



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILASE, CELULASE E PROTEASE A
PARTIR DOS GÊNEROS FÚNGICOS *Aspergillus* E *Penicillium*.**

JULIANA BARROS COSTA

SÃO LUÍS - MA
2017

JULIANA BARROS COSTA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILASE, CELULASE E PROTEASE A
PARTIR DOS GÊNEROS FÚNGICOS *Aspergillus* E *Penicillium*.**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Geusa Felipa de Barros Bezerra.

SÃO LUÍS-MA
2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

BARROS COSTA, JULIANA.

Avaliação da produção de enzimas amilase, celulase e protease a partir dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* / JULIANA BARROS COSTA. - 2017.

64 f.

Orientador (a): GEUSA FELIPA DE BARROS BEZERRA.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências

Biológicas,

Universidade Federal do Maranhão, UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, 2017.

1. *Aspergillus*. 2. Enzimas. 3. Fungos. 4. Índiceenzimático. 5. *Penicillium*. I. FELIPA DE BARROS BEZERRA, GEUSA. II. Título.

JULIANA BARROS COSTA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILASE, CELULASE E
PROTEASE A PARTIR DOS GENEROS FÚNGICOS *Aspergillus* E *Penicillium*.**

Aprovada em 12 / 07 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Geusa Felipa de Barros Bezerra (Orientadora)

Prof. Dr. Juliano, dos Santos (1^a examinador)

Prof^a. Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (2^o examinadora)

*A Deus, por seu infinito amor e aos meus
pais que são tudo para mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter cuidado de mim e de cada detalhe desse trabalho, por Ele ter provido tudo, e por ter colocado em meu caminho pessoas que me ajudaram em cada etapa da elaboração desse estudo. Agradeço por ser o autor da vida e da salvação, por seu amor incondicional que se revela a cada instante em minha vida e por me ensinar dia após dia que Ele é quem me sustenta e me guarda. A Deus serei eternamente grata por cada dia me transformar em alguém melhor, forjando o meu caráter e me ensinando a amar as pessoas que estão a minha volta.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade da realização do curso.

Ao Projeto de Extensão do Laboratório de Micologia do DAPAT /NIBA/UFMA: Saberes, Práticas e Aplicações na área de Saúde e Biotecnologia, do qual participei e fui bolsista por um ano, tempo em que aprendi lições que contribuíram grandemente para minha vida acadêmica.

À professora Dr. Geusa Felipa de Barros Bezerra, pela confiança e paciência, deixo a ela o meu muito obrigada por sua orientação e correções que me fizeram aprender e crescer nesta caminhada, seu carinho e amizade ficarão guardados para sempre em meu coração.

À professora Dr. Maria do Desterro Soares Nascimento Brandão responsável pelo NIBA/UFMA pela oportunidade de executar esse trabalho.

À professora Kátia Regina Assunção Borges que me ajudou nas várias etapas da realização dos experimentos e também na identificação dos fungos.

À Daniella Castro minha amiga incentivadora, que sempre esteve comigo me apoiando, sendo um instrumento usado por Deus para me ajudar. Uma menina de Deus que trouxe para minha vida importantes ensinamentos.

Ao Igor Vinícius meu amigo, que de bom grado me ajudou na identificação dos fungos e que sempre esteve me apoiando.

Ao professor Dr. Juliano Santos que através de seus ensinamentos sobre Microbiologia Ambiental, me fez ver a importância da realização desse estudo.

A Elaine que me ajudou a dar os primeiros passos no Laboratório de Micologia.

E por último, mas não menos importantes, agradeço aos meus pais, irmãos e amigos.

Agradeço a Deus pela vida dos meus pais que são a razão do meu viver, deixo a eles minha eterna gratidão por terem cuidado de mim desde sempre, por continuamente me

incentivarem a estudar e por nunca deixarem faltar nada durante todos esses anos de vida e de estudo. A minha mãe, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons, e nos mais difíceis da minha vida, sendo sempre um refúgio me ouvindo e me abraçando nos momentos em que as lágrimas inevitavelmente escorriam dos meus olhos. Ao meu pai por ser um homem tão sábio, tão amoroso e dedicado, por me ensinar lições que somente um pai instruído por Deus poderia dar, por seu amor e carinho demonstrado todos os dias, e por nunca ter medido esforços para garantir meus estudos sempre me incentivando, me presenteando com uma caneta, livro ou agenda que guardo até hoje com muito amor. São eles os responsáveis pela formação do meu caráter, não há nada em mim que não seja o reflexo deles. Agradeço a eles por seu amor e dedicação incondicionais, tudo que me tornei devo a eles, os amarei sempre e para sempre!

Agradeço a Deus pela vida dos meus irmãos que com dedicação sempre me incentivaram e acreditaram em mim, e sempre se disponibilizaram a me ajudar no que fosse preciso. Saber que os tenho em minha vida me alegra e me permite contemplar que tudo vale a pena. Agradeço a minha sobrinha linda e preciosa, Jamily, que sempre me alegra e me faz sorrir com sua presença e atitudes tão puras, reveladas em uma pequena conversa, ou a me presentear com uma flor encontrada por ela, no caminho de volta para casa ao sair da escola. Agradeço a minha cunhada Josielma Escórcio que sempre esteve disposta a me ouvir e aconselhar nos momentos que precisei.

A Deus, sou grata pela vida dos meus amigos, agradeço a cada um deles por seu incentivo e apoio frequentes, agradeço em especial a Rayane Kelly minha amiga irmã que me ajudou demasiadamente nas correções deste trabalho, que sempre com amor, carinho e paciência me ouviu, além de dedicar um pouco do seu escasso tempo na produção dos tampões. A ela dedico minha infinita gratidão.

Agradeço também a minha amiga Gabrielle Lira por seu apoio e carinho transmitidos através da leitura desse estudo, corrigindo o plano inicial com paciência e dedicação.

Agradeço à minha princesa Suzankarlla Everton, que com todo amor e dedicação me ajudou em uma importante etapa desse estudo, e além de tudo, está sempre ao meu lado, me proporcionando momentos inesquecíveis de conversas e risadas.

Ao meu cunhadinho e amigo Esequias Pinheiro que sempre com carinho e muita boa vontade me ajudou nas impressões desse trabalho e em muitas outras coisas.

Ao meu amigo Leanderson Luz que com muito empenho se dispôs a me ajudar na compreensão dos testes estatísticos, e com paciência me acompanhava sempre que necessário.

Sou grata a Deus pela igreja da qual faço parte, cada ensinamento, cada amigo, cada

irmão e cada projeto realizado, deixaram ensinamentos profundos em minha vida que levarei comigo por onde quer que eu for. Agradeço a Deus com infinito amor pelo JOFADI, (Jovens Fazendo a Diferença) foi com esses jovens, e por causa deles que dediquei longos anos da minha vida ao serviço cristão, servindo com amor a minha igreja e a comunidade em que vivo. Com eles aprendi lições que curso nenhum me ensinaria, com muitos deles derramei lágrimas e derramarei sempre que preciso for, para que eles aprendam a amar e ter um verdadeiro relacionamento com Deus através da oração. Agradeço a todos que estão presentes em minha vida, e que de uma maneira ou de outra, seja de forma simples ou não, estão sempre me ensinando algo.

“Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém!”

Romanos 11:36

RESUMO

Os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fontes produtoras de enzimas. O gênero *Aspergillus* apresenta grande destaque atualmente, pois têm sido utilizados na produção de diversos produtos, sendo considerado importante economicamente. As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, por sua vez tem sido amplamente estudada, e em muitas pesquisas aplicadas é constatado seu alto potencial biotecnológico. As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, são elas as responsáveis por inúmeras reações químicas que ocorrem tanto no interior das células quanto fora delas, além disso, possuem um papel importante na degradação da matéria orgânica, na deterioração dos alimentos e na infecção do hospedeiro. Ocorrem na natureza podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e a partir de microrganismos. Esta última é a mais utilizadas nas indústrias, isso porque elas conseguem se desenvolver em ambientes extremos, sua produção em larga escala apresenta certa facilidade, além disso, a aplicação da engenharia genética facilita ainda mais essa produção, além de aprimorá-la. Diante disso, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade e o potencial de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* quanto à produção de enzimas extracelulares como amilases, celulasas e proteases. Os fungos utilizados neste estudo pertencem a Coleção de Fungos do Laboratório de Micologia (Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada) – NIBA / DEPAT da Universidade Federal do Maranhão. 20 fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram avaliados quanto a produção de amilases, celulasas e proteases. Destes, 15 produziram amilases, 18 produziram celulasas e 6 produziram proteases apresentando potencial enzimático (IE > 2,00). Dos isolados testado, 13 apresentaram potencial multienzimático, destacando-se *Aspergillus fumigatus* (AR04), *Aspergillus fumigatus* (CH24), *Aspergillus niger* (SL72), *Penicillium corylophilum* (SL33) e *Penicillium spinulosum* (SL07) que foram capazes de produzir os três tipos de enzimas amilases, celulasas e proteases propostas nesta pesquisa. Os microrganismos testados diferiram quanto ao potencial enzimático mesmo pertencendo à mesma espécie. Dentre os isolados testados a espécie *Aspergillus niger* apresentou os maiores índices enzimáticos para atividade amilolítica, celolítica e proteolítica. Tais resultados demonstram que os fungos testados pertencentes à Coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão apresentam potencial enzimático, podendo ser futuramente utilizado em estudos industriais e/ou novos fármacos.

Palavras chaves: Fungos, índice enzimático (IE), potencial multienzimático, biotecnologia.

ABSTRACT

Enzymes are essential proteins of the metabolic system of all living organisms. They are responsible for many chemical reactions that occur intra and extracellularly. Besides that, they play an important role on the degradation of the organic matter, food spoilage and infection of the host. Enzymes occur in nature and can be obtained from animal, vegetal and microorganisms. The latter is the most utilized in industry, because they are able to survive in extreme conditions and its production is at large scale. Moreover, the application of genetic engineering facilitates and improve even more this production. Filamentous fungi belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera are considered producing source of enzymes. The *Aspergillus* genera is greatly highlighted currently, because they have been used on the production of many products, being considered economically important. Species belonging to *Penicillium* genera, in turn, have been largely studied, and in many applied researches it is verified its high biotechnological potential. Therefore, this study aimed to evaluate the capacity and potential of fungi from *Aspergillus* and *Penicillium* genera for the production of extracellular enzymes such as amylases, cellulases and proteases. The fungal isolates used belong to the Fungi Collection of the Mycology Laboratory (Nucleus of Basic and Applied Immunology) - NIBA / DEPAT of the Federal University of Maranhão. 20 isolates were evaluated for the production of amylases, cellulases and proteases. Of these, 15 produced amylases, 18 produced cellulases and 6 produced proteases having enzymatic potential ($IE > 2.00$). Among the fungi tested, 13 showed multienzymatic potential, highlighting the isolates: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fumigatus* (CH24), *Aspergillus niger* (SL72), *Penicillium corylophilum* (SL33) and *Penicillium spinulosum* (SL07) that were able to produce the three types of amylases, cellulases and proteases. The microorganisms tested differed regarding the enzymatic potential even though some belonged to the same species. Among the isolates tested *Aspergillus niger* species presented the highest enzymatic indexes for amylolytic, cellulitic and proteolytic activity. These results demonstrate that these isolates belonging to the Fungi Collection of the Federal University of Maranhão have enzymatic potential and may be used in future studies, industries and so on.

Key words: Fungi, enzymatic index (IE), multienzymatic potential, biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fungos produtores de enzimas <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Aspergillus fumigatus</i> (B), <i>Aspergillus nidulans</i> (C), <i>Aspergillus niger</i> (D), <i>Aspergillus terreus</i> (E) e <i>Penicillium decumbens</i> (F), <i>Penicillium spinulosum</i> (G), <i>Penicillium citrinum</i> (H), <i>Penicillium corylophilum</i> (I), e <i>Penicillium Chysogenum</i> (J).....	33
Figura 2 - Teste qualitativo de produção da enzima amilase pelos fungos: <i>Aspergillus niger</i> (SL72).....	40
Figura 3 - Teste qualitativo de produção da enzima celulase pelos fungos: <i>A. niger</i> (CH22.) (A), A.	43
Figura 4 - Teste qualitativo de produção da enzima protease pelos fungos: <i>A. niger</i> (AR02) (A), <i>P. spinulosum</i> (SL07) (B), <i>A. fumigatus</i> (CH24) (C), <i>A. fumigatus</i> (AR04) (D), <i>P. chrysogenum</i> (CH77) (E), <i>P. corylophilum</i> (SL33) (F).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos da “Coleção de fungos da UFMA” utilizados para avaliação do potencial enzimático (amilase, celulase e protease). São Luís- MA, 2017. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 2 - Produção de amilases dos gêneros <i>Aspergillus e Penicillium</i> - Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE). São Luís - MA, 2017.	37
Tabela 3 - Produção de celulases por isolados fúngicos da Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE).	42
Tabela 4 - Produção de proteases por isolados fúngicos da Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE).	46
Tabela 5 - Isolados fúngicos dos gêneros <i>Aspergillus e Penicillium</i> que apresentaram potencial multienzimático com índices enzimáticos ($IE \geq 2,00$)	50
TABELA 6 - Comparação da produção enzimática de acordo com local de coleta.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Produção de amilase dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luis-Ma, 2017. 39
- Gráfico 2** - Produção de celulase dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luis-Ma, 2017. 45
- Gráfico 3** - Produção de protease dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luís - Ma, 2017. 49
- Gráfico 4** - Espécies fúngicas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram potencial multienzimático, com IE >2,00 produzindo amilase, celulase e protease.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

IE - Índice Enzimático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 ENZIMAS	20
3.2 ENZIMAS MICROBIANAS	22
3.3 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ENZIMAS	23
3.4 ENZIMAS DE IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL	23
3.4.1 AMILASES.....	23
3.6 OS GÊNEROS <i>ASPERGILLUS</i> E <i>PENICILLIUM</i>	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 LOCAL DE ESTUDO	30
4.2 OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	30
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	31
4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO	34
4.4.1 TESTE ENZIMÁTICO PARA AMILASE.....	34
4.4.2 TESTE ENZIMÁTICO PARA CELULASE.....	34
4.4.3 TESTE ENZIMÁTICO PARA PROTEASE.....	35
4.5 ÍNDICE ENZIMÁTICO	36
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 POTENCIAL ENZIMÁTICO.....	37
5.2 POTENCIAL MULTIENZIMÁTICO DOS FUNGOS	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
8. REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Para a manutenção da vida é necessário a realização de inúmeros processos químicos que ocorrem dentro das células e também fora delas, essas reações dependem da existência de enzimas. Estas são substâncias que atuam como catalisadores de reações químicas, ditas biocatalisadores capazes de acelerar a velocidade de reações metabólicas dos seres vivos (COELHO *et al.*, 2008). Segundo Bornscheuer (2005) as enzimas originam-se de três grandes fontes, sendo elas animais, vegetais e a partir de microrganismos. A grande maioria de enzimas utilizadas nas indústrias é de origem microbiana, isso porque elas conseguem se desenvolver em ambientes extremos, e sua produção em larga escala apresenta certa facilidade, além disso, a aplicação da engenharia genética facilita ainda mais essa produção, além de aprimorá-la (KIRK *et al.*, 2002; VAN BEILEN; LI, 2002; BORNSCHEUER, 2005).

