

ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES

Ravelly Casarotti Orlandelli¹, Vânia Specian¹, Aretusa Cristina Felber¹, João Alencar Pamphile²

RESUMO

Enzimas são utilizadas em vários processos industriais, como segmento têxtil, produção de cosméticos, alimentos e bebidas. Fungos fitopatogênicos (que causam doenças em plantas) produzem enzimas durante o processo de infecção, assim como fungos endofíticos (que colonizam as plantas de forma assintomática) produzem enzimas para penetrar na planta hospedeira ou durante a competição com fungos fitopatogênicos. Assim, esta revisão bibliográfica teve por objetivo descrever os processos utilizados para a produção de enzimas e reforçar o potencial de fungos para a obtenção de enzimas industriais. Para tanto, foi realizada uma pesquisa de abordagem qualitativa e de caráter exploratório, utilizando-se livros, dissertações, teses e artigos disponíveis em diferentes bases de dados. Os resultados obtidos mostraram que embora enzimas de origem animal sejam as mais estudadas, as enzimas produzidas por microrganismos possuem vantagens para a produção em larga escala. Os estudos conduzidos no Brasil e aqui citados demonstram que embora o país importe a maior parte das enzimas que utiliza, o país possui uma imensa diversidade de microrganismos ainda pouco explorados para a produção de enzimas de interesse industrial.

Palavras-chave: produção enzimática; enzimas fúngicas; indústria; fermentação submersa.

ENZYMES OF INDUSTRIAL INTEREST: PRODUCTION BY FUNGI AND APPLICATIONS

ABSTRACT

Enzymes are used in several industrial processes such as textile industry, production of cosmetics, food and beverages. Phytopathogenic fungi (that cause plant diseases) produce enzymes during the infection process, as well as endophytic fungi (that asymptotically colonize plants) produce enzymes to enter inside the host plant or during competition with phytopathogenic fungi. Thus, this review aimed to describe the processes used to produce enzymes and reinforce the potential of fungi for obtaining industrial enzymes. A qualitative and exploratory research was conducted, using books, dissertations, theses and articles available in different databases. The results showed that although animal enzymes are the most studied, the enzymes produced by microorganisms have advantages for large scale production. Studies conducted in Brazil and cited herein demonstrate that although the country imports the most of enzymes it uses there is an immense diversity of microorganisms yet unexplored to production of enzymes of industrial interest.

Keywords: enzymatic production; fungal enzymes; industry; submerged fermentation.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (1). Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidoredutases (catalisam reações de oxido-reduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de

hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (2).

Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (3). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas

¹ Bióloga - Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá.

² Biólogo - Docente do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá.

corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que provoca torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (2).

As enzimas são utilizadas na Biologia Molecular e na Biomedicina (4), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (5). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (6-9).

A produção de enzimas é uma área da Biotecnologia em expansão, que movimentará bilhões de dólares anualmente (10). Novas enzimas e usos estão sendo descobertos a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. E são

decrecentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (2).

PROCESSOS UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (11). A FS é a técnica majoritariamente utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (12); portanto, será a técnica enfatizada neste artigo.

Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis (12) e o desenvolvimento do microrganismo se dá em presença de água livre (13). O conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (14).

Nos processos de fermentação em escala industrial são utilizados fermentadores com grande capacidade de volume. Já em escala laboratorial, frascos (como exemplo, erlenmeyers) e agitadores de bancada são utilizados (15-19).

A Figura 1 ilustra de forma simplificada a produção de enzimas por um microrganismo, considerando a utilização da FS em escala industrial.

