enzimática

A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (Hankin e Anagnostakis, 1975); segundo a fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Dessa forma, os isolados que exibirem os maiores IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (Oliveira et al., 2006).

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para o teste de amilases, utilizaram-se 31 tratamentos, para o teste de celulasas utilizaram 24 tratamentos, para o teste de lipases 70 tratamentos e para o teste de proteases 48 tratamentos. Todos os testes foram realizados com três repetições, de acordo com o número de tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação do potencial de produção de amilases foram testados 31 isolados de fungos, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Produção de amilases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático (IE)

| Código | Origem | Espécies | IE |
|---------|--------------------|--|----------------|
| (0067M) | Micoteca - café | <i>Penicillium verrucosum</i> | 4,25 a* |
| (0060M) | Micoteca - café | <i>P. roqueforti</i> | 2,83 b |
| (0032M) | Micoteca – café | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 2,78 b |
| (0047M) | Micoteca – café | <i>P. brevicompactum</i> | 2,33 b |
| (0035A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 2,11 b |
| (0066A) | Solo | <i>Penicillium sp.</i> | 1,63 c |
| (0036A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 1,50 c |
| (0033A) | Ambiente*** | <i>C. cladosporioides</i> | 1,44 c |
| (0046M) | Micoteca - café | <i>P. aurantiogriseum</i> | 1,39 c |
| (0061A) | Amendoim | <i>P. solitum</i> | 1,29 c |
| (0005M) | Micoteca - café | <i>Aspergillus clavatus Strict sensu</i> | 1,20 c |
| (0020A) | Embutido de carne | <i>A. ochraceus</i> | 1,09 c |
| (0063M) | Micoteca – café | <i>P. solitum</i> | 1,08 c |
| (0027A) | Café | <i>A. tamarii</i> | 1,08 c |
| (0056A) | Pão | <i>P. crustosum</i> | 1,08 c |
| (0052M) | Micoteca - café | <i>P. commune</i> | 1,08 c |
| (0064A) | Ambiente | <i>Penicillium sp.</i> | 1,07 c |
| (0058A) | Ambiente | <i>P. glandicola</i> | 1,07 c |
| (0012M) | Micoteca - café | <i>A. lanosus</i> | 1,07 c |
| (0001A) | Café | <i>A. auricomus</i> | 1,06 c |
| (0057M) | Micoteca - café | <i>P. expansum</i> | 1,06 c |
| (0053A) | Coco | <i>P. commune</i> | 1,06 c |
| (0022A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,05 c |
| (0049M) | Micoteca – laranja | <i>P. citrinum</i> | 1,05 c |
| (0023A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,05 c |
| (0002M) | Micoteca – café | <i>A. auricomus</i> | 1,05 c |
| (0051M) | Micoteca - café | <i>P. citrinum</i> | 1,05 c |
| (0028M) | Micoteca - café | <i>A. tamarii</i> | 1,04 c |
| (0013M) | Micoteca - café | <i>A. melleus</i> | 1,04 c |
| (0008A) | Amendoim | <i>A. flavus</i> | 1,03 c |

... (Cont.)...

TABELA 2,Cont.

| | | | |
|---------|----------|-----------------------|--------|
| (0037A) | Amendoim | <i>Curvularia sp.</i> | 1,03 c |
|---------|----------|-----------------------|--------|

**CV(%)= 28,90

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

*** Ambiente de câmara de maturação de queijos.

Na figura abaixo, encontram-se ilustrados os resultados dos testes positivos para amilases, referente a dois dos isolados estudados.

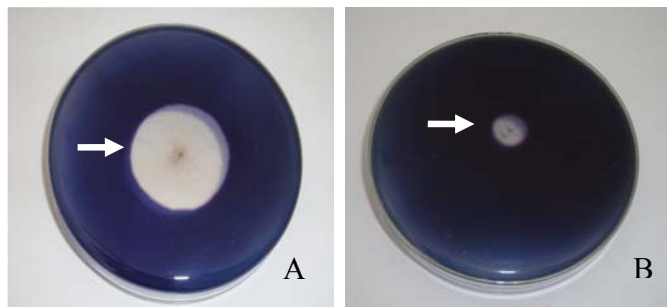


FIGURA 1 Teste semiquantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de iodo 0,1% pelos microrganismos: *Curvularia sp.* (A) e *Penicillium aurantiogriseum* (B).

Conforme resultados da Tabela 2, pode-se observar que os fungos testados apresentaram uma variação quanto ao potencial de produção da enzima, sendo que, destacaram-se os fungos *Penicillium verrucosum* (0067M) IE = 4,25; *P. roqueforti* (0060M) IE = 2,83; *Cladosporium cladosporioides* (0032M) IE = 2,78; *P. brevicopactum* (0047M) IE = 2,33 e *C. cladosporioides* (0035A) IE =

2,11; sendo que estes fungos apresentaram os melhores potenciais produtores de amilases, pois apresentaram índices enzimáticos (IE) $\geq 2,00$. Estes fungos pertencentes a Micoteca da EPAMIG foram isolados de frutos do café (4 isolados) e 1 isolado do solo.

Verificou-se ainda que os fungos *Penicillium* sp. (0066A), e *C. cladosporioides* (0036A), apresentaram um potencial intermediário, não conseguindo atingir o IE $\geq 2,00$, mas ficaram muito próximos a esse valor, enquanto que os demais isolados se agruparam em uma produção enzimática inferior.

A espécie de *P. verrucosum* (0067M) obtida de frutos de café, se destacou como um fungo produtor da enzima amilase, apresentando um índice enzimático de 4,25. No entanto, como ele tem sido relatado como produtor de Ocratoxina A (Pitt, 1988), deixa de ser um microrganismo seguro para a produção de enzima.

Terra (2008) isolou fungos de cavernas e relatou que os fungos considerados como potencialmente produtores de enzimas amilolíticas corresponderam a 12,87% dos isolados fúngicos testados. O isolado *A. terreus*, apresentou o maior valor de índice enzimático (3,57), sendo que as espécies consideradas como potencialmente produtoras pertencem aos gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses resultados são semelhantes aos constatados no presente trabalho, onde, as espécies com potencial de produção enzimática pertencem ao gênero *Penicillium*. Os fungos considerados como potencialmente produtores de enzimas amilolíticas corresponderam a 16,1% dos isolados testados, sendo este resultado superior ao encontrado por Terra (2008).

Os fungos do gênero *Cladosporium* apesar de serem de mesma espécie, mas isolados de fontes diferentes, também diferiram quanto ao potencial enzimático, sugerindo a uma variabilidade genética entre os isolados. Os resultados obtidos permitiram destacar as espécies *Cladosporium*

cladosporioides isolados 0032M e 0035A como promissores produtores de amilases, uma vez que os dois isolados apresentaram valores de IE ≥ 2 .