As enzimas podem ser produzidas pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que são considerados fontes produtoras. *Aspergillus* é um dos gêneros fúngicos de maior importância atualmente, pois tem sido utilizado na fabricação de diversos produtos, sendo considerado como fonte produtora de enzimas de considerável importância econômica. As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, por sua vez tem sido amplamente estudada, e em muitas pesquisas aplicadas é constatado seu alto potencial biotecnológico (PALLU, 2010).

As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, considerando que a produção de enzima é normalmente extracelular, tornando mais fácil a sua recuperação (GERMANO *et al.*, 2003). Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, possuem a capacidade de crescer em meio de cultura de baixo custo, além disso, é o mais promissor na produção de biocompostos, uma vez que além de incrementar o teor protéico, este fungo pode excretar cerca de 20 tipos diferentes de enzimas (HERNANDEZ- MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Já as espécies de fungos do gênero *Penicillium* possuem grande potencial para a produção de proteases e outras enzimas (IKRAM- UL- HAQ MUKHTAR, 2007). Os fungos podem ser utilizados no biocontrole, micoparasitismo, e seus metabólitos secundários podem ser utilizados para avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos, sejam eles industriais, químicos, farmacológicos, biorremediadores dentre outros (PALLU, 2010).

No Brasil, a grande maioria das enzimas utilizadas nas indústrias são importadas, esse quadro poderia ser mudado, pois, como se sabe, o Brasil dispõe de uma grande biodiversidade de microrganismos que poderiam ser utilizados (CANTO; MENEZES, 1995). Diante disso, é visto que a produção de enzimas, a partir de fungos é uma alternativa para as indústrias brasileiras de biotecnologia obterem enzimas de baixo custo, pois no Brasil, além da

abundância de matéria orgânica (como bagaço de cana, resíduos agrícolas, palha de arroz, etc.) que compõe substrato de baixo custo para as fermentações, há também uma ampla diversidade biológica (CANTO; MENEZES, 1995).

No Brasil inúmeros trabalhos relacionados a seleção de fungos produtores de enzimas, tem sido realizado, como o trabalho de Guimarães *et al.* (2006), no qual 40 isolados fúngicos foram testados quanto à produção de enzimas microbianas. Entre estes, vinte e três apresentaram potencial enzimático. As espécies de *Paecilomyces* e *Aspergillus phoenicis* atingiram níveis significativos na produção de amilase.

Além da produção de enzimas, nos últimos anos os fungos têm sido testados também quanto ao seu potencial de biodegradação. Em São Luís do Maranhão, Brito (2016) pela Universidade Federal do Maranhão - UFMA verificou que consórcios fúngicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* isolados do Aterro da Ribeira em São Luís - MA, cedidos pela coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão apresentaram potencial para a biodegradação de politereftalato de etileno (pet) e polipropileno (pp). Demonstrando que as enzimas produzidas por esses consórcios podem estar relacionadas com a biodegradação dos polímeros politereftalato de etileno e polipropileno.

Diante do exposto, pode-se afirmar que, o conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em um determinado substrato, permite avaliar o seu potencial enzimático. Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades e para que seja possível avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos, sejam eles industriais, químicos, farmacológicos, biorremediadores ou outros. Portanto, diante da importância mencionada, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial de produção enzimática dos fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais foram cedidos pela coleção de fungo da Universidade Federal do Maranhão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas de potencial biotecnológico, a partir de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, cedidos pela coleção de fungos Universidade Federal do Maranhão/ NIBA/ DEPAT.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Detectar os fungos potenciais produtores das enzimas amilase, celulase e protease, dentre as cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* cedidos pela coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão;
- ✓ Selecionar os fungos que apresentarem maiores atividades nos diferentes substratos, avaliando a maior produção de amilase, celulase e protease em diferentes fontes de carbono;
- ✓ Distinguir os gêneros fúngicos que apresentam potencial multienzimático;
- ✓ Confirmar o potencial de cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* na produção de enzimas de interesse biotecnológico e sua inclusão de mais uma alternativa na utilização de fungos para a produção de moléculas de interesse industrial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ENZIMAS

Enzimas são compostos orgânicos, pertencentes ao grupo das proteínas sintetizados no interior de células vivas, podendo atuar dentro e fora delas, exercem o importante papel de processar e deteriorar os alimentos. O termo enzima foi introduzido pela primeira vez no ano de 1878 por Willian Kuhne (do grego en = dentro zyme = levedura) para denominar as substancias contidas nos extratos de levedura usados em fermentação, até essa época acreditava-se que enzimas atuavam apenas em células vivas, no entanto, em 1987 após observações feitas por Eduard Burchner foi descoberto que o extrato de levedo era capaz de fermentar o açúcar até o álcool, confirmando que as enzimas envolvidas no processo de fermentação continuavam ativas, mesmo após serem retiradas das células vivas (BOBBIO & BOBBIO, 1992; BORRACINI, 2006).

Quimicamente, as enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria são polímeros de cadeia longa, com aminoácidos sucessivamente unidos uns aos outros através de ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente (DUBOIS, 1980). Um catalisador tem a função de acelerar a velocidade de uma reação, além de apresentar grande especificidade por seus substratos. A velocidade das reações enzimáticas pode sofrer alterações devido a diversos fatores, entres estes podemos citar temperatura, pH, concentração de enzima ou substrato (LEHNINGER, 2006).

As enzimas recebem classificação a partir das reações que elas catalisam, geralmente o nome de uma enzima compõe-se de duas partes, a primeira é o nome do substrato e a segunda termina com “ase”, o qual indica a natureza do processo. Por exemplo, as enzimas responsáveis por converter amilose e amilopectina (amido) em carboidratos simples, recebem o nome de amilases e as enzimas capazes de degradar proteínas, são chamadas de proteases (DUBOIS, 1980).

Uma considerável quantidade das proteínas sintetizadas no interior das células são enzimas, ditas proteínas intracelulares, ou citoplasmáticas, estas somente podem ser obtidas e avaliadas a partir do rompimento da célula, no entanto, também apresentam a capacidade de produzir enzimas que são excretadas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, onde podem ser mais facilmente isoladas e avaliadas. A grande maioria das enzimas produzidas em escala industrial até hoje são extracelulares, isso porque seu isolamento em meios ou caldos nutritivos, em geral, é mais simples, apesar de se encontrem sob

forma muito diluída nestes meios, o que pode dificultar seu isolamento tornando-o muito dispendioso. No entanto, a maioria das enzimas naturais é intracelular, por serem continuamente sintetizadas metabolicamente (MOREIRA, 2003).

O mecanismo celular dos animais, vegetais e dos microrganismos depende das enzimas, estas apresentam fonte primária nos tecidos animais (glândulas, principalmente), tecidos vegetais (sementes, frutas, exsudações) e culturas de microrganismos, seja em cultivo total, ou na extração de enzimas do meio de cultura de bactérias, fungos e leveduras. Em consequência disso, a maioria das enzimas produzidas industrialmente possuem aplicações na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais (principalmente alimentos), na fabricação de medicamentos (vitaminas e hormônios) e ainda na produção de derivados de matérias-primas animais e vegetais. Em todas as aplicações citadas anteriormente, observa-se que ocorrem imitações tecnológicas do que é feito na natureza, para suprir a necessidade e a vontade do homem (GOMES *et al.*, 2004).

A fabricação de enzimas de origem animal, vegetal e microbiana tem crescido consideravelmente nos últimos anos, as enzimas advindas de fonte microbiana são as que mais despertam interesse comercial devido a sua grande utilização na indústria alimentícia, entre estas enzimas destacam-se as proteases, as amilases e as pectinases, utilizadas em processos industriais, e as amiloglucosidases termoestáveis, o uso dessas enzimas objetivam o aumento da qualidade e produtividade dos processos de coloração ou redução da viscosidade dos produtos. A chegada da engenharia de proteínas trouxe consigo aplicações significativas das enzimas de interesse industrial, tais como as amilases e glucose-isomerase, usadas no processamento do amido e as proteases e lipases, aplicadas em indústria de detergentes (SOUZA e SOMMER, 2002).

Atualmente a tecnologia enzimática é considerada um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam, além de baixo impacto ambiental, menor consumo energético, isso porque as enzimas são biodegradáveis e altamente específicas, o que reduz os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem substituir produtos químicos, como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que prejudicam o meio ambiente e causam degradação de materiais (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

A maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida a partir de microrganismos, através de processos fermentativos (RAO *et al.*, 1998). Depois dos antibióticos, são as enzimas o mais importante grupo de produtos biológicos usados pela humanidade.

Múltiplos processos industriais, principalmente os voltados para a área de biotecnologia de alimentos, ambiental e industrial, fazem uso das enzimas, em seus vários estágios (PANDEY *et al.*, 2000).

3.2 ENZIMAS MICROBIANAS

Ha milhares de anos, as enzimas têm sido exploradas de forma prática pelo homem (SHARMA *et al.*, 2001). Seja diretamente a partir de manipulações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal; ou de forma indireta, por meio do aproveitamento da atuação enzimática no crescimento microbiano sobre determinados substratos. Usar e produzir as enzimas microbianas originárias das bactérias e fungos (filamentosos ou leveduras) que em sua maioria são extracelulares, da classe das hidrolases, se constitui a maior esfera biotecnológica da indústria. (OLSON *et al.*, 1994).

Inúmeras variedades de microrganismos já foram isolados da natureza e usados industrialmente (como o *Saccharomyces cerevisiae*), no entanto, a maioria deles apresentam grande potencial enzimático, que ainda precisa ser explorado. Se estima que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias tenham sido identificados e avaliados como produtores de enzimas de proveito industrial e, ainda que um número relevante de linhagens tenha sido melhorado geneticamente em laboratório, é muito provável que a natureza abrigue linhagens com potencial enzimático muito maior na forma selvagem (BRAVO *et al.*, 2000).

Entre os produtos mais importantes obtidos para a necessidade humana, estão as enzimas. Estas, provenientes de microrganismos, como bactérias, leveduras e, principalmente fungos filamentosos, utilizados no setor industrial, resultam, atualmente, em uma indústria extremamente diversificada e com altos rendimentos econômicos. O processo de fermentação, classicamente reconhecido, destaca-se pela produção de bebidas alcoólicas e álcool etílico, etanol combustível, ácidos orgânicos, laticínios e fármacos, incluindo os antibióticos (SOARES *et al.*, 2010).

Para Rolle (1998) apud Fernandes (2009), os microrganismos são considerados fonte enzimática industrial primária, estima-se que 35% são de origem bacteriana, 50% de fungos filamentosos e leveduras, e somente 15% de animais ou plantas. Frequentemente as enzimas microbianas são mais utilizadas que as enzimas obtidas a partir de animais e plantas, isso porque elas apresentam expressiva variedade de atividade catalítica, produção não dependente de flutuações sazonais, maior rendimento, manipulação genética simples, e acelerado crescimento em meio de cultura. Além disso, são consideradas mais estáveis que as enzimas de origem animal

e vegetal, sendo também mais seguras e mais simples de serem trabalhadas (RAO *et al.*, 1998; HASAN *et al.*, 2006).

Tendo em vista o contexto atual, a seleção de novos microrganismos capazes de produzir enzimas é considerada a maior barreira na comercialização de novas enzimas. Contudo, o melhoramento das condições de cultivo, associada a seleção de linhagens de microrganismos adequada, podem proporcionar o melhoramento da produção enzimática e a redução custos (CARVALHO, 2007).

3.3 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ENZIMAS

A biotecnologia é o conjunto de conhecimentos associados a qualquer aplicação tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados em técnicas que são utilizadas em processamentos industriais. A partir do desenvolvimento da biotecnologia foi possível utilizar enzimas obtidas a partir de fontes animais, vegetais e de microrganismos, esta última, apresenta maior interesse biotecnológico, por ser utilizada na produção de detergentes, processamento de alimentos, na indústria farmacêutica e têxtil, biologia molecular e ainda terapia médica (COELHO; NASCIMENTO, 2008).

Além dos fatores citados acima, as enzimas apresentam vantagens como: maior facilidade de produção em larga escala, menor custo de produção, características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas a fisiologia e habitat do microrganismo produtor, como por exemplo, organismos termófilos capazes de produzir enzimas termo resistentes, possibilidade de melhoramento genético além de representarem recurso renovável (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.4 ENZIMAS DE IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL

3.4.1 AMILASES

As enzimas apresentam uma característica marcante, que é a sua especificidade, cada substrato apresenta uma enzima específica. O amido, por exemplo, é hidrolisado pela amilase, estas são muito abundantes na natureza, podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos e geralmente são obtidas a partir de cereais, bactérias ou fungos (DUBOIS, 1980). Segundo Gupta *et al* (2003) e Pandey *et al* (2005) as amilases quebram moléculas de amido liberando dessa forma diversos produtos, entre estes, pequenos polímeros constituídos de unidades de glicose e dextrinas.

Estas enzimas, biotecnologicamente, possuem grande importância tendo aplicações nas indústrias de couro, papel, têxtil, de detergentes, química, farmacêutica, alimentícia, de cereais, pães, sacarificação do amido, liquefação e ainda em indústrias de produção de ração animal e de bebidas como cervejas e bebidas destiladas. Apesar das amilases serem provenientes de diversas fontes, os microrganismos são a fonte de maior demanda industrial. Atualmente quantidades significativas de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e possuem aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias responsáveis por esse processamento (MORAES, 2004).

O amido possui ampla distribuição na natureza, seja em tubérculos ou raízes como de mandioca e batata, seja em sementes de cereais como arroz, milho e trigo. Este, e o componente de reserva mais importante na nutrição de todas as plantas superiores (MORAES, 2004). O amido é um carboidrato composto principalmente por fragmentos de glicose unidas umas às outras, a partir de ligações glicosídicas, sendo estável em pH alcalino. Dois tipos de polissacarídeos constituem a molécula de amido: amilose e amilopectina, estes diferenciam-se por diversas propriedades físicas, como o tamanho molecular e a capacidade de ser solúvel em água (BOBBIO e BOBBIO, 1992). Segundo CONN e STUMPF (1975), a amilose é composta por unidades de D-glucose unidas linearmente por ligações α -1,4. A amilopectina por sua vez é um polissacarídeo ramificado; na sua molécula, cadeias mais curtas de glucose unidas por ligações α -1,4 são também unidas entre si por ligações α -1,6.