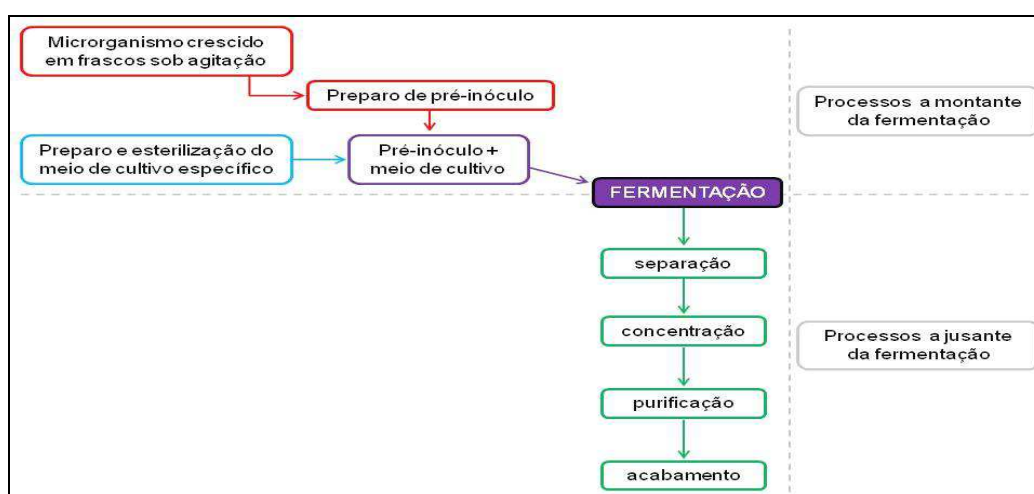


Figura 1. Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa. Adaptado de Sant'Anna Junior (2).

A FS inicia-se com os processos prévios à fermentação, também chamados processos *upstream* ou a montante da fermentação. A cultura estoque do microrganismo a ser utilizada é cultivada em frascos que permanecem em agitação até que seja atingida a fase de crescimento exponencial média ou tardia. Então, este cultivo (pré-inóculo) é transferido para um ou mais fermentadores com 100 a 500 litros de capacidade, contendo meio de cultivo similar ao utilizado para a produção da enzima. Decorrido o tempo necessário de crescimento, este pré-inóculo é transferido para o fermentador principal onde a enzima será produzida, contendo o meio de cultura necessário para a produção enzimática. Durante os processos acima citados, é necessária a verificação da possível ocorrência de contaminação, infecção por bacteriófagos e proliferação de microrganismos mutantes de menor eficiência para a produção enzimática (2, 20).

Os meios de cultivo a serem utilizados podem ser formulados a partir de matérias-primas naturais (como resíduos agroindustriais), ou a partir de compostos quimicamente conhecidos (meio sintéticos). Esses meios devem conter fontes de carbono (como farinhas amiláceas, melaços, licores de milho, soja e outros cereais), fontes de nitrogênio (como farinha de peixe, gelatinas, licores de milho e de soja), fatores de crescimento e micronutrientes (como extrato de levedura e farinhas de sementes oleaginosas) (2).

Também elementos minerais (como fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e cloro) e uma pequena quantidade de elementos traços que desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas (como manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro) são geralmente necessários nos meios de cultura para a produção de enzimas por microrganismos (21). Por fim, é necessária uma fonte indutora para a produção de enzimas: amido para amilases, ureia para ureases, xilose para xilose isomerases, leite desnatado em pó e gelatina para proteases, carboximetilcelulose para celulases, farelo de trigo para fenoloxidasas e pectina cítrica para pectinases, entre outros (2, 22, 23).

O processo de FS em escala industrial é conduzido em fermentadores mecanicamente agitados, com capacidade de 10.000 a 100.000 litros e operados de modo contínuo ou descontínuo. No modo contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as

necessidades do microrganismo e na saída do meio fermentado (19) e no modo descontínuo, conduzido na forma de batelada, uma única quantidade de substrato é fornecida ao microrganismo no início do processo (24-26).

Esses fermentadores possuem serpentinas internas para o aquecimento e refrigeração necessários e sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e espuma. Para determinar o término do processo de fermentação, o parâmetro de controle mais representativo é a atividade enzimática, contudo outros parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, características do caldo fermentado podem ser utilizados (2).

Os processos pós-fermentação, também chamados *downstream* ou a jusante da fermentação, visam recuperar as enzimas produzidas no caldo fermentado. As etapas de separação e purificação removem as substâncias tóxicas e/ou metabólitos indesejáveis. As células microbianas podem ser separadas do caldo fermentado que contém as enzimas produzidas por centrifugação ou filtração. No caso dos fungos, essa separação pode ser facilmente realizada por filtração simples, já as bactérias e leveduras possuem como desvantagem a necessidade de metodologias de filtragem de custo mais elevado e podem necessitar de uma floculação com agentes convencionais (sulfato de alumínio, cloreto de cálcio) ou polieletrólitos (2, 20, 27).