Para a avaliação do potencial de produção de celulases, foram testados 24 isolados de fungos, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Produção de celulases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático (IE)

| Código | Origem | Gêneros | IE |
|---------------|-----------------|---------------------------------|----------------|
| (0056A) | Pão | <i>Penicillium crustosum</i> | 5,83 a* |
| (0057M) | Micoteca-café | <i>P. expansum</i> | 3,67 b |
| (0061A) | Amendoim | <i>P. solitum</i> | 2,67 c |
| (0060M) | Micoteca-café | <i>P. roqueforti</i> | 2,41 c |
| (0005M) | Micoteca - café | <i>A. clavatus Strict sensu</i> | 2,19 d |
| (0052M) | Micoteca -café | <i>P. commune</i> | 2,13 d |
| (0062A) | Ambiente*** | <i>P. solitum</i> | 1,93 e |
| (0064A) | Ambiente | <i>Penicillium sp.</i> | 1,82 e |
| (0063M) | Micoteca -café | <i>P. solitum</i> | 1,64 f |
| (0050M) | Micoteca -café | <i>P. citrinum</i> | 1,56 f |
| (0003M) | Micoteca -café | <i>Aspergillus carbonarius</i> | 1,40 f |
| (0016A) | Café | <i>A. niger</i> | 1,27 g |
| (0017A) | Amendoim | <i>A. niger</i> | 1,27 g |
| (0009M) | Micoteca -café | <i>A. foetidus</i> | 1,16 g |
| (0010A) | Amendoim | <i>A. foetidus</i> | 1,16 g |
| (0004M) | Micoteca -café | <i>A. carbonarius</i> | 1,14 g |
| (0011A) | Café | <i>A. foetidus</i> | 1,13 g |
| (0018A) | Amendoim | <i>A. niger Agregados</i> | 1,11 g |
| 0015M) | Micoteca -café | <i>A. niger</i> | 1,10 g |
| (0008A) | Amendoim | <i>A. flavus</i> | 0,00 h |
| (0058A) | Ambiente | <i>P. glandicola</i> | 0,00 h |
| (0067M) | Micoteca -café | <i>P. verrucosum</i> | 0,00 h |
| (0027A) | Café | <i>A. tamaritii</i> | 0,00 h |
| (0028M) | Micoteca -café | <i>A. tamaritii</i> | 0,00 h |

**CV (%)= 9,26

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

*** Ambiente de câmara de maturação de queijos.

Na figura abaixo encontram se ilustrados os resultados dos testes para celulasas.

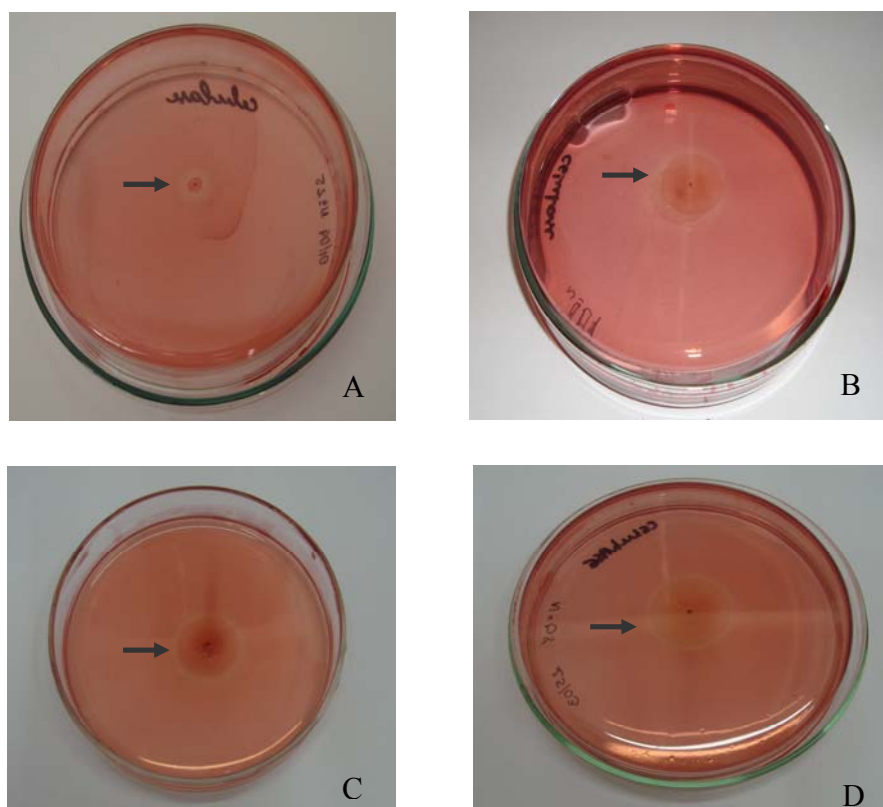


FIGURA 2 Teste semiquantitativo de produção da enzima celulase pelos microrganismos após revelação com solução de vermelho congo 0,1% pelos microrganismos: *P. solitum* (A), *A. niger* (B), *A. foetidus* (C) e *A. niger* Agregados (D).

Conforme resultados da Tabela 3, pode-se observar que os fungos testados apresentaram uma variação quanto ao potencial de produção da enzima, sendo que, destacaram-se os fungos *P. crustosum* (0056A) IE = 5,83; *P. expansum* (0057M) IE = 3,67; *P. solitum* (0061M) IE = 2,67; *P. roqueforti* (0060M) IE = 2,41; *A. clavatus Strictu sensu* (0005M) IE = 2,19 e *P. commune* (0052M) IE = 2,13. Estas espécies se diferenciaram quanto à fonte de onde foram isolados.

Os fungos *P. solitum* (0062A), *Penicillium* sp. (0064A), e *P. solitum* (0063M), apresentaram um potencial enzimático intermediário correspondendo a 1,93, 1,82 e 1,64 respectivamente, não atingiram o índice enzimático para serem considerados como um produtor potencial de enzima, porém apresentaram níveis muito próximos a 2,00 e os demais se agruparam em uma produção enzimática inferior.

Já os fungos *A. flavus* (0008A), *P. glandicola* (0058A), *P. verrucosum* (0067M), *A. tamarii* (0027A) e *A. tamarii* (0028M), cresceram no meio de cultura específico para celulases, mas não produziram halo de degradação. Provavelmente, os fungos não produziram halo de degradação, porque produziram quantidade suficiente da enzima apenas para o seu desenvolvimento.

Jahangeer et al. (2005) isolaram 115 fungos de ambiente, destes 67,83% possuíam a habilidade de degradar a celulose. Os fungos celulolíticos pertencem aos gêneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. Esses dados podem ser comparados aos do presente trabalho, pois os melhores índices enzimáticos pertencem ao gênero *Penicillium*.

Escobar et al. (2007) testaram dez isolados procedentes de substratos vegetais quanto à produção de celulases. Desses isolados, oito apresentaram atividade celulolítica, determinada pelo índice enzimático, sendo estes fungos pertencentes às espécies de *A. sydowi*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *Eurotium*

chevallieree, *P. waksmanii* e *Trichoderma kningii*. Esses resultados são semelhantes aos obtidos no presente trabalho, pois os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram resultados positivos quanto à produção de celulases.