Conforme conceituadas por Reed (1975), as amilases podem ser divididas em três categorias: as α -amilases, as quais catalisam as ligações no interior da molécula de amido (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos, dentre essas, as α -amilases são as mais importantes, a ação combinada dessa enzima com outras enzimas amilolíticas é fundamental para a completa hidrólise do amido.

3.4.2 CELULASES

A celulose é um biopolímero renovável, considerado o mais abundante do globo terrestre e o componente mais importante da parede celular das plantas, possui importância mundial como matéria-prima industrial e fonte de energia renovável (JOSHI; MANSFIELD, 2007). Uma grande quantidade de fungos e algumas bactérias apresentam a capacidade de

degradar celulose, essa capacidade é essencial para seu crescimento e completa produção de celulases (ENARI; MARKKANEN, 1977).

A composição da celulose é simples, consistindo de um polímero linear formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β -1,4 com elevado grau de polimerização e peso molecular. As cadeias de celulose estão dispostas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias (IGARASHI *et al.*, 2007). A microfibrilas possuem regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo. Estas regiões são ditas regiões cristalinas. A celulose possui também regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência à hidrólise ácida ou enzimática (BON *et al.*, 2008).

Na natureza a celulose é digerida exclusivamente por microrganismos distribuídos entre o grupo das bactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é realizada pela atuação de um complexo enzimático, as celulases. Esse complexo celulolítico é formado por celobiohidrolases (E.C.3.2.1.91), endo- β -1,4-glicanases (E.C.3.2.1.4), e β -glicosidades (E.C.3.2.1.21), que trabalham em sinergismo (HAICHAR *et al.*, 2007).

Os fungos, em sua grande maioria, apresentam uma vasta produção de celulases, produzindo enzima-padrão, como celulases de *Thricoderma reesei*, produzidas pela SIGMA-ALDRICH, que atualmente têm sido analisadas, principalmente, quanto ao seu potencial como aditivos na indústria têxtil, indústria de detergentes, e na bioconversão de biomassa agrícola em produtos de elevado custo no mercado comercial (COELHO; NASCIMENTO, 2008).

As celulases têm ainda grande importância econômica, sendo aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais, como aplicações nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica. São usadas também na fabricação de glicose, proteínas unicelulares e na aquisição de produtos químicos como etanol (WISEMAN, 1985).

3.4.3 PROTEASES

Proteínas são consideradas também polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (ENZIMAS, 2009). As proteases são enzimas hidrolíticas responsáveis por clivar ligações peptídicas em proteínas. Além disso, desempenham papel importante no metabolismo de quase todos os organismos (plantas, animais, fungos, bactérias e vírus) (VERMELHO, 2008; RAO *et al.*, 1998).

Encontradas em variadas fontes, as proteases recebem classificação segundo a sua origem (animal, vegetal e microbiana) e a natureza do seu sítio catalítico. As proteases advindas de fonte animal são representadas pelas pancreatinas, tripsinas, quimotripsinas, pepsinas e reninas, as provenientes de fonte vegetal, por sua vez, são representadas pelas bromelinas, papaínas, ficinas e as queratinases. As proteases obtidas a partir de plantas e animais não são capazes de atender toda à demanda mundial de enzimas, isso tem provocado nos últimos anos, uma busca cada vez maior por proteases de origem microbiana (RAO *et al.*, 1998).

O interesse por proteases de origem microbiana surgiu a partir da sua atuação sobre diversos substratos específicos, que permitem que elas sejam utilizadas em variadas áreas da bioquímica e da biotecnologia (BARATA *et al.*, 2002). Segundo Nishiwaki, Asano e Ohyama (2009) microrganismos produzem maiores quantidades de enzimas proteolíticas se estiverem em meio de cultura rico em nutrientes ou substratos onde esses nutrientes estejam facilmente disponíveis. Isto causa a diminuição da repressão catabólica e ativa a síntese e a secreção de exoenzimas.

Pela ótica tecnológica, as proteases são classificadas satisfatoriamente em exopeptidases e endopeptidases, sendo as endopeptidases as mais empregadas em processamento de alimentos, e em alguns casos sua ação é complementada com exopeptidases (ENZIMAS, 2009). As proteases configuram um dos três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por grande parte da movimentação financeira neste setor. São empregadas na produção de medicamentos, na indústria de detergentes, na indústria farmacêutica e alimentícia, em processos de biorremediação e ainda na recuperação de prata em filme de raio X (DAMHUS *et al.*, 2008; RAO *et al.*, 1998).

3.5 FUNGOS

Os fungos constituem um grupo microbiano cosmopolita bastante diversificado, com uma ampla variedade de morfologias, metabolismo e habitats. São seres aclorofilados, eucariontes, e heterotróficos, em sua maior parte filamentosos que adquirem seu alimento por absorção. Estes organismos podem ser micro ou macroscópicos propagando-se por intermédio de esporos, e possuem como fonte de reserva, o glicogênio (GUERRERO; SILVEIRA, 2003).

Esses microrganismos são de extrema importância para o funcionamento dos ecossistemas, no entanto, embora estejam entre os organismos mais importantes do mundo, ainda são limitadas ou incompletas as informações a respeito da maioria das espécies (MUELLER; SCHMIT, 2007). Levantamentos estimativos da década de 1990 propuseram que apenas 5% da

diversidade de fungos seria conhecida, com aproximadamente 72.000 espécies descritas na literatura e 1.430.000 espécies permanecendo sem descrição. Se esta estimativa estiver correta, os fungos constituem um dos grupos microbianos com maior número de espécies na natureza, aproximando-se da casa de 1,5 milhões de espécies estimadas (HAWKSWORTH, 2001).

Tendo em vista essa grande diversidade, impactos positivos e negativos são conferidos aos fungos, sendo que os primeiros apontam os fungos como espécies que podem servir de fonte alimentícia para o homem, sendo aproveitados por sua atividade metabólica na geração de enzimas com potencial de degradação, ou na síntese útil de seus metabolitos. Os impactos negativos centralizam-se nas espécies que provocam biodeteriorização (podridão ou mofos), doenças em plantas (fitopatogênicos), ou que atuam como agentes causadores de doenças no homem (BENNETT, 1998).

A atenção especial dada aos fungos está relacionada a sua capacidade de produzir metabolitos e enzimas, incluindo pigmentos, antibióticos, ácidos orgânicos e outros aditivos alimentícios (PUNT *et al.*, 2002). Além disso, eles são importantes por sua aplicação na indústria de alimentos sendo utilizados na produção de vinho, destilados, cerveja; na agricultura atuando como agentes de controle biológico de pragas; na panificação; entre muitos outros produtos úteis, que ainda não foram explorados pelo homem (MELO; AZEVEDO, 1998).

Os fungos filamentosos têm a capacidade de secretar importantes enzimas no meio ambientes, estas podem degradar produtos como amido e celulose, no entanto, apenas 2% dos da demanda mundial de microrganismos tem sido testado como fonte de enzimas (HASAN *et al.*, 2006). Entre estes microrganismos filamentosos capazes de secretar enzimas no meio ambiente e degradar produtos, destacam-se os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que tem sido amplamente empregados em processos biotecnológicos, por produzirem enzimas de importância significativa nas mais diversas áreas (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Portanto, os fungos constituem um grupo de microrganismos de extrema importância, pois são essenciais no funcionamento de ecossistemas naturais, além da possibilidade de sua exploração econômica (WANG; HYDE; SOYTONG, 2008).

3.6 OS GÊNEROS *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM*

O Filo Ascomycota apresenta 46 ordens e aproximadamente 6.000 gêneros, entre eles encontram-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (DIAZ-GUERRA, 2000). Até o ano de 2011, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e outros, estavam incluídos dentro da família Trichocomaceae. Todavia, com a mudança do novo Código Internacional de Nomenclatura para

algas, fungos e plantas, esta família, foi subdividida em: Aspergillaceae (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Hamigera*, *Leiothecium*, *Monascus*, *Penicillioptis*, *Phialomyces*, *Sclerocleista*, *Warcupiella* e *Xeromyces*), Trichocomaceae (*Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces*, *Thermomyces* e *Trichocoma*) e Thermoascaceae (*Byssochlamys* / *Paecilomyces* e *Thermoascus*) (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011; VISAGIE *et al.*, 2014).

A família Aspergillaceae esta compreendida na ordem Eurotiales, classe Eurotiomycetes e filo Ascomycota. Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* são considerados os gêneros economicamente mais importantes desse filo, sendo conhecidos pelos impactos positivos e negativos que causam sobre as atividades humanas. Algumas espécies pertencentes a família Aspergillaceae possuem propriedades fisiológicas bastante diversas como, por exemplo: crescem em baixa atividade de água, em baixas ou altas temperaturas, além de níveis de baixa acidez e oxigênio (HOUBRAKEN *et al.*, 2011). A ampla distribuição desses dois gêneros permite que estes sejam sempre encontrados em solos no mundo todo, sendo caracterizados como decompositores de matéria orgânica e bons produtores de enzimas. (COUTINHO *et al.*, 2012).

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente descrito em 1729 por Micheli, em seguida os autores Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero, desde então, as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* se tornaram cada vez mais conhecidas devido as suas características benéficas, e por vezes prejudiciais ao homem e, este gênero, passou a ser amplamente estudado. Em 1965 Rapper e Fennel fizeram uma descrição completa sobre esse gênero, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades (BENNETT, 2010). A última revisão de *Aspergillus* feita por Samson e colaboradores (2014), sugere que este gênero apresenta quatro subgêneros, dezenove seções e 339 espécies. Apesar de já ter sido bastante estudada, a sistemática desse gênero constantemente sofre mudanças, devido aos recentes estudos de filogenia molecular e quimiotaxonomicos (SAMSON *et al.*, 2014).

Por ser bastante diverso e amplamente distribuído na natureza, este gênero é considerado cosmopolita, podendo ser comumente isolados de plantas e do solo, além disso, apresenta maior abundância nas regiões de climas tropicais e subtropicais. As espécies desse gênero, em geral, são reconhecidas por serem patógenas oportunistas, por deteriorar alimentos (saprófitos), e produzir micotoxinas (KLICH, 2002a; 1997).

Quanto a sua morfologia, esse gênero apresenta uma extensa variação na coloração de suas colônias, sendo então esta, a principal característica macroscópica utilizada para sua classificação, essa coloração varia entre tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (VARGA *et al.*, 2004). As espécies desse gênero possuem uma hifa ereta proveniente da célula

pé denominada conidióforo, o qual se dilata originando uma forma arredondada ou elíptica, denominada vesícula. Na área fértil da vesícula são formadas células conidiogênicas, métulas e fiálides responsáveis por produzir cadeias longas de esporos mitóticos, denominados conídios. Todo este sistema é denominado aspergilli, o qual pode ser bisseriado apresentando métulas e fiálides, ou uni seriado quando possui apenas fiálides provenientes da vesícula (BENNET, 2010).

Quanto a importância econômica, o gênero *Aspergillus* é o que possui mais destaque, muitas espécies são utilizadas na biotecnologia para a fabricação de uma variedade de metabolitos, tais como: ácidos orgânicos, antibióticos, medicamentos, e enzimas como agentes em fermentações (SAMSON *et al.*, 2014).

O gênero *Penicillium*, foi descrito pela primeira vez por Heinrich Friedrich Link em 1809, as espécies incluídas neste gênero são amplamente distribuídas por todo o mundo, podendo ser encontradas no ar, solo, vegetação e até em ambientes aquáticos. A maioria das espécies do gênero *Penicillium* e saprófita estando presentes no solo, em vegetais em decomposição, em sementes e em grãos (KNOB, 2009). Uma grande parte destas espécies são conhecidas por sua importância farmacológica, por produzirem uma variedade de metabolitos secundários bioativos. Apesar de sua importância ecológica e farmacológica, algumas espécies podem provocar doenças oportunistas em humanos, tais como, infecções no sistema nervoso central em pacientes imunossuprimidos (NORITOMI *et al.*, 2005). A taxonomia e classificação desse gênero são feitas a partir de critérios morfológicos e bioquímicos (LARSEN, 2000).

O nome *Penicillium* é derivado da palavra *Penicillus*, que significa "pequeno pincel". Diversos trabalhos surgiram no século 19 sobre esse gênero, mas foi Dierckx (1901) o primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundária, incluindo os subgêneros *Aspergilloides*, *Eupenicillium* e *Biverticillium* (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011). A monografia "The *Penicillia*" escrita por Thom (1930) é considerada por muitos estudiosos uma das mais importantes contribuições para o conhecimento e classificação desse gênero. Nela, o autor classificou de forma ordenada (a partir de características da colônia e ramificações dos conidióforos), *Penicillium* em quatro subgêneros, 12 seções e 18 subseções (PITT, 1979). Este gênero compreende mais de 350 espécies descritas, boa parte delas habitam comumente tanto o solo, como produtos agrícolas, industrializados e alimentos em deterioração (FRISVAD; SAMSON, 2004; VISAGIE *et al.*, 2014).

A morfologia do gênero *Penicillium* caracteriza-se pela produção de cadeias longas de conídios, a partir de verticilos das fiálides. Estas fiálides apresentam pescoço curto, paredes lisas e, geralmente, sua forma pode ser utilizada na identificação de espécies, podendo apresentar

formato de garrafa, ampulhiforme (formato de ampulheta) e aciculado (formato de agulha). As fiálides podem ter sua origem diretamente de uma estipe (haste ereta de hifa), caracterizando penicilli monoverticilado; sobre métulas, caracterizando penicilli biverticilado; ou ainda sobre métulas, que por sua vez, originam-se de um ou mais ramos, caracterizando penicilli ter ou poliverticilado (PITT, 2000).

Quanto a importância econômica, numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular, as espécies mais conhecidas nesse aspecto são *Penicillium notatum*, produtor do antibiótico— penicilina. Na indústria alimentícia destacam-se o *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, essas estão associadas na produção de determinados tipos de queijos (CHAVEZ *et al.*, 2006).

Desde a descoberta da penicilina, espécies de *Penicillium* têm sido avaliadas, e com sucesso, quanto a produção de diversificados tipos de metabolitos secundários ativos, incluindo substâncias antibacterianas (PETIT *et al.*, 2009), antifúngicas (NICOLETTI *et al.*, 2007), imunossuppressores, corantes (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016;) e também micotoxinas potentes (FRISVAD; SAMSON, 2004), e muitas dessas espécies, são consideradas fontes de novos produtos inovadores e fármacos, que foram isoladas de solo. Além disso, produzem diversas enzimas de proveito industrial, e algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole e mico parasitismo (PALLU, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia (Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada)– NIBA /DEPAT da Universidade Federal do Maranhão.