Após a separação o caldo fermentado contendo a enzima de interesse é concentrado por evaporação a vácuo ou por processos mais modernos de ultrafiltração. A etapa seguinte, de purificação, tem como objetivo isolar enzimas específicas a partir de um extrato bruto de células contendo muitos outros componentes indesejados, de forma a se obter o máximo de atividade específica (unidade enzimática por miligrama de proteína) com a melhor recuperação possível da atividade inicial (28). A purificação pode se feita por precipitação em sulfato de amônia, que apresenta baixo custo, alta solubilidade e proteção natural das enzimas; entretanto, nos últimos anos, outras técnicas como a cromatografia de troca iônica vêm ganhando importância (29). Para a obtenção de produtos (preparações enzimáticas) para uso técnico ou comercial, purificações relativamente simples são empregadas; já para produtos de uso analítico ou farmacêutico, técnicas cromatográficas são utilizadas (2).

Na etapa de acabamento, as preparações enzimáticas, brutas ou purificadas, podem ser mantidas na forma líquida, granulada ou liofilizada com a adição de estabilizadores, como sais, carboidratos ou proteínas inertes, como a albumina bovina sérica (BSA). Para a preservação da atividade da enzima e de sua conformação nativa, aditivos, modificação química controlada ou imobilização enzimática podem ser empregados. Outras substâncias podem ser adicionadas às enzimas para garantir sua estabilização, desde que sejam compatíveis com o uso final da enzima em questão, por exemplo: substratos, antibióticos, ésteres de ácidos benzoicos, inibidores de enzimas contaminantes e agentes quelantes. Durante o período de armazenamento e comercialização até a sua utilização, as preparações enzimáticas devem manter as suas características, assim, o fabricante normalmente indica quais as condições de armazenamento necessárias e a validade da atividade enzimática nestas condições (30-32).

Como vantagens da FS podem ser consideradas a relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (33). No entanto, uma desvantagem desta técnica é o fator econômico, já que os meios utilizados no preparo da fermentação muitas vezes apresentam alto custo (12, 19); ainda, há uma maior probabilidade de contaminação, devido a grande quantidade de água utilizada (34).

Enquanto a FS utiliza fungos e outros microrganismos para a fermentação com substratos líquidos, a fermentação em estado sólido (FES), também chamada de fermentação sólida ou semi-sólida, é uma técnica milenar no Oriente, particularmente na Ásia, onde o cultivo dos fungos é feito em ausência de água sobre um substrato sólido (35, 36).

Na FES, o meio de cultura é composto de substratos sólidos, atuando como fonte de carbono e energia, e apresenta ausência total ou quase total de água livre (37, 38), o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do fungo (39), entretanto, a dificuldade na escolha de microrganismos capazes de crescer sob condições de baixa umidade, condições controladas de umidade, pH e fluxo de ar continua sendo uma das limitações do processo de FES (40).

Produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, na forma de resíduos não processados, são empregados na FES como substratos para servirem de matriz sólida e fornecerem carbono e fontes de energia para o crescimento do microrganismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo. Esses substratos são divididos em três grupos: os que apresentam amido como fonte de carbono principal (arroz, batata, mandioca e milho, entre outros), os que apresentam celulose ou lignocelulose como fonte de carbono principal (madeira e palhas) e os que apresentam açúcares solúveis como fonte de carbono principal (forragem, polpas de frutas e beterraba, entre outros) (37, 41).

Semelhantemente à FS, na FES as etapas geralmente necessárias são: uma seleção cuidadosa das matérias-primas a serem utilizadas, tratamento prévio do substrato a ser utilizado no meio sólido, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita, o controle da mesma, a separação e, em alguns casos, a purificação exaustiva dos produtos desejados (42, 43).