Ruegger & Tauk- Tornisielo (2004) avaliaram a atividade de celulases de fungos isolados do solo e observaram que 45% dos isolados apresentaram atividade positiva, pois houve a formação do halo, indicando a degradação do meio. Observaram ainda que algumas colônias com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos, como *P. herquei* e *Trichoderma hamatum*, *P. miczniskii*, *P. verrucosum* e *P. glabrum*. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo com o fungo *P. expansum* (0057M) que apresentou colônia de menor diâmetro e maior valor do índice enzimático.

Para a avaliação do potencial de produção de lipases foram testadas 70 isolados de fungos, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 Produção de lipases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático (IE)

| Código | Origem | Gênero | IE |
|---------------|-------------------|-------------------------------------|----------------|
| (0034A) | Ambiente*** | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 3,39 a* |
| (0032M) | Micoteca - Café | <i>C. cladosporioides</i> | 3,30 a |
| (0030M) | Micoteca - Café | <i>Aspergillus versicolor</i> | 2,82 b |
| (0033A) | Amendoim | <i>C. cladosporioides</i> | 2,72 b |
| (0035A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 2,64 c |
| (0042A) | Ambiente | <i>Fusarium sp.</i> | 2,49 c |
| (0031M) | Micoteca - Café | <i>A. versicolor</i> | 2,49 c |
| (0065A) | Embutido de carne | <i>Penicillium sp.</i> | 2,43 c |
| (0036A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 2,36 c |
| (0029A) | Ambiente | <i>A. versicolor</i> | 2,30 c |
| (0066A) | Solo | <i>Penicillium sp.</i> | 2,21 d |
| (0056A) | Pão | <i>P. crustosum</i> | 2,16 d |
| (0059A) | Coco | <i>P. italicum</i> | 2,15 d |
| (0004M) | Micoteca - Café | <i>A. carbonarius</i> | 2,06 d |
| (0052M) | Micoteca - Café | <i>P. commune</i> | 2,04 d |
| (0003M) | Micoteca - Café | <i>A. carbonarius</i> | 2,00 d |
| (0017A) | Amendoim | <i>A. niger</i> | 1,93 e |
| (0046A) | Pão | <i>P. aurantiogriseum</i> | 1,85 e |
| (0009M) | Micoteca - Café | <i>A. foetidus</i> | 1,80 e |
| (0011A) | Café | <i>A. foetidus</i> | 1,78 e |
| (0016A) | Café | <i>A. niger</i> | 1,78 e |
| (0018A) | Amendoim | <i>A. niger Agregados</i> | 1,77 e |
| (0045A) | Limão | <i>Paecilomyces sp.</i> | 1,74 e |
| (0064A) | Ambiente | <i>Penicillium sp.</i> | 1,71 e |
| (0014M) | Micoteca - Café | <i>A. niger</i> | 1,70 e |
| (0010A) | Amendoim | <i>A. foetidus</i> | 1,69 e |
| (0039M) | Micoteca - Café | <i>F. lateritium</i> | 1,66 e |
| (0063M) | Micoteca - Café | <i>P. solitum</i> | 1,62 e |
| (0062A) | Ambiente | <i>P. solitum</i> | 1,57 e |
| 0015M) | Micoteca - Café | <i>A. niger</i> | 1,55 e |
| (0048A) | Carne | <i>P. chrysogenum</i> | 1,46 f |
| (0051M) | Micoteca - Café | <i>P. citrinum</i> | 1,46 f |
| (0057M) | Micoteca - Café | <i>P. expansum</i> | 1,46 f |
| (0047M) | Micoteca - Café | <i>P. brevicompactum</i> | 1,45 f |
| (0054M) | Micoteca - Café | <i>P. corylophilum</i> | 1,42 f |

...(Cont.)...

TABELA 4, Cont.

| | | | |
|---------|-------------------|---------------------------------|--------|
| (0061A) | Amendoim | <i>P. solitum</i> | 1,41 f |
| (0025M) | Micoteca - Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,40 f |
| (0021M) | Micoteca - Café | <i>A. sclerotiorum</i> | 1,40 f |
| (0068A) | Ambiente | <i>Pestalotia sp.</i> | 1,40 f |
| (0020A) | Embutido de carne | <i>A. ochraceus</i> | 1,40 f |
| (0002M) | Micoteca - Café | <i>A. auricomus</i> | 1,38 f |
| (0024M) | Micoteca - Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,34 f |
| (0060M) | Micoteca - Café | <i>P. roqueforti</i> | 1,32 f |
| (0050M) | Micoteca - Café | <i>P. citrinum</i> | 1,29 f |
| (0058A) | Ambiente | <i>P. glandicola</i> | 1,28 f |
| (0070M) | Micoteca - Café | <i>Talaromyces sp.</i> | 1,27 f |
| (0067M) | Micoteca - Café | <i>P. verrucosum</i> | 1,25 f |
| (0049M) | Micoteca - Café | <i>P. citrinum</i> | 1,20 f |
| (0026M) | Micoteca - Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,16 f |
| (0008A) | Amendoim | <i>A. flavus</i> | 1,14 f |
| (0019M) | Micoteca - Café | <i>A. ochraceus</i> | 1,14 f |
| (0001A) | Café | <i>A. auricomus</i> | 1,07 f |
| (0023A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,07 f |
| (0027A) | Café | <i>A. tamaritii</i> | 1,07 f |
| (0037A) | Amendoim | <i>Curvularia sp.</i> | 1,04 f |
| (0006M) | Micoteca - Café | <i>A. dimorphicus</i> | 0,89 g |
| (0055A) | Embutido de carne | <i>P. corylophilum</i> | 0,80 g |
| (0053A) | Coco | <i>P. commune</i> | 0,39 h |
| (0005M) | Micoteca - Café | <i>A. clavatus Strict sensu</i> | 0,00 h |
| (0007M) | Micoteca - Café | <i>A. dimorphicus</i> | 0,00 h |
| (0038A) | Ambiente | <i>Epiccocum sp.</i> | 0,00 h |
| (0040A) | Café | <i>F. oxysporum</i> | 0,00 h |
| (0022A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 0,00 h |
| (0071M) | Micoteca - Café | <i>Talaromyces sp.</i> | 0,00 h |
| (0028M) | Micoteca - Café | <i>A. tamaritii</i> | 0,00 h |
| (0013M) | Micoteca - Café | <i>A. melleus</i> | 0,00 h |
| (0012M) | Micoteca - Café | <i>A. lanosus</i> | 0,00 h |
| (0044M) | Micoteca - Café | <i>Fusarium verticillioides</i> | 0,00 h |
| (0041A) | Batata | <i>F. oxysporum</i> | 0,00 h |
| (0043A) | Pimentão | <i>F. verticillioides</i> | 0,00 h |

**CV(%) = 15,77

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

*** Ambiente de câmara de maturação de queijos.

Na figura abaixo encontram-se ilustradas os resultados dos testes efetuados para lipases.