4.2 OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram obtidos da Coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão - UFMA. Os vinte fungos utilizados no presente estudo foram obtidos de fontes diferentes: ar, chorume e solo. Suas especificações encontram-se na Tabela 1. Foram utilizados com o objetivo de verificar a produção das enzimas amilase, celulase e protease. Para trabalhar com culturas jovens, foram efetuados repiques a partir dos fungos cedidos pela Coleção de Fungos da UFMA.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Tabela 1 - Fungos da “Coleção de fungos da UFMA” utilizados para avaliação do potencial enzimático (amilase, celulase e protease). São Luís- MA, 2017.

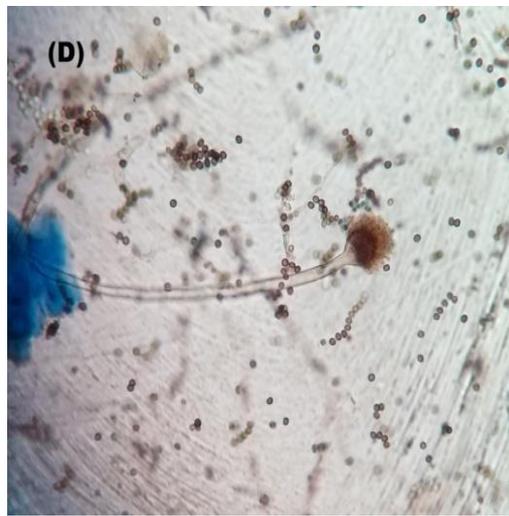
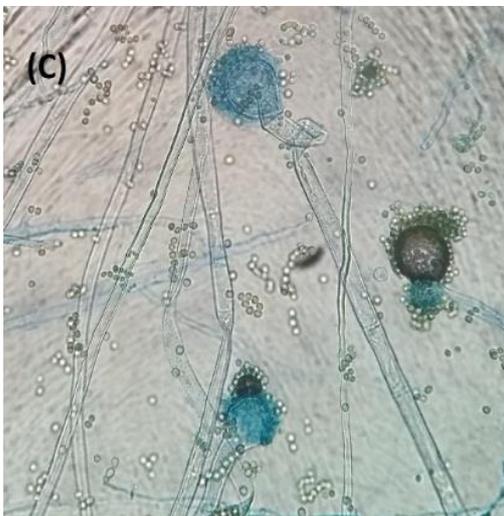
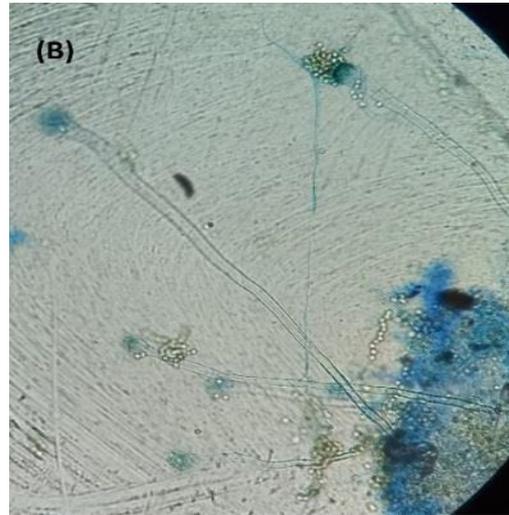
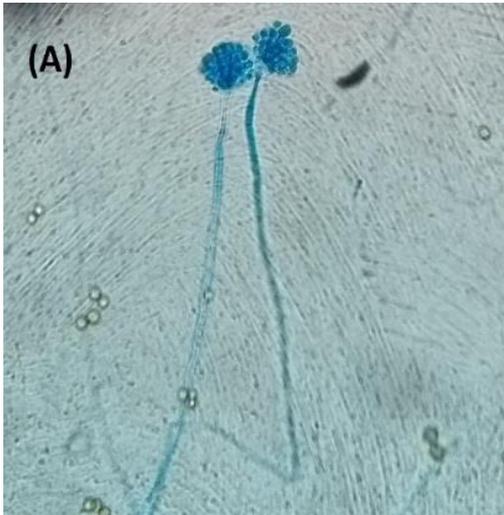
ISOLADO	GÊNERO	ORIGEM
(UFMA/AR 05)	<i>Aspergillus flavus</i> (AR)	Coleção de fungos da UFMA (AR)
(UFMA/CH 25)	<i>Aspergillus flavus</i> (CHORUME)	Coleção de fungos da UFMA (CHORUME)
(UFMA/SL 75)	<i>Aspergillus flavus</i> (SOLO)	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA / AR 04)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (AR)	Coleção de fungos da UFMA (AR)
(UFMA/CH 24)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (CHORUME)	Coleção de fungos da UFMA (CHORUME)
(UFMA/SL 74)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (SOLO)	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA / AR 03)	<i>Aspergillus nidulans</i> (AR)	Coleção de fungos da UFMA (AR)
(UFMA/CH 23)	<i>Aspergillus nidulans</i> (CHORUME)	Coleção de fungos da UFMA (CHORUME)
(UFMA/SL 73)	<i>Aspergillus nidulans</i> (SOLO)	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA / AR 02)	<i>Aspergillus niger</i> (AR)	Coleção de fungos da UFMA (AR)
(UFMA/CH 22)	<i>Aspergillus niger</i> (CHORUME)	Coleção de fungos da UFMA (CHORUME)
(UFMA/SL 72)	<i>Aspergillus niger</i> (SOLO)	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA / AR 01)	<i>Aspergillus terreus</i> (AR)	Coleção de fungos da UFMA (AR)
(UFMA/CH 21)	<i>Aspergillus terreus</i> (CHORUME)	Coleção de fungos da UFMA (CHORUME)
(UFMA/SL 71)	<i>Aspergillus terreus</i> (SOLO)	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA/SL 12)	<i>Penicillium citrinum</i>	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA/SL 33)	<i>Penicillium corylophilum</i>	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA/SL 77)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA/SL 05)	<i>Penicillium decumbens</i>	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)
(UFMA/SL 07)	<i>Penicillium spinulosum</i>	Coleção de fungos da UFMA (SOLO)

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho.

Para a confirmação da identidade dos fungos foi realizada a identificação morfológica dos novos repiques dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, foram analisadas as características macro e microscópicas das colônias de acordo com literaturas específicas. As espécies do gênero *Aspergillus* foram identificadas de acordo com Christensen (1982) e Klich (2002) por sua vez, as espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* foram identificadas de acordo com Pitt e Hocking (1997), Pitt (1988) e Samson e Frisvad (2004).

Um total de 20 fungos foram identificados correspondendo a 2 gêneros (*Aspergillus* e *Penicillium*) e 10 espécies (Figura 1). As espécies identificadas estão descritas na Tabela 1. Após a purificação e identificação as colônias foram mantidas em tubo de ensaio, contendo o meio de cultura MA2% (extrato de malte 2%, ágar 2% e 1L de água destilada) com o objetivo de manter a viabilidade e pureza das espécies fúngicas identificadas. De acordo com a literatura o

meio ágar malte é considerado o melhor meio para verificação da produção enzimática. Após esse processo foram realizados testes para a determinação das atividades enzimáticas.



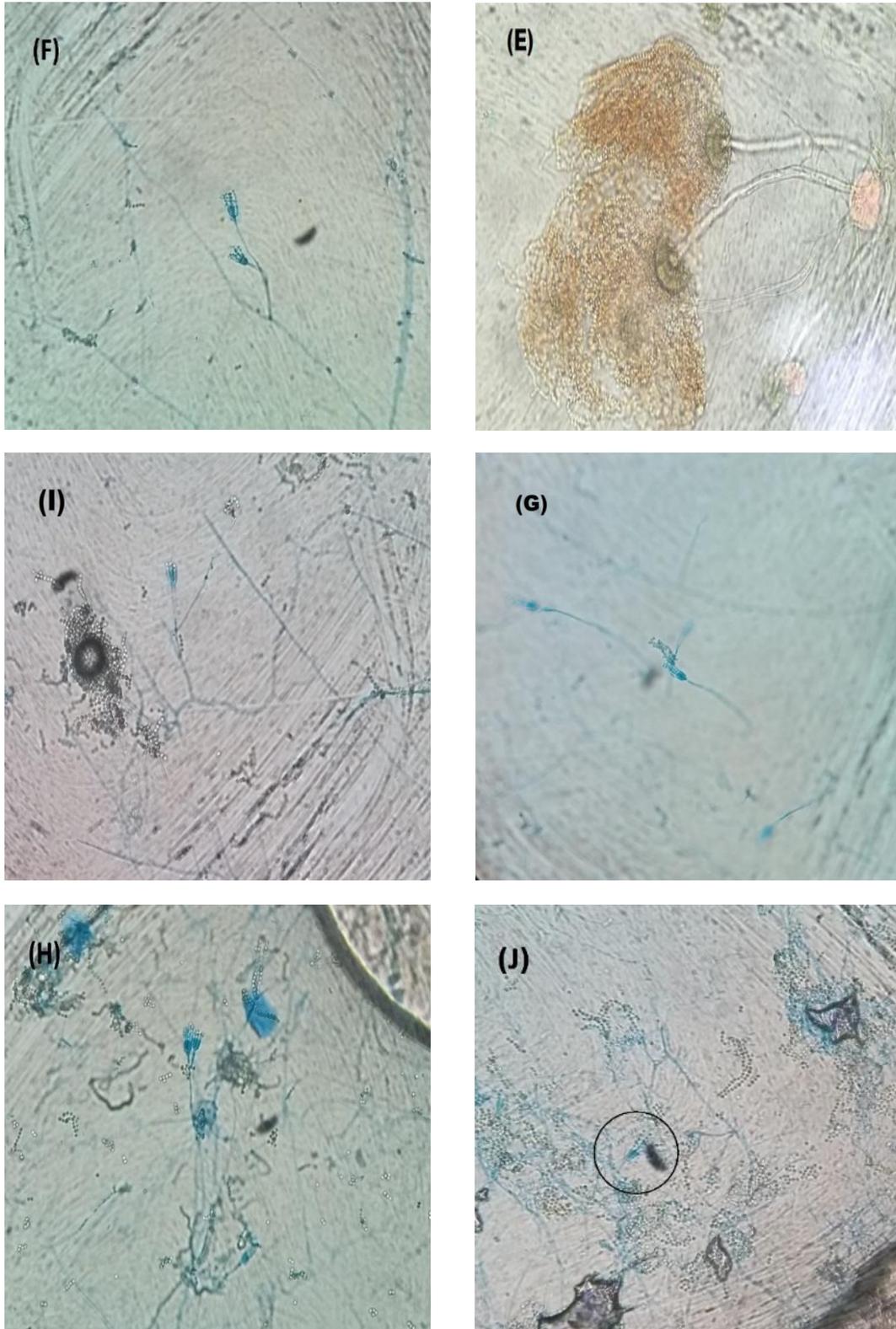


Figura 1 - Fungos produtores de enzimas *Aspergillus flavus* (A), *Aspergillus fumigatus* (B), *Aspergillus nidulans* (C), *Aspergillus niger* (D), *Aspergillus terreus* (E) e *Penicillium decumbens* (F), *Penicillium spinulosum* (G), *Penicillium citrinum* (H), *Penicillium corylophilum* (I), e *Penicillium Chysogenum* (J). Aumento de 400x.

Fonte: Foto produzida por COSTA, J. B.– Autora deste trabalho.

4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO

Para determinar o potencial enzimático de cada isolado foi utilizado o método qualitativo, que consiste em cultivar os fungos em meios específicos para a produção de cada enzima e avaliar o halo produzido.

Para a verificação da produção enzimática, os isolados fúngicos foram inicialmente cultivados em meio de cultura MA 2%, por sete dias. Posterior ao crescimento, os fungos foram repicados para o centro das placas contendo os meios específicos para cada enzima. O ensaio foi realizado em triplicata. As colônias contidas em placas de Petri foram incubadas a 25°C, em câmara de germinação tipo BOD, com foto período de 12 horas por um período de 3 – 5 dias, antes da revelação, variando de acordo com o crescimento de cada fungo.

A atividade enzimática das amilases, celulasas e proteases foi determinada a partir da metodologia descrita por Dingle, Teid e Solomons (1953) com modificações.

4.4.1 TESTE ENZIMÁTICO PARA AMILASE

Para determinar a atividade da amilase, foi utilizado o meio de cultura Ágar- Amido composto por:

Ágar – – – – – 4%
Amido – – – – – 2%
Tampão Citrato – fosfato 0.1 M pH 5.0 – – – – – 500 mL

Em um recipiente de vidro, o ágar e o amido foram dissolvidos e homogeneizados em 500 mL de tampão citrato-fosfato, pH 5.0. Posterior a esse processo, o meio de cultura foi colocado em erlenmeyer e esterilizado, em autoclave, a 120°C durante 15 minutos.

Para constatação da produção de enzimas, o iodo 0,1M foi utilizado como solução reveladora. Esta foi aplicada sobre as placas e logo após 10 minutos, os resultados positivos das reações enzimáticas foram observados a partir da formação de um halo translúcido ao redor da colônia.

4.4.2 TESTE ENZIMÁTICO PARA CELULASE

Para determinar a atividade da celulase, foi utilizado o meio de cultura Ágar Carboximetilcelulose (CMC) composto por:

Ágar	-----	4%
Carboximetilcelulose	-----	2,0
Tampão Acetato de Sódio 0.1M pH 5.0	-----	500 mL

Em um recipiente de vidro, a carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de Sódio 0.1M pH 5.0 em agitador magnético. Após esse procedimento de dissolução de CMC, o restante do tampão (300 mL) e o ágar foram adicionados. O meio de cultura foi então homogeneizado e esterilizado a 120°C durante 15 minutos.

Para constatar a atividade celulolítica, o vermelho congo 0,1% foi utilizada como solução reveladora. Os resultados positivos das reações enzimáticas foram observados a partir da formação de um halo amarelo-claro, bem mais fraco que o meio de cultura vermelho após de adicionada solução reveladora.

4.4.3 TESTE ENZIMÁTICO PARA PROTEASE

Para constatação da atividade proteolítica foi utilizado o meio Ágar-Gelatina-Leite, composto por:

Ágar	-----	2,5 %
Gelatina	-----	1 %
Leite desnatado	-----	1%
Tampão citrato – fosfato 0.1 M pH 5.0	-----	400 mL

Para a produção desse meio o procedimento foi feito em etapas:

Etapa 1: O ágar foi dissolvido e homogeneizado em 400 mL de tampão citrato fosfato 0.1 M, pH 5,0, e esterilizado a 120°C, durante 15 minutos.

Etapa 2: Solução de leite desnatado a 10 %: 5 gramas de leite desnatado foram dissolvidas em 50 mL de água destilada. A esterilização dessa solução foi feita sob vapor fluente (autoclave com válvulas abertas), por 30 minutos, durante dois dias consecutivos.

Etapa 3: Solução de gelatina a 10 %: 5 gramas de gelatina foram adicionados em 50 mL de solução tampão citrato-fosfato e deixado em repouso durante 3 minutos, posteriormente a solução foi homogeneizada e aquecida em banho-maria para a dissolução completa da gelatina.

Após esse processo a solução foi esterilizada a 120°C, durante 15 minutos.

O meio Ágar-Gelatina-Leite foi obtido a partir das soluções esterilizadas de ágar, gelatina e leite misturadas com cuidados assépticos. O volume final do meio Ágar Gelatina- Leite que foi obtido após o procedimento, foi de 500 mL.

A atividade proteolítica foi verificada pela alteração química no meio de cultura sólido. Não foi necessária a utilização de solução reveladora, pois, os resultados positivos foram observados a partir da formação de um halo translúcido.

4.5 ÍNDICE ENZIMÁTICO

O potencial enzimático foi dado como índice enzimático (IE), obtido a partir da relação do diâmetro médio do halo de degradação pelo diâmetro médio da colônia (medidos com régua) proposto por Hankin e Anagnostakis, (1975); conforme a fórmula abaixo:

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

De acordo com Lealem e Gashe (1994) para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, esse microrganismo deve apresentar um índice enzimático maior ou igual a 2,00. Segundo Oliveira *et al.*, (2006), os isolados fúngicos que apresentam os maiores IE nos meios de cultura, consequentemente são os que apresentam maior atividade enzimática extracelular.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da produção de enzimas o experimento foi realizado em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Vinte tratamentos foram utilizados para cada teste enzimático (amilase, celulase e protease). Os testes foram feitos em triplicata, ou seja, com três repetições, por isolado. Após a obtenção dos dados, estes foram submetidos à análise de variância (ANAVA), sendo analisados através do programa estatístico ASSISTAT versão 7.7, 2014 (SILVA,2014). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

O Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), é considerado o delineamento mais simples dentro da estatística. Nele as unidades experimentais são destinadas a cada tratamento de uma forma inteiramente casual (sorteio).

A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos. Visa, fundamentalmente, verificar se existe uma entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente (MILONE, 2009). Após a verificação da existência de, pelo menos, uma média diferente das demais, podem ser realizados alguns testes de comparação de médias que demonstram quais médias são consideradas diferentes e qual melhor tratamento. Entre esses testes está o Teste Scott Knott, baseado na amplitude total estudentizada, sendo utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos. É um teste que possibilita e facilita a aplicação do algoritmo de agrupamento nos principais delineamentos (Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC), Delineamento em Blocos Casualizados – DBC, Delineamento em Quadrado Latino – DQL e esquemas experimentais (COSTA NETO, 1977).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 POTENCIAL ENZIMÁTICO

O mercado mundial de enzimas tem crescido nos últimos anos, e a grande maioria destas é produzida por microrganismos que foram selecionados da natureza (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001). Para produzir enzimas microbianas de interesse industrial, os microrganismos precisam ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo (FELLOWS, 1994). Para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, Lealem e Gashe (1994) indicaram um índice enzimático maior ou igual a 2,0.

Tendo em vista com esse contexto, 20 isolados fúngicos filamentosos de dois gêneros (*Aspergillus* e *Penicillium*) foram avaliados em condições laboratoriais como potenciais produtores de amilases, celulases e proteases. Para avaliar o potencial de produção de amilases foram testados 20 isolados de fungos, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Produção de amilases pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* - Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE). São Luís - MA, 2017.

ISOLADO	ESPÉCIES	IE	MÉDIA
(UFMA / SL72)	<i>Aspergillus niger</i>	16.83	a
(UFMA / SL74)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	15.02	a
(UFMA / AR04)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	13.95	a
(UFMA / AR05)	<i>Aspergillus flavus</i>	12,00	b
(UFMA / SL75)	<i>Aspergillus flavus</i>	10.75	b
(UFMA / CH25)	<i>Aspergillus flavus</i>	9.33	b
(UFMA / AR02)	<i>Aspergillus niger</i>	9.10	b
(UFMA / SL07)	<i>Penicillium spinulosum</i>	7.38	c
(UFMA / CH24)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	7.20	c
(UFMA / SL05)	<i>Penicillium decumbens</i>	7.11	c
(UFMA / CH22)	<i>Aspergillus niger</i>	7.08	c
(UFMA / AR03)	<i>Aspergillus nidulans</i>	5.51	c
(UFMA / SL33)	<i>Penicillium corylophilum</i>	4.76	c
(UFMA / CH21)	<i>Aspergillus terreus</i>	3.33	d
(UFMA / CH23)	<i>Aspergillus nidulans</i>	2.15	d
(UFMA / SL73)	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.75	d
(UFMA / AR01)	<i>Aspergillus terreus</i>	1.15	d
(UFMA / SL71)	<i>Aspergillus terreus</i>	1.08	d
(UFMA / SL12)	<i>Penicillium citrinum</i>	0.78	d
(UFMA / CH77)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,00	d
**CV% 29.05			

Fonte: COSTA, J. B. – Autora deste trabalho

*Médias representadas por letras iguais não apresentam diferença estatística, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação.

O substrato utilizado para a produção das amilases foi o amido solúvel onde foram vistos resultados positivos para produção de amilases a partir dos isolados testados. De acordo com a Tabela 2, dos 20 microrganismos testados, 75% produziram amilases, sendo verificadas variações quanto ao potencial de produção da enzima amilase. *A. niger* (SL72) obteve o maior índice enzimático, 16,83, seguido de *A. fumigatus* (SL74) IE= 15,02; *Aspergillus flavus* (AR05) IE= 12,00; *Penicillium spinulosum* (SL07) IE= 7,38; *Penicillium decumbens* (SL05) IE= 7,11; e *Penicillium corylophilum* (SL33) IE= 4,76; entre outros. Conforme consta no gráfico abaixo.

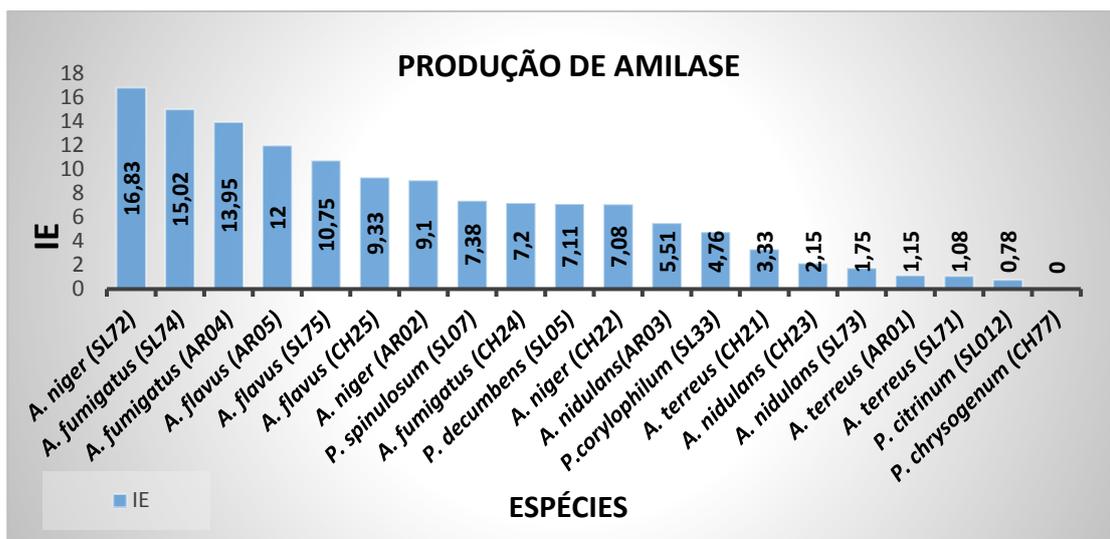
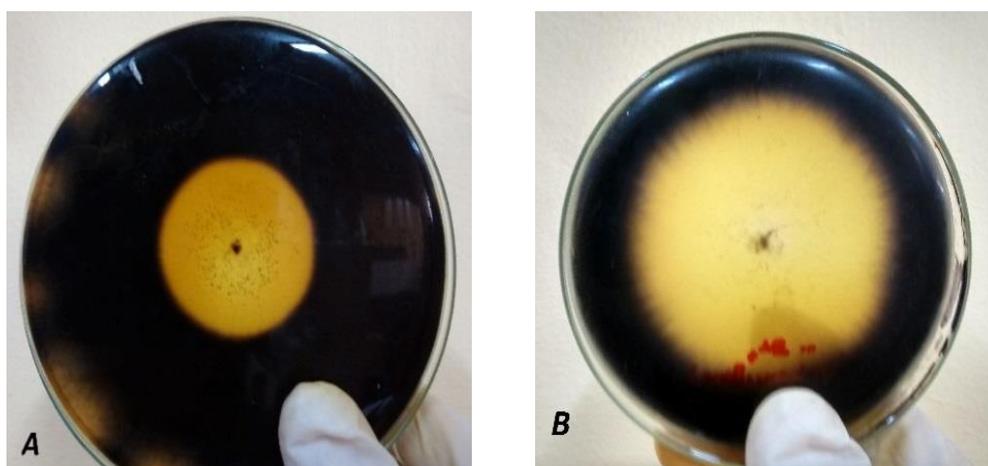


Gráfico 1 - Produção de amilase dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luís – MA, 2017.

Fonte: COSTA, J. B. – Autora deste trabalho

Todos os fungos que alcançaram índices enzimáticos (IE) $\geq 2,00$ são ditos potenciais produtores de amilases, entretanto, apesar da grande maioria dos microrganismos avaliados se revelarem ótimos produtores de enzimas, foi observado que o isolado *Penicillium chrysogenum* (CH77) não apresentou halo de qualquer tamanho. Na figura 2, podem ser observados os resultados dos testes positivos para amilases, e um negativo referente a seis dos isolados estudados.



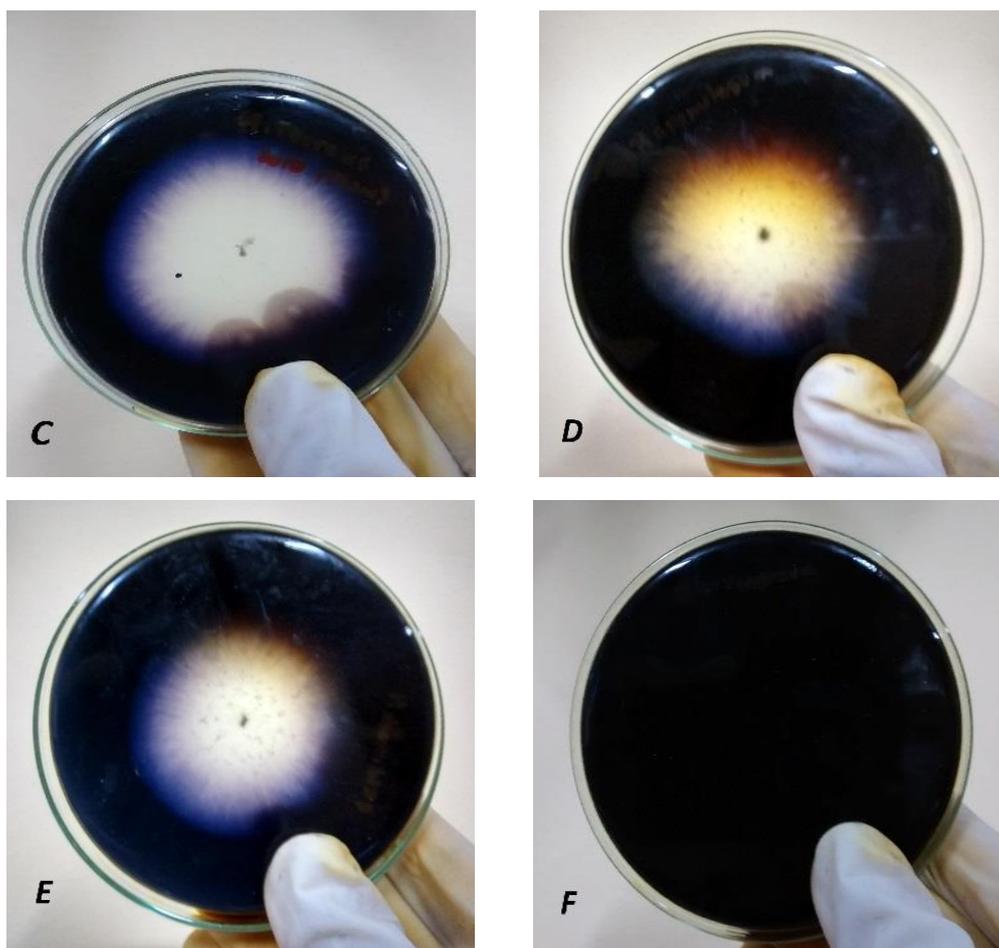


Figura 2 - Teste qualitativo de produção da enzima amilase pelos fungos: *Aspergillus niger* (SL72) (A), *Aspergillus fumigatus* (SL74) (B), *Aspergillus terreus* (CH21) (C), *Penicillium spinulosum* (SL07) (D), *Penicillium decumbens* (SL05) (E) e *Penicillium chrysogenum* (CH77) (F), após revelação com solução de iodo 0,1%.

Fonte: Foto produzida por COSTA, J. B.– Autora deste trabalho.

Observou-se que o microrganismo *Aspergillus nidulans* (SL73) alcançou potencial intermediário sem atingir $IE \geq 2,00$ ficando muito próximo a esse valor, os isolados restantes atingiram índices enzimáticos inferiores.

A espécie *A. niger* (SL72) obtida do solo, se destacou como a melhor produtora da enzima amilase, apresentando um índice enzimático ($IE = 16,83$). Quanto à produção de enzimas amilolíticas, esta, tem sido relatada como ótima produtora de α -amilase, destacando-se também como uma das espécies mais utilizadas para a produção de glucoamilases (PANDEY *et al.*, 2005; DAR *et al.*, 2014). Além disso, *A. niger* possui grande destaque, não somente pela enorme variedade de compostos que é capaz de produzir, mas também por ser tido como um microrganismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (ABARCA *et al.*, 2004).

Este fungo obteve seu primeiro destaque industrial em 1919, onde elevada produção de ácido cítrico por este microrganismo foi constatada. Porém, somente a partir de 1960 seu uso foi expandido, tornando-se uma grande fonte de produção de enzimas industrialmente relevantes (SCHUSTER *et al.*, 2002). Nos últimos anos, diversos outros compostos de grande importância têm sido isolados a partir de *A. niger*, incluindo a aurasperona A, com atividade antioxidante (SONG *et al.*, 2005), o rubrofusarem B, com atividade citotóxica, o ácido tensiuico A, com atividade antimicrobiana (HASEGAWA *et al.*, 2007), os antifúngicos “yanuthones” (PETERSEN *et al.*, 2015), dentre outros metabólitos (NIELSEN *et al.*, 2009; RICHTER *et al.*, 2014).

Além de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* também se revelou um excelente produtor da enzima amilase alcançando IE=15.02, esse fungo é considerado termotolerante capaz de produzir enzimas amilolíticas (HIZUKURI *et al.*, 1988).