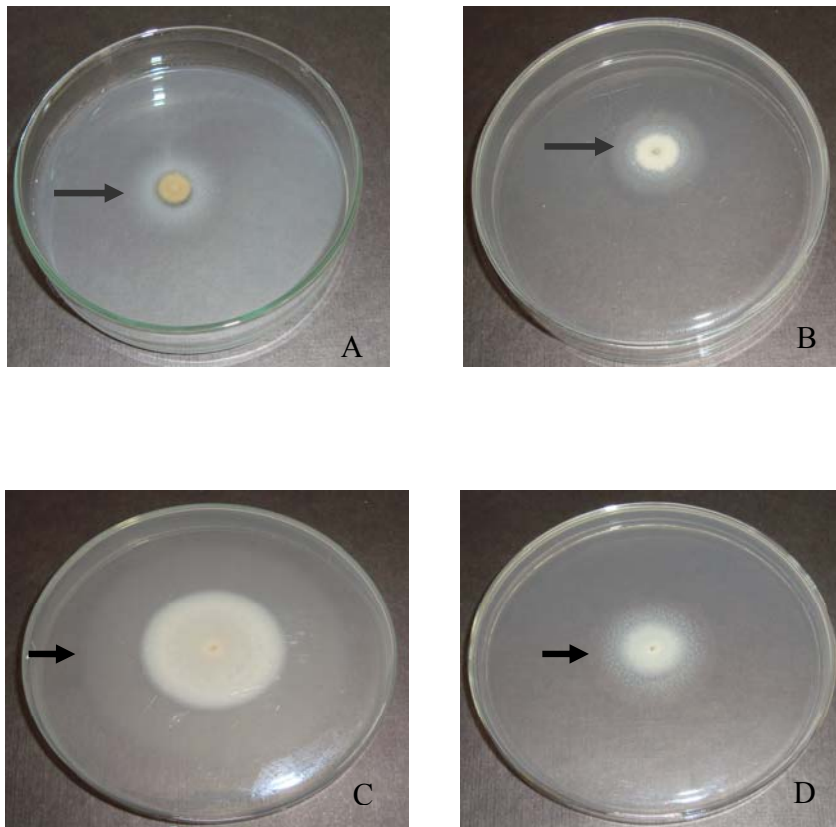


FIGURA 3 Teste semiquantitativo de produção da enzima lipases pelos microrganismos: *Cladosporium cladosporioides* (A), *C. cladosporioides* (B), *A. niger* (C) e *P. solitum* (D).

Conforme resultados da Tabela 4, pode-se observar que os isolados testados apresentaram uma ampla variação quanto ao potencial de produção da enzima e também em relação às fontes de isolamento, sendo que, destacaram-se os isolados *C. cladosporioides* (0034A) IE = 3,39; *C. cladosporioides* (0032M) IE = 3,30; *A. versicolor* (0030M) IE = 2,82; *C. cladosporioides* (0033A) IE = 2,72; *C. cladosporioides* (0035A) IE = 2,64; *Fusarium sp.* (0042A) IE = 2,49; *A. versicolor* (0031M) IE = 2,49; *Penicillium sp.* (0065A) IE = 2,43; *C. cladosporioides* (0036A) IE = 2,36; *A. versicolor* (0029M) IE = 2,30; *Penicillium sp.* (0066A) IE = 2,21; *P. crustosum* (0056A) IE = 2,16; *P. italicum* (0059A) IE = 2,15; *A. carbonarius* (0004M) IE = 2,06; *P. commune* (0052M) IE = 2,04; *A. carbonarius* (0003M) IE = 2,00; como isolados potenciais para a produção de lipases.

As outras espécies, apesar de não atingirem o índice enzimático recomendado, podem ser consideradas como um potencial intermediário, pois atingiram índice enzimático próximo a 2,00; enquanto que os demais se agruparam em uma produção enzimática inferior.

Com relação às espécies potencialmente produtoras de lipases, (Tabela 4), que o teste de atividade lipolítica foi o que resultou em maior número de isolados com índice enzimático $\geq 2,00$, correspondendo a 22,7% dos isolados testados. Esses resultados não estão de acordo com Terra (2008), pois relatam que as espécies potencialmente produtoras de protease apresentaram maior número de isolados com índice enzimático $\geq 2,00$. A autora relata que a espécie *A. ochraceus* apresentou o melhor índice enzimático (4,75) para a produção de lipases, diferente do observado no presente trabalho.

Shukla & Gupta (2007) relataram que das 18 espécies de fungos isolados de diferentes ambientes, 13 demonstraram produção ótima para lipases em meio sólido sendo, o melhor produtor foi *Rhizopus oryzae*. Embora, em seu trabalho, Colen (2006) tenha tido dificuldades em trabalhar com as cepas de

Rhizopus spp. por este isolado apresentar crescimento luxuriante, ocupando o micélio fúngico toda a superfície do meio de cultura, decorrido em apenas 48h de incubação, esse resultado também foi encontrado no presente trabalho quando trabalhamos com o gênero *Rhizopus* sp. O autor observou a atividade lipolítica em 59 cepas fúngicas, das quais apenas 25 cepas apresentaram halo em volta da colônia, denominado esta primeira etapa de seu trabalho como seleção primária. Em seguida, esses isolados foram submetidos à seleção secundária, no qual foram avaliadas as condições de fermentação em substrato líquido e sólido, sendo que o fungo *Coletotrichum gloesporioides* foi o maior produtor de lipase extracelular.

De acordo com Miura et al. (1997), a maior parte das espécies produtoras de lipases pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. No presente trabalho, foi verificada a presença da produção de lipases pelos gêneros de *Penicillium* e *Aspergillus*, além do gênero *Cladosporium*. Hankin & Anagnostakis (1975) relataram a produção de lipases por *Cladosporium*.

As espécies *A. clavatus* *Strictu sensu* (0005M), *A. dimorphicus* (0007M), *Epicoccum* sp. (0038A), *F. oxysporum* (0040A), *A. sulphureus* (0022A), *Talaromyces* sp. (0071M), *A. tamaritii* (0028M), *A. melleus* (0013M), *A. lanosus* (0012M), *F. verticillioides* (0044M), *F. oxysporum* (0041A) e *F. verticillioides* (0043A) cresceram no meio de cultura específico para lipases, porém não produziram halo de degradação. Sugere-se que estas espécies tenham produzido pouca quantidade de enzima, o suficiente apenas para o seu desenvolvimento no meio de cultura.

Para a avaliação do potencial de produção de proteases foram testadas 57 isolados, cujos resultados referentes aos potenciais quanto à produção da enzima encontram-se apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 Produção de proteases por fungos isolados de diversas fontes, avaliados pelo índice enzimático (IE)