Em um estudo realizado por Gopinarth, Anbu e Hilda (2005) para verificar a produção de amilase, apenas 3 isolados apresentaram atividade de moderada a alta, 9 apresentaram atividade intermediária e 22 não apresentaram nenhuma atividade. No entanto, Terra (2008) ao isolar fungos de cavernas verificou que os fungos ditos potenciais produtores de amilase representaram 12,87% dos isolados fúngicos testados. Destacando que *A. terreus*, atingiu o maior índice enzimático (IE =3,57), índice semelhante ao observado no presente estudo no qual *A. terreus* atingiu IE =3,33.

De acordo com Terra (2008) as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram consideradas aspotenciais produtoras de enzimas. Esses resultados assemelham-se aos resultados obtidos no presente trabalho, em que a maioria das espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se revelaram potenciais produtoras da enzima amilase. Os fungos considerados potenciais produtores de enzimas amilolíticas neste trabalho corresponderam a 75% dos isolados testados, sendo este resultado diferente do encontrado por Terra (2008) que corresponde a 12, 87%.

Para avaliar o potencial de produção de celulasas, 20 isolados foram testados, destes, 90% produziram celulasas cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 3. Apenas isolado *P. chrysogenum* (CH77), não apresentou qualquer halo de produção enzimática, em contrapartida o isolado *Aspergillus niger* (CH22) obteve produção enzimática elevada, apresentando índice enzimático, IE= 7, 26.

Tabela 3 - Produção de celulasas por isolados fúngicos da Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE).

ISOLADO	ESPÉCIES	IE	MÉDIA
(UFMA / CH22)	<i>Aspergillus niger</i>	7.26	a
(UFMA /SL74)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4.33	a
(UFMA /AR05)	<i>Aspergillus flavus</i>	4.33	a
(UFMA /SL72)	<i>Aspergillus niger</i>	4.25	a
(UFMA /AR02)	<i>Aspergillus niger</i>	3.91	a
(UFMA /SL07)	<i>Penicillium spinulosum</i>	3.88	a
(UFMA /SL75)	<i>Aspergillus flavus</i>	3.77	a
(UFMA /CH25)	<i>Aspergillus flavus</i>	3.55	a
(UFMA /CH21)	<i>Aspergillus terreus</i>	3.41	a
(UFMA /AR04)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.38	a
(UFMA /AR01)	<i>Aspergillus terreus</i>	3.33	a
(UFMA /AR03)	<i>Aspergillus nidulans</i>	3.08	a
(UFMA /CH24)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.99	a
(UFMA /SL05)	<i>Penicillium decumbens</i>	2.94	a
(UFMA /SL73)	<i>Aspergillus nidulans</i>	2.88	a
(UFMA /SL33)	<i>Penicillium corylophilum</i>	2.44	a
(UFMA /SL12)	<i>Penicillium citrinum</i>	2.11	a
(UFMA /SL71)	<i>Aspergillus terreus</i>	2.08	a
(UFMA /CH23)	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.87	a
(UFMA /CH77)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.00	a
** CV% 34.88			

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

*Médias representadas por letras iguais não apresentam diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação.

Os resultados dos testes para celulasas podem ser observados na figura 3, referente a seis isolados analisados. Os resultados positivos podem ser vistos a partir da formação de halos alaranjados ou amarelados ao redor da colônia, o que indica que houve degradação do substrato. O resultado negativo foi observado no isolado que não apresentou halo de degradação. Foi observado que uma grande maioria das espécies foi capaz de produzir a enzima celulase, atingido índice enzimático igual ou superior a dois, apesar disso, pode ser visto que o *Aspergillus nidulans* não atingiu $IE \geq 2,00$ ficando em uma classificação intermediária, mas muito próxima a esse valor, enquanto que os demais isolados se agruparam em uma produção enzimática superior.

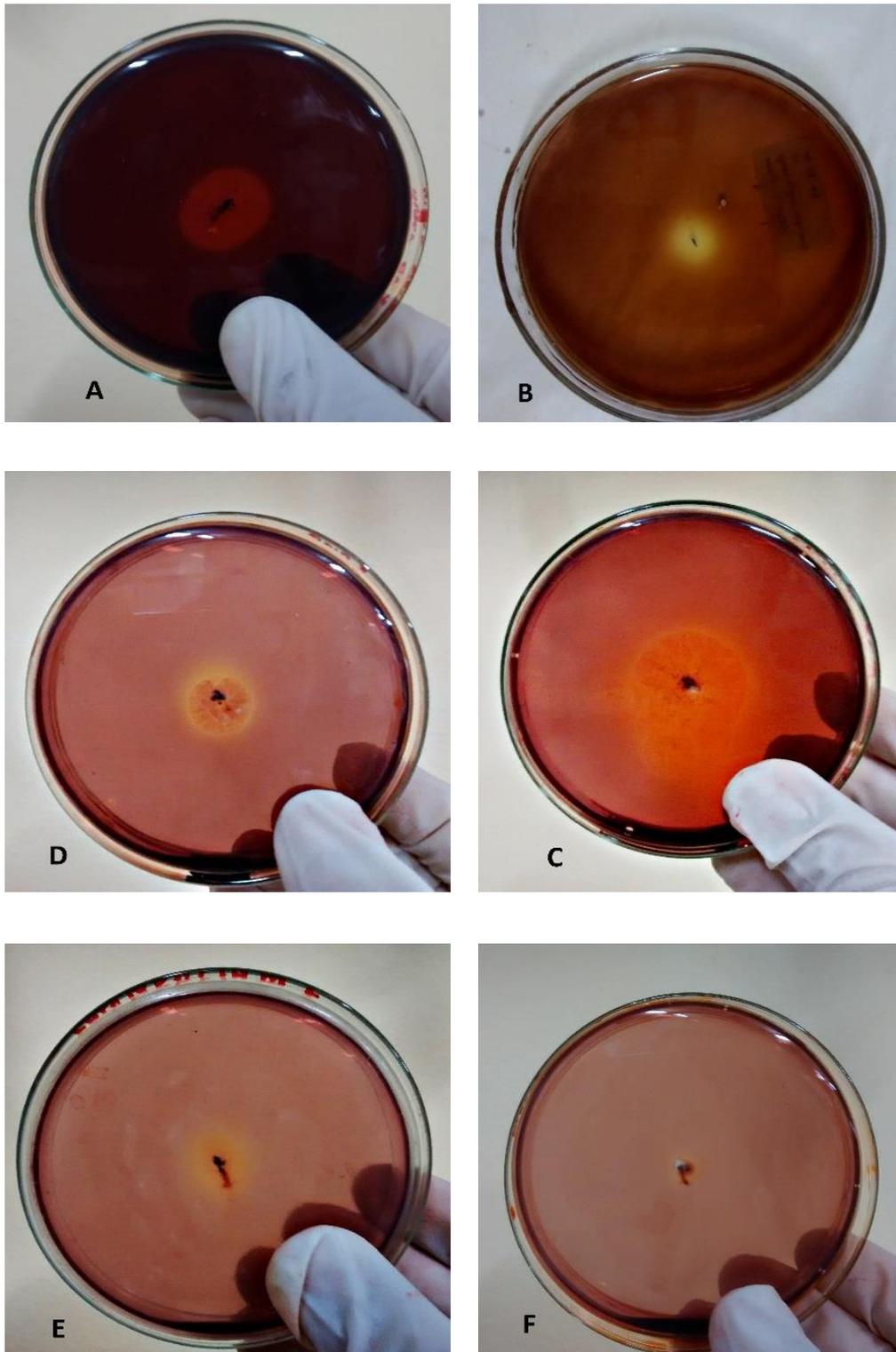


Figura 3 - Teste qualitativo de produção da enzima celulase pelos fungos: *A. niger* (CH22.) (A), *A. nidulans* (AR03) (B), *A. flavus* (AR05) (C), *P. spinulosum* (SL07) (D), *P. corylophilum* (SL33) (E) e *P. chrisogenum* (CH77) (F) após revelação com solução de vermelho congo 0,1%.

Fonte: Foto produzida por COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar que os fungos testados apresentaram diferentes valores quanto ao potencial de produção da enzima, sendo que, destacaram-se os fungos *A. niger* (CH22) IE = 7,26; *A. fumigatus* (SL74) IE = 4,33; *A. flavus* (AR05) IE = 4,33; *A. niger* (SL72) IE = 4,25; e *P. spinulosum* (SL07) IE = 3,88. Estas espécies se diferenciaram quanto à fonte de onde foram isolados, e por apresentarem índice enzimático maior ou igual a 3,0. Outras espécies também apresentaram índices enzimáticos igual ou superior a 2,0, como vistos na tabela, indicando que também são bons produtores da enzima celulase.

Já o fungo *P. chrysogenum*, cresceu no meio de cultura específico para celulase, mas não produziu halo de degradação. É provável que essa ausência da produção de halo, seja porque este fungo produziu quantidade suficiente de enzima apenas para seu desenvolvimento.

Pereira (2012) encontrou 15 fungos produtores de celulases, dos 40 obtidos de diferentes substratos representando 37,5% dos isolados. Destes 14 apresentam IE maior que 2,0, onde o maior índice enzimático foi 28,3 atingido por *Aspegillus* sp. Em seu trabalho Fernandes (2009) testou 24 fungos isolados de diferentes fontes para detectar produção de celulase, desses, seis obtiveram IE superior a 2,0, no entanto, o maior valor observado foi o atingido por *Penicillium crustosum* IE=5,83. Valores próximos a este são encontrados no presente trabalho em que os valores máximos produzidos pelas espécies de *Aspergillus niger* e *Penicillium* foram 7,26 e 3,88 conforma consta na Tabela 3.

Escobar *et al.* (2007) testando 10 isolados provenientes de substratos vegetais quanto à produção de celulases, observaram que oito desses isolados apresentaram atividade celulolítica significativa, determinada a partir do índice enzimático. Os fungos avaliados pertenciam às espécies *A. awamori*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. sydowi*, *P. waksmanii*, *Eurotium chevallieree*, e *Trichoderma kningii*. Resultados semelhantes foram obtidos nesse trabalho, pois os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* alcançaram resultados positivos em relação à produção de celulases. Jahangeer *et al.* (2005) também isolaram fungos para testar sua capacidade de degradar celulose, 115 fungos de ambiente foram testados, destes 67,83% apresentaram atividade celulolítica. Os fungos potenciais produtores de celulase pertenciam aos gêneros *Penicillium* sp., seguido por *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp e *Trichoderma* sp. Esses resultados podem ser comparados aos do presente estudo, que também apresentam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como bons produtores da enzima celulase.

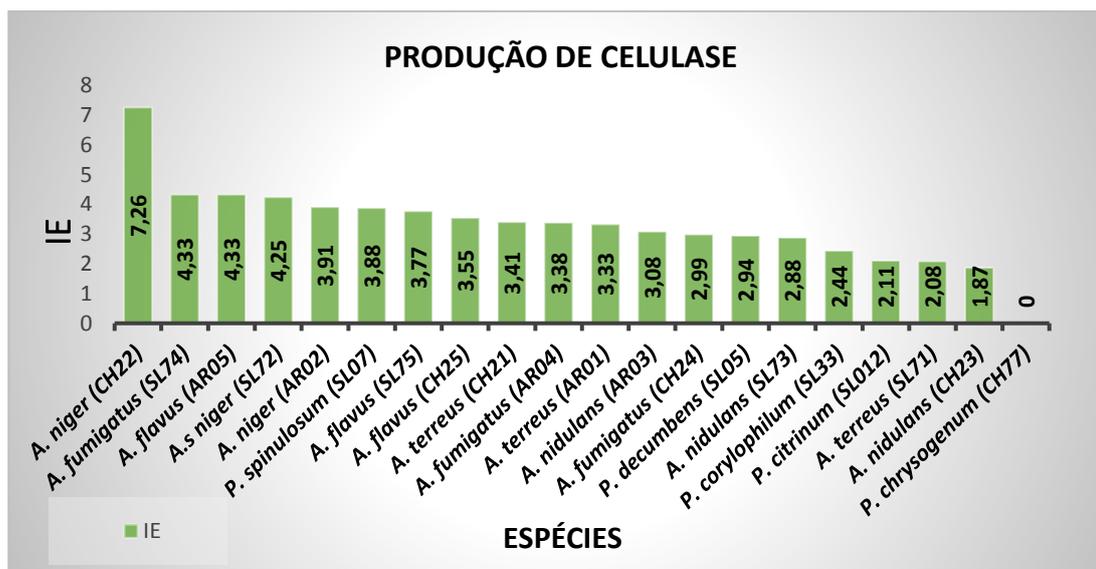


Gráfico 2 - Produção de celulase dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luís -MA, 2017.

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

De acordo com o gráfico 2, *A. niger* (CH22) apresentou o maior IE= 7,26. Segundo Gokhale (1986) *Aspergillus niger* pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos. *Aspergillus terreus* também apresentou habilidade na produção de celulase tendo índice enzimático variando entre 2,08 e 3,41, demonstrando essa espécie como boa produtora de celulase, Gao *et al.*, (2008) afirma que *Aspergillus terreus* produz diferentes tipos de enzimas, entre estas está a celulase.

Outra espécie que também apresentou atividade celulolítica foi *Penicillium decumbens*, ainda de acordo com a tabela 3 pode ser observado que esse fungo alcançou IE= 2,94, um índice bastante significativo, o resultado encontrado neste trabalho corrobora com o resultado obtido por Lima *et al.*, (2013), que em seu trabalho evidenciou a formação de halos de degradação produzidos pelo *Penicillium decumbens*, caracterizando a atividade celulolítica dessa espécie como muito forte.

Tendo em vistas esses resultados, e de acordo com a literatura, é notório que a maioria das espécies testadas para detectar atividade celulolítica pertence à classe dos Basidiomicetos (grandes produtores) e espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, isso porque frequentemente apresentam como habitat, materiais lignocelulolíticos. Apesar disso, poucos microrganismos possuem grande atividade celulolítica com IE muito elevado, a maioria

apresenta IE semelhantes aos observados nesse trabalho no qual 90% dos fungos avaliados apresentaram IE variando entre 2,0 e 7,0.

Para avaliar o potencial de atividade proteolítica, 20 isolados foram testados (Tabela 4), todos apresentaram capacidade de degradação da protease formando halos indicativos de produção de enzimas. No entanto, apenas os isolados *Aspergillus niger* (AR02), *Penicillium spinulosum*(SL07), *Aspergillus fumigatus* (CH24), *Penicillium chrysogenum* (CH77), *Aspergillus fumigatus* (AR04) e *Penicillium corylophilum* (SL33), apresentaram IE superior a 2,0, os demais isolados fúngicos formaram halos de degradação, porém com índice enzimático (IE) inferior a 2,0.

Tabela 4 - Produção de proteases por isolados fúngicos da Coleção de Fungos da UFMA, avaliados pelo índice enzimático (IE).

ISOLADO	ESPÉCIES	IE	MÉDIA
(UFMA /AR02)	<i>Aspergillus niger</i>	3.86	a
(UFMA /SL07)	<i>Penicillium spinulosum</i>	2.94	b
(UFMA /CH24)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.52	b
(UFMA /CH77)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	2.09	c
(UFMA /AR04)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.04	c
(UFMA /SL33)	<i>Penicillium corylophilum</i>	2.03	c
(UFMA /SL71)	<i>Aspergillus terreus</i>	1.88	c
(UFMA /SL05)	<i>Penicillium decumbens</i>	1.79	c
(UFMA /SL75)	<i>Aspergillus flavus</i>	1.78	c
(UFMA /AR03)	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.70	c
(UFMA /AR05)	<i>Aspergillus flavus</i>	1.67	c
(UFMA /SL74)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.62	c
(UFMA /AR02)	<i>Aspergillus niger</i>	1.59	c
(UFMA / CH23)	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.58	c
(UFMA /SL73)	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.54	c
(UFMA /CH21)	<i>Aspergillus terreus</i>	1.49	c
(UFMA / CH25)	<i>Aspergillus flavus</i>	1.47	c
(UFMA /CH22)	<i>Aspergillus niger</i>	1.38	c
(UFMA / SL12)	<i>Penicillium citrinum</i>	1.30	c
(UFMA /AR01)	<i>Aspergillus terreus</i>	1.18	c
CV% 24.86			

Fonte: Produzida por COSTA, J. B.- Autora do trabalho

*Médias representadas por letras iguais não apresentam diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** CV= Coeficiente de variação.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, pode-se observar que os isolados testados apresentaram diferenças quanto ao seu potencial de produção enzimática. Dos 20 isolados testados, apenas 30% apresentaram atividade enzimática significativa para a

produção de enzimas proteolíticas. Os fungos *Aspergillus terreus* (SL71), *Penicillium decumbens* (SL05), *Aspergillus flavus* (SL75), *Aspergillus nidulans* (AR03) e *Aspergillus fumigatus* (SL74) revelaram um potencial intermediário, obtendo IE próximos a 2,00, os demais tiveram resultados inferiores. Na figura abaixo encontram-se ilustrados os resultados dos testes efetuados para proteases.

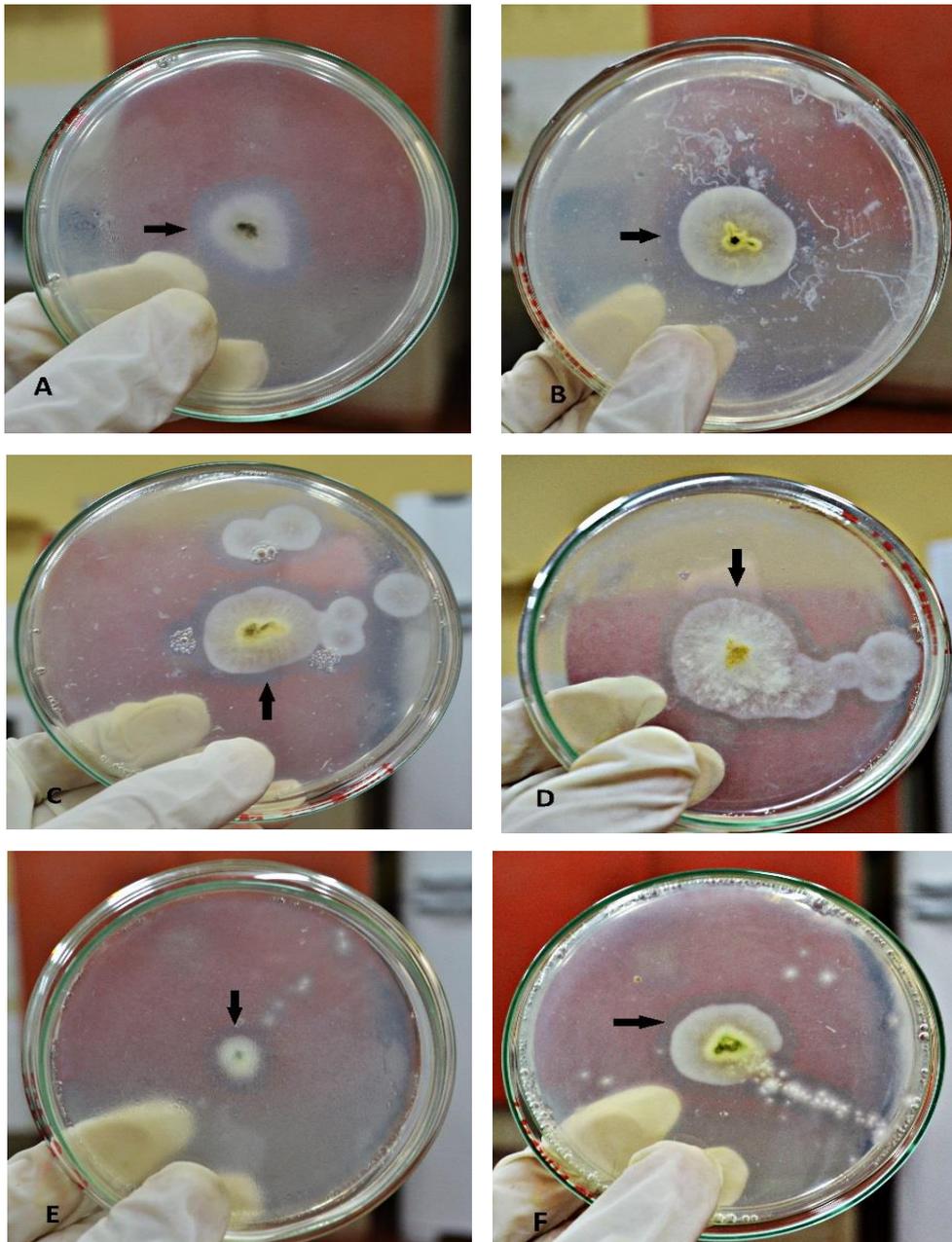


Figura 4 - Teste qualitativo de produção da enzima protease pelos fungos: *A. niger* (AR02) (A), *P. spinulosum* (SL07) (B), *A. fumigatus* (CH24) (C), *A. fumigatus* (AR04) (D), *P. chrysogenum* (CH77) (E), *P. corylophilum* (SL33) (F).

Fonte: Foto produzida por COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

Teixeira (1994) verificou que os maiores halos de produção enzimáticas foram atingidos por *A. niger* na produção de amilases e celulases, enquanto *A. flavus* destacou-se na produção de proteases. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, pois *A. niger* atingiu maiores índices enzimáticos para amilase e celulase, no entanto *A. flavus* obteve IE = 1,78, não sendo considerado significativo para sua classificação entre os fungos considerados potenciais produtores de proteases. *A. niger* também foi o maior produtor de protease de acordo com o presente estudo, seu potencial enzimático atingiu IE = 3,86 esse resultado corrobora com o trabalho de Rocha (2010) que destacou o *Aspergillus niger* como excelente produtor da enzima protease, que apresentou uma atividade proteolítica superior aos resultados encontrados na literatura.

Além do *Aspergillus Níger* (AR02), *Aspergillus fumigatus* (SL07) também apresentou a formação de halo significativo, chegando a atingir IE = 2.52. A produção de proteases por *A. fumigatus* já foi anteriormente relatada por Reichard *et. al.*, (1990), Larcher *et. al.*, (1992) e Wang *et. al.*, (2005). De acordo com Wang *et al.* (2005) o *A. fumigatus* tem demonstrado grande diversidade em produção enzimática, destacando a capacidade de secretar diferentes classes de proteases.

As outras espécies, apesar de não atingirem o índice enzimático recomendado, para serem consideradas boas produtoras da enzima protease podem ser consideradas como espécies que possuem potencial intermediário, pois atingiram índice enzimático próximo a 2,00, enquanto que os demais se agruparam em uma produção enzimática superior.

Outro fungo que apresentou habilidade na produção de enzimas proteolítica foi *Penicillium chrysogenum*, apresentando IE= 2,09, sendo um índice um pouco menor que o encontrado pela mesma espécie por Fernandes (2009). No entanto, a diferença não descarta a existência de atividade proteolítica apresentada pelo *Penicillium chrysogenum*.

De acordo com os resultados do gráfico 3 abaixo, foi visto que a grande maioria dos microrganismos apresentaram baixa atividade proteolítica, esse resultado pode ser explicado devido ao fato de que a produção de protease depende da disponibilidade de carbono e de nitrogênio no meio, ambos exercendo efeitos reguladores sobre a síntese da enzima. No entanto, a capacidade de utilizar uma determinada fonte de carbono ou nitrogênio varia de um microrganismo para o outro.

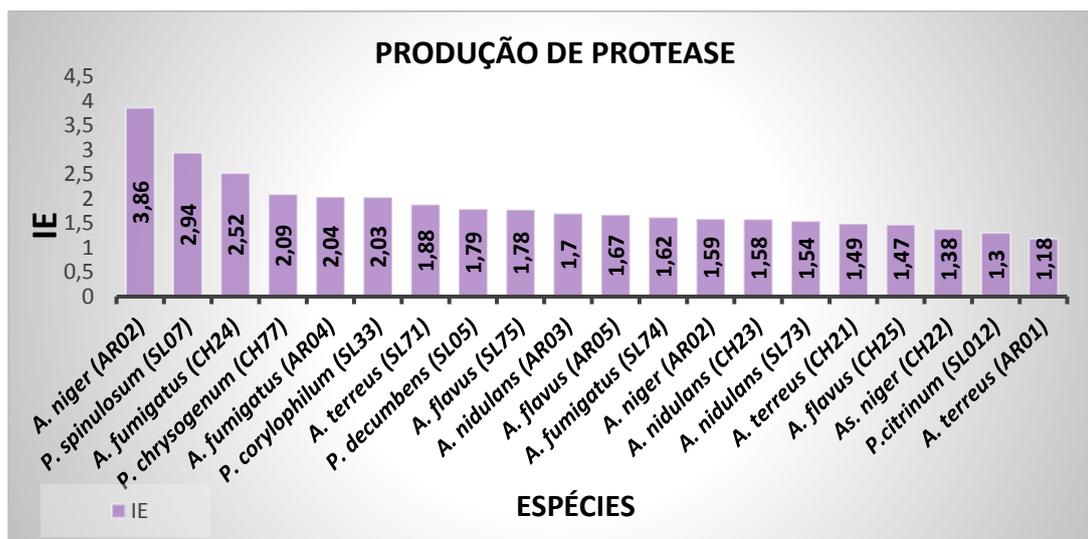


Gráfico 3 - Produção de protease dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* – “Coleção de Fungos da UFMA” avaliadas a partir do índice enzimático (IE). São Luís - MA, 2017.

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho.

Espécies de *Aspergillus* utilizam uma ampla variedade de substratos para seu crescimento e possuem diferentes vias bioquímicas para a sua assimilação (HAJJI *et al.*, 2008). Dessa forma, os resultados obtidos no teste qualitativo para a verificação de fungos produtores de protease também mostraram que espécies diferentes ou mesmo isolados diferentes de uma mesma espécie podem apresentar potenciais enzimáticos diferentes. A produção da enzima é específica para um isolado e não para uma determinada espécie (RODARTE *et al.*, 2011).

5.2 POTENCIAL MULTIENZIMÁTICO DOS FUNGOS

Nas últimas décadas o aproveitamento de recursos genéticos e biológicos têm ocorrido em inúmeras áreas, em especial na alimentação, a agricultura e medicina. Dentre os recursos biológicos mais utilizados para a aquisição de bioprodutos estão inseridos os microrganismos que produzem enzimas capazes de contribuir com a saúde humana e o meio ambiente (CARVALHO, 2008). Essa capacidade apresentada por esses microrganismos os torna mais vantajosos, pois eles apresentam um sistema multienzimático de fácil formação, podendo ser amplamente explorado em vários processos, como biocatálise e biorremediação, que necessitam de diferentes enzimas para degradar resíduos e outras substâncias (VIEIRA, 2006).

Na Tabela 4 pode ser observado os microrganismos do presente estudo que apresentaram potencial multienzimático. Os fungos *Aspergillus fumigatus* (AR04), *Aspergillus fumigatus* (CH24), *Aspergillus niger* (SL72), *Penicillium corylophilum* (SL33), e *Penicillium*

spinulosum (SL07) apresentaram excelente potencial para a produção das enzimas amilase, celulase e protease, com índices enzimáticos bastantes significativos variando entre 2.03 e 13.95. As outras espécies também apresentaram habilidade multienzimática, no entanto, produziram apenas dois tipos de enzimas. De acordo com a tabela 5, todos os isolados produziram celulase, a variação ocorreu apenas entre amilase e protease. Todas as espécies que produziram celulase tiveram $IE > 2,00$. A atividade proteolítica foi a menor em relação a quantidade de organismos que conseguiram produzir protease, se comparado a quantidade de fungos que produziram outras enzimas. Apenas 5 isolados, de acordo com a TABELA 4. Esses resultados estão de acordo com a afirmativa de Hankin e Agnostakis (1974) que averiguaram que determinados fungos podem produzir uma variedade de enzimas, como proteases, amilases, DNA e RNAases, lipases, pectinases, quitinase e uréases. Inúmeros trabalhos na literatura fazem referência aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente *Aspergillus* como bons produtores de enzimas, confirmando os resultados obtidos no presente estudo.

Tabela 5 - Isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram potencial multienzimático com índices enzimáticos ($IE \geq 2,00$).

ISOLADO	GÊNERO	AMILASE	CELULASE	PROTEASE
(UFMA/ AR05)	<i>Aspergillus flavus</i>	12.00	4.33	X
(UFMA/ CH25)	<i>Aspergillus flavus</i>	9.33	3.55	X
(UFMA/ SL75)	<i>Aspergillus flavus</i>	10.75	3.77	X
(UFMA/ AR04)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	13.95	3.38	2.04
(UFMA/ CH24)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	7.20	2.99	2.52
(UFMA/ SL74)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	15.02	4.33	X
(UFMA/ AR03)	<i>Aspergillus nidulans</i>	5.51	3.08	X
(UFMA/ AR02)	<i>Aspergillus niger</i>	9.10	3.91	X
(UFMA/ CH22)	<i>Aspergillus niger</i>	7.08	7.26	X
(UFMA/ SL72)	<i>Aspergillus niger</i>	16.83	4.25	3.86
(UFMA/ SL05)	<i>Penicillium decumbens</i>	7.11	2.94	X
(UFMA/ SL33)	<i>Penicillium corylophilum</i>	4.76	2.44	2.03
(UFMA/ SL07)	<i>Penicillium spinulosum</i>	7.38	3.88	2.94

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

O gráfico abaixo permite visualizar os isolados que tiveram os melhores potenciais multienzimáticos, sendo capazes de produzir as três enzimas propostas no presente estudo, amilase, celulase e protease. A partir do gráfico observa-se que a produção de amilase foi a maior para os 5 isolados, seguida de celulase e protease, o isolado *Aspergillus niger* revelou-se o melhor produtor multienzimático atingindo os maiores índices enzimáticos 16,83, 4,25 e 3,86 para amilase, celulase e protease respectivamente. O gênero *Penicillium* também apresentou bom potencial enzimático, sendo representado pelo *P. Spinulosum* que obteve elevados índices

enzimáticos 7,38, 3,88 e 2,94 para amilase, celulase e protease respectivamente, sendo o melhor potencial multienzimático desse gênero nesse estudo.