| Código | Origem | Espécie | IE |
|---------------|--------------------|-------------------------------------|----------------|
| (0034A) | Ambiente*** | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 2,61 a* |
| (0048A) | Embutido de carne | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 2,42 b |
| (0031M) | Micoteca – café | <i>Aspergillus versicolor</i> | 2,23 c |
| (0033A) | Amendoim | <i>C. cladosporioides</i> | 2,02 d |
| (0042A) | Ambiente | <i>Fusarium sp.</i> | 1,95 d |
| (0067M) | Micoteca -café | <i>P. verrucosum</i> | 1,85 e |
| (0030M) | Micoteca - café | <i>A. versicolor</i> | 1,81 e |
| (0050M) | Micoteca - laranja | <i>P. citrinum</i> | 1,78 e |
| (0071M) | Micoteca - café | <i>Talaromyces sp.</i> | 1,73 f |
| (0035A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 1,72 f |
| (0070M) | Micoteca - café | <i>Talaromyces sp.</i> | 1,68 f |
| (0051M) | Micoteca - café | <i>P. citrinum</i> | 1,66 f |
| (0055A) | Embutido de carne | <i>P. corylophilum</i> | 1,63 f |
| (0049M) | Micoteca – laranja | <i>P. citrinum</i> | 1,62 f |
| (0065A) | Embutido de carne | <i>Penicillium sp.</i> | 1,58 f |
| (0052M) | Micoteca – café | <i>P. commune</i> | 1,50 g |
| (0027A) | Café | <i>A. tamarii</i> | 1,48 g |
| (0057M) | Micoteca - café | <i>P. expansum</i> | 1,46 g |
| (0036A) | Solo | <i>C. cladosporioides</i> | 1,43 g |
| (0056A) | Pão | <i>P. crustosum</i> | 1,41 g |
| (0046A) | Pão | <i>P. aurantiogriseum</i> | 1,40 g |
| (0019M) | Micoteca - café | <i>A. ochraceus</i> | 1,38 g |
| (0023A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,38 g |
| (0005M) | Micoteca - café | <i>A. clavatus Strictu sensu</i> | 1,38 g |
| (0032M) | Micoteca - café | <i>C. cladosporioides</i> | 1,34 h |
| (0002M) | Micoteca - café | <i>A. auricomus</i> | 1,33 h |
| (0001A) | Café | <i>A. auricomus</i> | 1,31 h |
| (0022A) | Café | <i>A. sulphureus</i> | 1,31 h |
| (0012M) | Micoteca - café | <i>A. lanosus</i> | 1,30 h |
| (0047M) | Micoteca - café | <i>P. brevicompactum</i> | 1,30 h |
| (0054M) | Micoteca - café | <i>P. corylophilum</i> | 1,26 h |
| (0026M) | Micoteca - café | <i>A. sulphureus</i> | 1,23 i |
| (0004M) | Micoteca - café | <i>A. carbonarius</i> | 1,23 i |
| (0063M) | Micoteca - café | <i>P. solitum</i> | 1,21i |

...(Cont.)...

TABELA 5, Cont.

| | | | |
|---------|-------------------|---------------------------|--------|
| (0060M) | Micoteca - café | <i>P. roqueforti</i> | 1,19 i |
| (0024M) | Micoteca - café | <i>A. sulphureus</i> | 1,18 i |
| (0003M) | Micoteca - café | <i>A. carbonarius</i> | 1,17 i |
| (0028M) | Micoteca - café | <i>A. tamarii</i> | 1,17 i |
| (0020A) | Embutido de carne | <i>A. ochraceus</i> | 1,15 i |
| (0039M) | Micoteca – café | <i>F. lateritium</i> | 1,15 i |
| (0066A) | Solo | <i>Penicillium sp.</i> | 1,13 i |
| (0013M) | Micoteca – café | <i>A. melleus</i> | 1,12 i |
| (0025M) | Micoteca - café | <i>A. sulphureus</i> | 1,11 j |
| (0029A) | Ambiente | <i>A. versicolor</i> | 1,11 j |
| (0044M) | Micoteca - café | <i>F. verticillioides</i> | 1,10 j |
| (0037A) | Amendoim | <i>Curvularia sp.</i> | 1,10 j |
| (0008A) | Amendoim | <i>A. flavus</i> | 1,07 j |
| (0043A) | Pimentão | <i>F. verticillioides</i> | 1,06 j |
| (0058A) | Ambiente | <i>P. glandicola</i> | 1,06 j |
| (0064A) | Ambiente | <i>Penicillium sp.</i> | 1,05 j |
| (0021M) | Micoteca - café | <i>A. sclerotiorum</i> | 1,05 j |
| (0040A) | Café | <i>F. oxysporum</i> | 1,05 j |
| (0006M) | Micoteca - café | <i>A. dimorphicus</i> | 1,04 j |
| (0007M) | Micoteca - café | <i>A. dimorphicus</i> | 1,03 j |
| (0041A) | Batata | <i>F. oxysporum</i> | 1,02 j |
| (0053A) | Coco | <i>P. commune</i> | 1,02 j |
| (0017A) | Amendoim | <i>A. niger</i> | 0,00 k |

**CV(%) = 6,46

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

*** Ambiente de câmara de maturação de queijos.

Na figura abaixo encontram-se ilustradas os resultados dos testes efetuados para proteases.

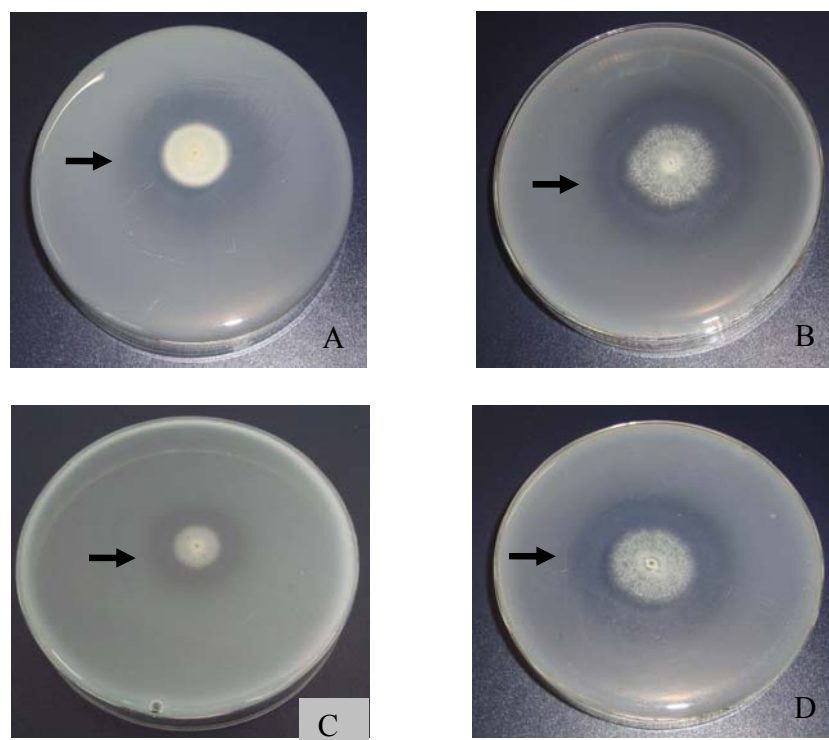


FIGURA 4 Teste semiquantitativo de produção da enzima protease pelos microrganismos: *Penicillium variabile* (A), *P. roqueforti* (B), *P. brevicompactum* (C) e *P. aurantiogrisum* (D).

Conforme resultados da Tabela 5, pode-se observar que os isolados testados apresentaram uma variação quanto ao potencial de produção da enzima e quanto a fonte de onde foram isolados, sendo que, destacaram-se os fungos *C. cladosporioides* (0034A) IE = 2,61; *P. chrysogenum* (0048A) IE = 2,42; *A.*

versicolor (0031M) IE = 2,23 e *C. cladosporioides* (0033A) IE = 2,02; pois apresentaram índice enzimático $\geq 2,00$, correspondendo a 7,0% dos isolados testados.

Os fungos *Fusarium* sp. (0042A), *P. verrucosum* (0067M), *A. versicolor* (0030M), *P. citrinum* (0050M), *Talaromyces* sp. (0071M), *C. cladosporioides* (0035A), *Talaromyces* sp. (0070M), *P. citrinum* (0051M), *P. corylophilum* (0055A), *P. citrinum* (0049M) e *Penicillium* sp. (0065A), apresentaram um potencial intermediário, pois apresentaram resultados muito próximos ao índice enzimático recomendado, enquanto que os demais se agruparam em uma produção enzimática inferior.

Terra (2008) ressalta que o *P. variable* apresentou maior índice enzimático (5,09) para a atividade proteolítica. No presente trabalho, o isolado que apresentou maior índice enzimático foi *Cladosporium cladosporioides* (0034A) IE = 2,61.

Embora o fungo *A. niger* não tenha produzido halo de degradação como sendo indicativo para a determinação proteolítica, de acordo com Schuster et al. (2002), o *A. niger* é o mais importante microrganismo usado na biotecnologia. Tem sido usado já por muitas décadas para a produção de enzimas extracelulares e pela produção de ácido cítrico, sendo considerado pela FAO um microrganismo GRAS. Somente 3-10% de seus isolados podem produzir Ocratoxina A.

Teixeira (1994) constatou que os maiores halos de atividades enzimáticas foram produzidos por *A. niger* para amilases, celulases, e pectinases, enquanto *A. flavus*, *A. zonatus*, *A. oryzae* e *A. sydowii* para proteases. Esses resultados não foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho, pois o *A. flavus* (0008A) apresentou índice enzimático agrupando-se junto aos fungos de menor potencial de produção desta enzima, IE = 1,07, não atingindo o índice

enzimático que possibilitasse a sua classificação entre os fungos potencialmente produtores de proteases.

Na tabela 6, pode-se observar que o mesmo isolado apresenta potencial enzimático para produzir diferentes enzimas. O fungo *P. roqueforti* apresentou bom potencial para a produção de amilases e celulases, com IE = 2,83 e 2,41 respectivamente. Os isolados do fungo *C. cladosporioides* (0032M) e *C. cladosporioides* (0035A) apresentaram $IE \geq 2,00$ de amilases e lipases, equivalente a 2,78, 3,30; 2,11 e 2,74 respectivamente. Para a produção de lipases e proteases podemos destacar os isolados *C. cladosporioides* (0034A) e *C. cladosporioides* (0033A) e *A. versicolor* (0031M). Tais resultados concordam com a afirmativa de Hankin e Anagnostakis (1974) que avaliaram a produção de enzimas extracelulares como amilases, lipases, DNA e RNAases, pectinases, proteases, ureases e quitinases por fungos e constataram que alguns fungos podem ser produtores de várias enzimas, como por exemplo: *Cladosporium* sp. enquanto outros podem produzir poucas enzimas como por exemplo *Mucor* sp.

Os presentes resultados indicam ainda que gêneros e espécies comuns como o *Cladosporium cladosporioides* apresentam diferentes potenciais enzimáticos e produzem diferentes enzimas.

TABELA 6 Isolados fúngicos que apresentaram índices enzimáticos (IE \geq 2,00)

| Espécies | Origem | Amilase | Celulase | Lipase | Protease |
|---|-------------------|---------|----------|--------|----------|
| (0003M) <i>A. carbonarius</i> | Micoteca - café | - | - | 2,00 | - |
| (0004M) <i>A. carbonarius</i> | Micoteca - café | - | - | 2,06 | - |
| (0005M) <i>A. clavatus Strict sensu</i> | Micoteca - café | - | 2,19 | - | - |
| (0029A) <i>A. versicolor</i> | Ambiente* | - | - | 2,30 | - |
| (0030M) <i>A. versicolor</i> | Micoteca - café | - | - | 2,82 | - |
| (0031M) <i>A. versicolor</i> | Micoteca - café | - | - | 2,49 | 2,23 |
| (0032M) <i>C. cladosporioides</i> | Micoteca - café | 2,78 | - | 3,30 | - |
| (0033A) <i>C. cladosporioides</i> | Amendoim | - | - | 2,72 | 2,02 |
| (0034A) <i>C. cladosporioides</i> | Ambiente | - | - | 3,39 | 2,61 |
| (0035A) <i>C. cladosporioides</i> | Solo | 2,11 | - | 2,64 | - |
| (0036A) <i>C. cladosporioides</i> | Solo | - | - | 2,36 | - |
| (0042A) <i>Fusarium sp.</i> | Ambiente | - | - | 2,49 | - |
| (0047M) <i>P. brevicompactum</i> | Micoteca - café | 2,33 | - | - | - |
| (0048A) <i>P. chrysogenum</i> | Embutido de carne | - | - | - | 2,42 |
| (0052M) <i>P. commune</i> | Micoteca - café | - | 2,13 | 2,04 | - |
| (0056A) <i>P. crustosum</i> | Pão | - | 5,83 | 2,16 | - |
| (0057M) <i>P. expansum</i> | Micoteca - café | - | 3,67 | - | - |
| (0059A) <i>P. italicum</i> | Coco | - | - | 2,15 | - |
| (0060M) <i>P. roqueforti</i> | Micoteca - café | 2,83 | 2,41 | - | - |
| (0061A) <i>P. solitum</i> | Amendoim | - | 2,67 | - | - |
| (0065A) <i>Penicillium sp.</i> | Embutido de carne | - | - | 2,43 | - |
| (0066A) <i>Penicillium sp.</i> | Solo | - | - | 2,21 | - |
| (0067M) <i>P. verrucosum</i> | Micoteca - café | 4,25 | - | - | - |

* Ambiente de câmara de maturação de queijos

Observa-se ainda na Tabela 6, que alguns fungos que apresentaram potenciais mais elevados para a produção de algumas enzimas, encontravam-se naturalmente associados a alguns produtos ou partes vegetais. Cita-se como exemplo os isolados *P. crysogenum* (0048A) e *Penicillium* sp. (0065A), originários de embutido de carne, apresentaram índice enzimáticos potenciais elevados com relação às enzimas proteases e lipases, conforme esperado em fungos associados a produtos cárneos.

Por outro lado, fungos originários de fontes como frutos de café (*A. carbonarius* – 0003M, *A. carbonarius* – 0004M, *A. clavatus Strictu sensu* – 0005M, *A. versicolor* – 0030M, *A. versicolor* - 0031M, *Cladosporium cladosporioides* – 0032M, *P. brevicompactum* – 0047M, *P. commune* – 0052M, *P. roqueforti* 0060M, *P. verrucosum* – 0067M) apresentaram elevados potenciais enzimáticos para a produção de enzimas não requeridas diretamente para o processo de estabelecimento dos fungos nesse produto. Cita-se como exemplo a produção de lipases pelos isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides*. Tal fato demonstra a versatilidade de um fungo quanto ao potencial enzimático, possibilitando o seu estabelecimento em vários ambientes e o seu aproveitamento para diferentes aplicações industriais.