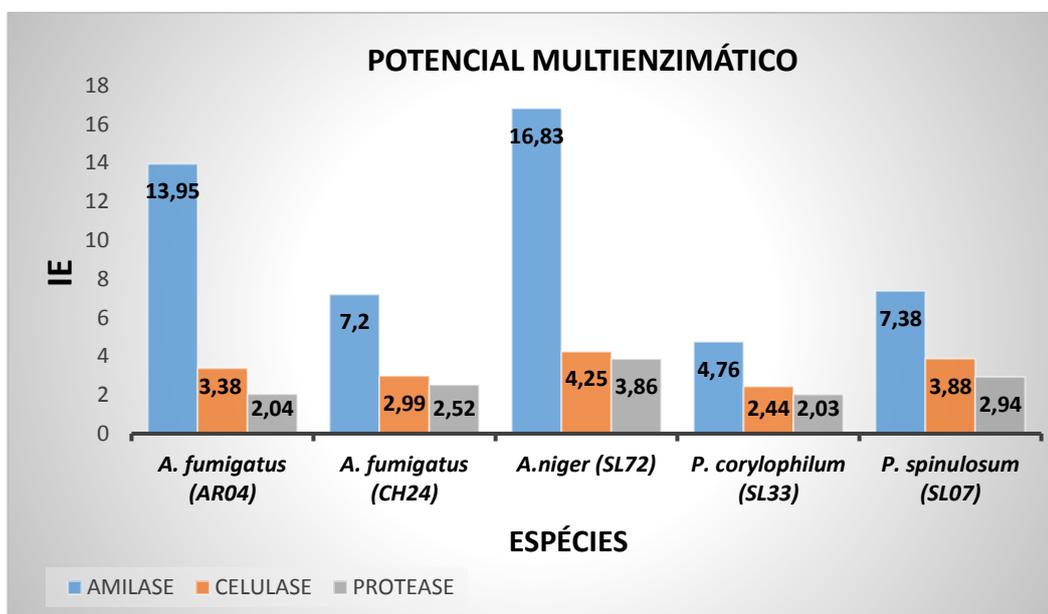


Gráfico 4 - Espécies fúngicas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram potencial multienzimático, com IE >2,00 produzindo amilase, celulase e protease

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho.

Os gêneros testados nesse trabalho apresentaram elevados índices enzimáticos (IE), principalmente o gênero *Aspergillus*, esses resultados reforçamos vários trabalhos na literatura que citam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como bons produtores de enzimas.

Além do potencial multienzimático dos fungos estudados, foi possível observar também a produção enzimática de cada espécie pertencente ao gênero *Aspergillus* e comparar essa produção de acordo com o local de coleta (tabela 6).

As espécies de *Aspergillus* foram coletadas do antigo aterro sanitário da Ribeira- São Luís – MA, este aterro foi capaz de comportar cerca de 26 mil toneladas de lixo por mês em 2015, contudo no ano de 2016 sofreu interdição definitiva. O aterro da Ribeira funcionou por quinze anos, e no presente ano de 2017 passa por um processo de recuperação ambiental que, segundo especialistas, deve durar entre 30 a 40 anos.

Tabela 6: comparação da produção enzimática de acordo com local de coleta.

AMILASE		IE	CELULASE		IE	PROTEASE		IE
1	<i>Aspergillus niger</i> (SL)*	16,83	1	<i>Aspergillus niger</i> (CH)**	7,26	1	<i>Aspergillus niger</i> (AR)	3,86
2	<i>Aspergillus fumigatus</i> (SL)*	15,02	2	<i>Aspergillus fumigatus</i> (SL)*	4,33	2	<i>Aspergillus fumigatus</i> (CH)**	2,52
3	<i>Aspergillus flavus</i> (AR)	12,00	3	<i>Aspergillus flavus</i> (AR)	4,33			
4	<i>Aspergillus nidulans</i> (AR)	5,51	4	<i>Aspergillus terreus</i> (CH)**	3,41			
5	<i>Aspergillus terreus</i> (CH)**	3,33	5	<i>Aspergillus nidulans</i> (AR)	3,08			

Fonte: COSTA, J. B.– Autora deste trabalho

De acordo com a tabela 6, podemos observar que o *Aspergillus niger* se destacou na produção das diferentes enzimas estudadas neste trabalho, *A. niger* coletado do solo foi o melhor produtor da enzima amilase, *A. niger* do Chorume se destacou na produção de celulase enquanto que o *A. niger* coletado do ar foi o melhor produtor da enzima protease. Esses resultados estão diretamente relacionados com as condições ambientais que estes microrganismos suportam nos diferentes locais, sobrevivendo em condições adversas que lhes permite facilmente ocupar áreas e garantir substratos no solo e/ou nas plantas, ar e até chorume como foi visto.

As outras espécies de *Aspergillus* também mostraram diferenças quanto ao seu potencial de produção das diferentes enzimas estudadas, de acordo com o local em que foram coletados, *Aspergillus fumigatus* isolado do solo teve a melhor produção de amilase e celulase, enquanto que na produção de protease *Aspergillus fumigatus* coletado do chorume apresentou maior índice enzimático. *A. fumigatus* isolado também foi um bom produtor de enzimas, no entanto, as espécies isoladas do solo e chorume atingiram os maiores índices enzimáticos para a produção de amilase, celulase e protease.

Aspergillus flavus coletado do ar apresentou melhores resultados como produtor das enzimas amilase e celulase, no entanto, não apresentou índice enzimático significativo para ser considerado produtor da enzima protease. As espécies coletadas do solo e do chorume também foram boas produtoras das enzimas amilase e celulase, mas também não atingiram índice significativo para serem consideradas boas produtoras de protease.

Assim como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* coletado do ar foi o melhor produtor das enzimas amilase e celulase, e nenhuma espécie apresentou produção de protease. A espécie de *A. nidulans* coletadas do solo não foi capaz de produzir amilase, mas produziu celulase. Por sua vez a espécie coletada do chorume foi capaz de produzir amilase e não produziu celulase. *Aspergillus terreus* coletado do chorume foi o melhor produtor de amilase e celulase, e não produziu protease. As demais espécies coletadas do solo não atingiram $IE \geq 2,00$ para serem consideradas boas produtoras de amilase, as espécies coletadas do ar não foram capazes de produzir amilase, mas foram capazes de produzir celulase.

De acordo com esses resultados podemos observar que a produção de enzimas pode está diretamente relacionada com o local de origem da espécie, as condições as quais os microrganismos estão submetidas pode influenciar na produção de enzimas que garantam a sobrevivência desses microrganismos, seja em condições favoráveis com abundância de matéria orgânica e resíduos que facilitam essa produção enzimática, seja em condições desfavoráveis que “obrigam” esses a produzir enzimas que permitam sua sobrevivência.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados fúngicos obtidos da Coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão, apresentaram potencial para produzir pelo menos uma enzima. As espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum* e *Penicillium spinulosum*, foram capazes de produzir as três enzimas propostas neste estudo, amilase, celulase e protease, demonstrando que possuem potencial multienzimático. No entanto, apesar dessas espécies se mostrarem excelentes produtoras de enzimas, outras, porém, não atingiram $IE > 2$, não sendo consideradas fontes produtoras de enzimas. Dentre os isolados testados a espécie que apresentou os maiores índices enzimáticos foi *Aspergillus niger*, tanto para atividade amilolítica, celulolítica, e proteolítica, sendo considerados um excelente produtor de enzimas com potencial multienzimático. Além disso, foi observado também que o potencial enzimático pode variar na mesma espécie e que esses fungos testados são capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Continuidade do presente estudo, avaliando mais fatores industrialmente importantes, além de experimentos em biorreatores de laboratório, teste em escala piloto e, posteriormente, estudos de ampliação de escala;
- ✓ Produção em maior quantidade para a indústria farmacêutica, alimentícia etc.;
- ✓ Trabalhar com enzimas na biodegradação para melhoramento do meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI F, C. J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

AKILANDESWARI, P. PRADEEP BV. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100:1631–1643, 2016.

BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporium* var. Lini. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, Aug. 2002.

BENNET, J. W. **An overview of the genus *Aspergillus***. 2010. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.

BOBBIO, P. A.; & BOBBIO, F. O. **Introdução a química de alimentos**. São Paulo, 2^a ed., p.223, 1992a.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Varela, p. 151, 1992b.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. E PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1^a ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. s.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A; Ferrara, M. A. e Coelho, R. R. R. (eds.). Inyerciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRAVO, C. E. C. *et al.* Determinação das condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 137-152, jan./fev. 2000.

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.

CHAVEZ, R. *et al.* The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, p. 413-433, 2006.

CONN, E. E. ; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

COUTINHO, F.P.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85-89, 2012.

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

DAMHUS, T. *et al.* **All of Novozymes S/A**. 3ed. Bagsvaerd: Novozymes, 2008. 62 p.

DIAZ-GUERRA, M. T.; MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operation room. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2419-2422, 2000.

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, 1953.

DUBOIS, D. K. **Enzymes in baking**. II. Applications. Research Department Technical Bulletin, vol.2, cap.11, p.1-5, december, 1980b.

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.

ENZIMAS EM PANIFICAÇÃO. **Aditivos e ingredientes**. n.62, p.43-53, 2009.

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.

FELLOWS, P. **Tecnologia del procesado de los alimentos: principios e praticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.

GAO, J.; *et al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of com stover. **Bioresource Technology**, v 99, p 7623-7629, 2008.

GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 137138, 1986.

GÓMEZ, M. *et al.* Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. **Eur. Food Res. Technol.**, Berlin, v. 219, n. 2, p. 145-150, 2004.

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

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective.** Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>Acesso em 08 Fev 2015.

HAJJI, M. *et al.* OPTIMIZATION OF ALKALINE PRODUCTION BY *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 79, n. 6, p. 915-23, 2008.

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.

HASEGAWA, Y.; FUKUDA, T.; HAGIMORI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S. Tensyuc acids, new antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1338-1341, 2007.

HAWKSWORTH, D.L. (ed.) (1991a). **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture.** C.A.B. International, Wallingford.

HAWKSWORTH, D.L. (2001). **The magnitude of fungal diversity: the 1 \pm 5 million species estimate revisited.** Mycological Research 105(12): 1422-1432.

HIZUKURI, S.; BERGMANN, F. W.; ABE, J. Selection microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes. **Appl. Microbiol. Biot.**, v. 27, p. 443-446, 1988.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**. The Netherlands. V. 70: p. 1-51. 2011.

HOUBRAKEN, J et al., Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 70, p. 53-138, 2011.

HAICHAR, F. Z. *et al.* Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environ. Microbiol.**, 9(3), p. 625-634, 2007.

IGARASHI, K. WADA, M.; e SAMEJIMA, M. **Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase**. FEBS J., 274, P. 1785-1792, 2007.

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

JOSHI, C. P. e MANSFIELD, S. D. The cellulose paradox – simple molecule, complex biosynthesis. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 10, p. 220-226, 2007.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002b. 116 p.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002a.

KNOB, A. **Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: produção, purificação e caracterização de xilanases e de β -xilosidasas**. Tese de Doutorado (Programa de pós graduação em ciências biológicas- microbiologia aplicada), Universidade Estadual Paulista, 2009.

LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D.;

TRONCHIN, G. **Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate.** FEBS Letters, v. 308, p. 65–69, 1992.

LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.; FRISVAD, J. C. UV- guided screening for benzodiazepine producing species in *Penicillium*. **Biochemistry and Systematic Ecology**, San Francisco, v. 28, p. 881-886, 2000.

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

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

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

MILONE, G. **Estatística geral e aplicada.** São Paulo: Centage Learning, 2009. 2451p.

MITCHELL, D. A; BEROVIC, M; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, new york, v. 68, n. 16, p. 61-138, 2000.

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

MOREIRA, A. N; DEL PINO, Francisco A. B; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação elise. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 300-305, 2003.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1/5, 2007.

NICOLETTI, R. et al. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, v. 163, n. 5, p. 295-301, 2007.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. 72 *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, p. 1225- 1242, 2009.

NISHIWAKI, T.; ASANO, S.; OHYAMA, T. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 6, p. 605-609, June 2009.

NORITOMI, D. T. *et al.* Multiple brain abscesses due to *Penicillium* spp infection. **Revista Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 167-170, 2005.

OLIVEIRA, A. N. *et al.* Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, 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.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PANDEY, A. *et al.* Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Clifton, v. 31, n. 2, p. 135-152, Apr. 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulase por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

PETERSON, S. W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 339-344, 2012.

PETTIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. Australia: Food Science Australia, 2000. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Dordrecht Springer, 2009. 503 p.

PLANCHOT, V.; COLONNA, P. Purification and characterization of extracellular α -amylase from *Aspergillus fumigatus*. **Carbohydr. Res.**, v. 272, p. 97-109, 1995.

PUNT, P. J.; *et al.* Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 200-206, May 2002.

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

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

REICHARD, U. *et al.* Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. **Journal of Medical Microbiology**, v. 33, p. 243-251, 1990.

RICHTER, L.; WANKA, F.; BOECKER, S.; STORM, D.; KURT, T.; VURAL, O.; SÜBMURHT, R.; MEYER, V. Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2014, 1:4, 2014.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

RODARTE, M. P. *et al.* Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 757-464, 2011.

SAMSON, R. A. *et al.* Introduction to food and airborne fungi. 6. ed. Utrecht: **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 2004. 387p.

SAMSON, R.A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 141-173, 2014.

SERAFINI, R. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

SCHUSTER, S. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 426-435, 2002.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n 2, p. 249-260, 1997.

SOARES, I. A. *et al.* Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, maio/ jun. 2010.

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.

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.

VARGA, J. *et al.* Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

VERMELHO, A. B. *et al.* **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 273-286.

VIEIRA, M. G. Estudo da biorrdução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp. 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blemenau, Blumenau, 2006.

VISAGIE, C.M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

WANG, H.; HYDE, K.; SOYTONG, K. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. **Journal of Zhejiang University: Science B**, Hangzhou, v. 9, n. 10, p. 835-841, Oct. 2008.

WANG, S-L. *et al.* Purification and characterization of a serine peptidase extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 660–665, 2005.

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