5 CONCLUSÕES

A partir da metodologia executada neste trabalho conclui-se que:

- Dos microrganismos testados quanto ao potencial para a produção das enzimas amilase, celulase, lipase e protease 16,1%, 25,0%, 22,9% e 7,0% respectivamente apresentaram potencial enzimático ($IE \geq 2,00$).

- *Penicillium roqueforti* (0060M), *Cladosporium cladosporioides* (0032M), *Cladosporium cladosporioides* (0035A), *Cladosporium cladosporioides* (0034A), *Cladosporium. cladosporioides* (0033A) e *Aspergillus versicolor* (0031M) apresentaram potencial enzimático positivo para a produção de mais de uma enzima.

- Os microrganismos testados diferiram quanto ao potencial enzimático mesmo pertencentes à mesma espécie.

- Dentre os isolados testados as espécies que apresentaram os maiores índices enzimáticos foram *Penicillium verrucosum* $IE = 4,25$ para atividade amilolítica, *Penicillium crustosum* $IE = 5,83$ para atividade celulotítica, *Cladosporium cladosporioides* (0034A) $IE = 2,82$ e $2,61$, respectivamente, para a atividade lipolítica e proteolítica.

- Alguns isolados apresentaram potencial enzimático relacionado com as fontes de isolamento dos fungos e outros apresentaram diversidade quanto ao potencial enzimático, independente da fonte de isolamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAGLI, S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 7-10, jan./abr. 1998.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxtil. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p.179-200.
- BARNETT, H. L.; BARRY, B. H. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. New York: Macmillan Company, 1986. 218p.
- BASTOS, C. N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 286- 288, maio/jun. 2004.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, Dec. 1998.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.
- BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**. 3. ed. San Diego: Academic, 1993. p.121- 158.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995. 222p.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.
- BOOPATHY, R. Enzyme Technology in food health industries. **Indian Food Industry**, v. 13, p. 22-31, 1994.

CANTO, W. L.; MENEZES, T. J. B. **Estudos econômicos: alimentos processados, produção, uso e mercado de enzimas.** Campinas: ITAL. 1995.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 614-621, jun. 2005.

CARVALHO, S. **Pectinases produzida pelo agente biológico G088: extração e purificação.** 2007. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CESKA, M. Enzymatic catalysis of solidified media. **European Journal Biochemistry**, Berlim, v. 22, n. 2, p. 186-192, Mar. 1971.

CHEETHAM, P. S. J. Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: Wiseman, A. (Ed.). **Handbook of enzymes biotechnology.** Hemel Hempstead: Ellis Horwood, 1995. p. 83-234.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synopton. **Mycologia**, New York, v. 74, n. 2, p. 210-225, Mar./Apr. 1982.

COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 71-94.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** 2006. 160p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 4, n. 8, p. 149-155, Apr. 1953.

ENARI, T. M.; MARKKANEN, P. Production of cellulolytic enzymes by fungi. In: GHOSE, T. K., FIECHLER, A.; BLAKEBROUGH, N. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.** Berlin: Springer, 1977. p. 1-24.

ESCOBAR, I.; SANTOS, V.; VERAS, F.; ARAUJO, H.; MOTTA-SOUZA, C.; NEVES, R.; HERCULANO, P.; PORTO, A.; SAAVEDRA, G. Seleção de fungos produtores de celulase procedentes de substratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2007. p. 246.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para a análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Anais...** São Carlos: Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia:** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 369-385.

FROST G. M.; MOSS, D. A. production of enzymes by fermentation. In: REHM H. J.; REED, G. **Biotechnology.** Weinheim: VCH, 1997. p. 65-102.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de las enzimas.** Zagaroza: Acriba, 1990. 206p.

GADEN JÚNIOR, E. L. Global biotechnology: prospects and problems. **Biotechnology and bioengineering symposium**, New York, n. 15, p. 9-21, June 1985.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 5-6, p. 577-587, June/July 2009.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos :** termos conceitos aplicados a micologia. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 124p.

GUIMARÃES, L. H. S.; NOGUEIRA-PEIXOTO, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474- 480, out./dez. 2006.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1-18, Jan. 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, Nov./Dec. 1975.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, Feb. 2006.

HOFELMANN, M.; HARTMAN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Isolation, purification and characterization of a lipase from technical *Aspergillus niger* enzyme. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1721- 1731, Aug. 1985.

ILLANES, A. **Biotecnología de enzimas**. Valparaiso: Universidad Católica de Valparaiso, 1994.

IONITA, A.; MOSCOVICI, M.; POPA, C.; VAMANU, A.; POPA, O.; DINU, L. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 147-151, June 1997.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnology applications as lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 315-351, Oct. 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 29-63, Sept. 1994.

JAHANGEER, S.; KHAN, S. J. SOHAIL, M. SHAHZAD, S.; AHMAD, A. KHAN, S. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, Peshawar, v. 37, n. 3, p. 739- 48, Mar. 2005.

JAMES, J. A.; LEE, B. H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 21, n. 1, p.1-52, June. 1997.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram- positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 348-352, Mar. 1994.

LEHNINGER, A. L. NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Manhattan: Blackwel, 2006. p.388.

LIMA-FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 620-625, nov./dez, 2003.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decad fungi that can degrade toxic chemical. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 5, n. 4, p. 275- 280, July 1991.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção de crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, p. 128-134, abr./jun. 2006.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/ CNPMA, 1998. 486p.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles e future trends. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 177 - 185, Mar./Apr. 2008.

MIURA, T.; YAMANE, T. Screening for fungi that have high lipolytic and acidolytic activities in biomass support particles. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 8, p.1252-1257, Oct. 1997.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

MUKHERJEE, K. D.; HILLS, M. J. Lipases from plants. In: WOOLEY, P. PETERSEN, S. B.; **Lipases: their structure, biochemistry and application.** Cambridge: Cambridge University, 1994. cap. 3. p. 49–75.

NEIDLEMAN, S. L. Enzymes in the food industry: a backward glance. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.1, p. 88-91, Jan. 1991.

NELSON, P. E.; TOUSSOUNN, T. A.; MARASAS, W.F. O. **Fusarium species an illustrated manual for identification.** Pennsylvania: University Park, 1983. 193p.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia centra, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez, 2006.

OLSON, G. R.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The wind of (evolutionary) chance: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 1, p. 1-6, Jan. 1994.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, jan. 2006.

PELCZAR, J. R.; MICHAEL, J. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** 2. ed. Australia: CSIRO Food Science Australia, 1988. p. 187.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593p.

PUNT, P. J.; BIEZEN, N. Van.; CONESA, A.; ALBERS, A.; MANGNUS, J.; HONDEL, C. van den. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 200-206, May 2002.

PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity, **Nature**, London, v. 405, p. 212- 219, May 2000.

PUTZKE, J.; PUTZKE, T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. v. 2, 829 p.

RAJAN, M. **RC- 147NB enzymes for industrial applications**. 2001.
Disponível em: <[http://www.bccresearch.com/ editor/RC-147NB.html](http://www.bccresearch.com/editor/RC-147NB.html)>. Acesso em: 13 mar. 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular e Biotechnological aspect Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 579-635, Sept. 1998.

REED, G. Introduction. In: NAGODAWITHANA, T.; Reed, G. **Enzymes in food processing**. 3. ed. San Diego : Academic, 1993. 480p.

ROLLE, R. S. Review: enzyme applications for agro - processing in developing countries: an inventory of current and potential applications. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 611-619, Oct. 1998.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados da estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n.2, p.205-211, abr./jun. 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. 6. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 387p.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. DIJCK, P. W. M. van. On the safety of *Aspergillus Niger*: a review. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, n. 59, n. 4-5, p. 426-435, Dec. 2002.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GOES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./ dez. 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, n. 8, p. 627-662, Dec. 2001.

SHUKLA, P.; GUPTA. K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. **Journal of Applied Sciences in Environment Sanitation**, Surabaya, v. 2, n. 2, p. 35-42, May 2007.

SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p.15-22, Dec. 1957.

SOUZA, L. H.; SOMMER, P. S. M. As enzimas indústrias na produção de alimentos: passado, presente e perspectivas futuras. **Jornal da ANBIO**, Rio de Janeiro, v. 2, nº 7, julho de 2002. Disponível em: < <http://www.anbio.org.br/jornais/jornal/jornal.htm>>. Acesso em: 18 mar. 2009

STAMFORD, T. L. M. ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385, out./dez. 1998.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrências e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos**. 1994. 85p. (Dissertação na área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

TERRA, M. F. **Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira**. 2008. 60p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; LEVY, C. M. A.; COURI, S.; BON, E. P. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 273-286.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of aspergillus. **Advances In Applied Microbiology**, San Diego, v. 58, p.1-75, Feb. 2006.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Acriba, 1985. 445p.

WISEMAN, A. Introduction to principles. In: _____. **Handbook of enzyme biotechnology**. 3. ed. Padstow, UK: Ellis Horwood; 1995. p. 3-8.

ANEXO

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1A | Relação dos fungos filamentosos isolados de diferentes fontes e identificados para a avaliação do potencial enzimático..... | 57 |
|-----------|---|----|

TABELA 1A Relação dos fungos filamentosos isolados de diferentes fontes e identificados para a avaliação do potencial enzimático

| Espécies | Origem |
|---|--|
| 0001A - <i>A. auricomus</i> | Cafê |
| 0002M - <i>A. auricomus</i> | Micoteca - café |
| 0003M - <i>A. carbonarius</i> | Micoteca - café |
| 0004M - <i>A. carbonarius</i> | Micoteca - café |
| 0005M - <i>A. clavatus Strict sensu</i> | Micoteca - café |
| 0006M - <i>A. dimorphicus</i> | Micoteca - café |
| 0007M - <i>A. dimorphicus</i> | Micoteca - café |
| 0008 A - <i>A. flavus</i> | Amendoim |
| 0009M - <i>A. foetidus</i> | Micoteca - café |
| 0010A - <i>A. foetidus</i> | Amendoim |
| 0011A - <i>A. foetidus</i> | Cafê |
| 0012M - <i>A. lanosus</i> | Micoteca - café |
| 0013M - <i>A. melleus</i> | Micoteca - café |
| 0014M - <i>A. niger</i> | Micoteca - café |
| 0015M - <i>A. niger</i> | Micoteca - café |
| 0016A - <i>A. niger</i> | Cafê |
| 0017A - <i>A. niger</i> | Amendoim |
| 0018A - <i>A. niger Agregados</i> | Amendoim |
| 0019M - <i>A. ochraceus</i> | Micoteca - café |
| 0020A - <i>A. ochraceus</i> | Embutido de carne |
| 0021M - <i>A. sclerotiorum</i> | Micoteca - café |
| 0022A - <i>A. sulphureus</i> | Cafê |
| 0023A - <i>A. sulphureus</i> | Cafê |
| 0024M - <i>A. sulphureus</i> | Micoteca - café |
| 0025 M - <i>A. sulphureus</i> | Micoteca - café |
| 0026 M - <i>A. sulphureus</i> | Micoteca - café |
| 0027A - <i>A. tamarii</i> | Cafê |
| 0028M - <i>A. tamarii</i> | Micoteca - café |
| 0029A - <i>A. versicolor</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0030M - <i>A. versicolor</i> | Micoteca - café |
| 0031M - <i>A. versicolor</i> | Micoteca - café |
| 0032 M - <i>C. cladosporioides</i> | Micoteca - café |
| 0033A - <i>C. cladosporioides</i> | Amendoim |
| 0034A - <i>C. cladosporioides</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0035A - <i>C. cladosporioides</i> | Solo |
| 0036A - <i>C. cladosporioides</i> | Solo |
| 0037A - <i>Curvularia sp</i> | Amendoim |
| 0038A - <i>Epicoccum sp.</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |

(...Continua...)

TABELA 1A , Cont.

| | |
|-----------------------------------|--|
| 0039M - <i>F. lateritium</i> | Micoteca - café |
| 0040A - <i>F. oxysporum</i> | Cafê |
| 0041A - <i>F. oxysporum</i> | Batata |
| 0042A - <i>Fusarium sp.</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0043A - <i>F. verticillioides</i> | Pimentão |
| 0044M - <i>F. verticillioides</i> | Micoteca - café |
| 0045A - <i>Paecilomyces sp.</i> | Limão |
| 0046A - <i>P. aurantiogriseum</i> | Pão |
| 0047M - <i>P. brevicompactum</i> | Micoteca - café |
| 0048A - <i>P. chrysogenum</i> | Embutido de carne |
| 0049M - <i>P. citrinum</i> | Micoteca - laranja |
| 0050M - <i>P. citrinum</i> | Micoteca - café |
| 0051M - <i>P. citrinum</i> | Micoteca - café |
| 0052M - <i>P. commune</i> | Micoteca - café |
| 0053A - <i>P. commune</i> | Coco |
| 0054M - <i>P. corylophilum</i> | Micoteca - café |
| 0055A - <i>P. corylophilum</i> | Embutido de carne |
| 0056A - <i>P. crustosum</i> | Pão |
| 0057M - <i>P. expansum</i> | Micoteca - café |
| 0058A - <i>P. glandicola</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0059A - <i>P. italicum</i> | Coco |
| 0060M - <i>P. roqueforti</i> | Micoteca - café |
| 0061A - <i>P. solitum</i> | Amendoim |
| 0062A - <i>P. solitum</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0063M - <i>P. solitum</i> | Micoteca - café |
| 0064A - <i>Penicillium sp.</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0065A - <i>Penicillium sp.</i> | Embutido de carne |
| 0066A - <i>Penicillium sp.</i> | Solo |
| 0067M - <i>P. verrucosum</i> | Micoteca - café |
| 0068A - <i>Pestalotia sp.</i> | Ambiente de câmara de maturação de queijos |
| 0069A - <i>Rizhopuz sp.</i> | Amendoim |
| 0070M - <i>Talaromyces sp.</i> | Micoteca - café |
| 0071M - <i>Talaromyces sp.</i> | Micoteca - café |