A FES apresenta algumas vantagens como: meio de cultura simples, redução dos efluentes líquidos a tratar, diminuição do risco de contaminação do meio, menor exigência de água quando comparada à FS, possível baixo investimento, condições de cultura próximas aos meios naturais, fácil aeração devido à porosidade do material, utilização direta dos sólidos fermentados, extração facilitada pela alta concentração de produtos, baixa demanda de energia. Já entre as desvantagens, podem ser citadas: risco de elevação excessiva de temperatura, difícil regulação dos parâmetros pH e umidade, pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático) e alta taxa de inoculação microbiana quando não se utiliza a microflora natural (44).

APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS

As aplicações das enzimas no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia, um conjunto de áreas ligadas à ciência e tecnologia que envolve Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharia Química. Essas aplicações visam o uso de novas matérias-primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas de matérias-primas e produtos. Portanto, do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente utilizável é aquela que garante a

obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais; a produção de produtos disponíveis de forma reduzida ou indisponíveis no mercado (45).

No segmento têxtil, as enzimas são utilizadas durante o processamento das fibras têxteis, com a vantagem de redução do volume e conteúdo poluente dos efluentes formados e diminuição do consumo de energia (46). Para melhorar a qualidade dos fios durante o processo de tear, os mesmos são banhados em goma de amido, a qual é eliminada com uma α -amilase para não prejudicar os processos de coloração. No processamento de couros, as proteases são aplicadas na fase inicial de limpeza e remoção dos pelos; já nas fases finais proteases degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes (45, 47). Já as celulasas estão substituindo o uso de pedra pomes para dar a aparência envelhecida (*stonewashed*) aos *jeans* (48).

Na indústria de papel e celulose, enzimas como as xilanases e celulasas estão sendo utilizadas no branqueamento das pastas, em substituição ao cloro, tradicionalmente utilizado para esse fim, porém muito tóxico ao meio ambiente (48). Proteases são utilizadas em todos os tipos de detergentes, sejam eles líquidos ou sabões em pó utilizados em máquinas automáticas de lavagem, e sua função é a degradação de compostos tipicamente proteínicos, como sangue, manchas de ovos e leite (49).

Já na indústria de cosméticos (enzimocosmética), as enzimas são utilizadas com o objetivo de facilitar/dificultar as reações bioquímicas da pele, proteger/reparar a pele, destruir/remover parcial ou totalmente algumas estruturas da pele. Na enzimocosmética direta, as enzimas são responsáveis pela proteção da pele contra agentes externos, combate aos radicais livres, promoção de *peeling* biológico, limpeza profunda e facilitação da penetração de substâncias ativas (50). Já na enzimocosmética indireta, são utilizadas substâncias que atuam sobre as enzimas da pele, estimulando as atividades benéficas ou inibindo as malélicas (51).

As enzimas possuem papel importante na indústria de alimentos e bebidas. As enzimas β -glucanases são empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja e são adicionadas às rações animais para aumentar a digestibilidade das β -glucanas presentes em

grãos como trigo, cevada, aveia e centeio (52-54).

Na panificação, o uso de enzimas é um processo necessário já que as farinhas utilizadas como matéria-prima possuem baixa atividade enzimática. O objetivo final da adição de amilases e proteases na massa do pão é facilitar sua manipulação nas máquinas (misturadores, laminadores, forno). As amilases também são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de açúcar fermentescível na massa, melhorando o paladar e a qualidade da tostagem do pão (55-56).

Na produção de laticínios, dentre as enzimas que coagulam o leite, a quimosina é a mais específica e hidrolisa as ligações peptídicas da K-caseína formadas pelos aminoácidos fenilalanina e metionina (57). Lipases e/ou proteases também são utilizadas na produção de leites e derivados para: modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite, desenvolver sabores característicos, alterar a gordura da manteiga utilizada no preparo de caramelos, requeijões e condimentos (molhos). Proteases têm sido empregadas, ainda, para reduzir o tempo global da cura do queijo, já que este tempo representa um alto percentual dos custos de produção (55).

As enzimas ficina e amilase são utilizadas para facilitar a limpeza das carcaças de camarões com jatos de ar e água, a fim de se obter camarão limpo para ser comercializado. A dextranase, obtida do fungo *Penicillium funiculosum*, é utilizada para remoção do dextrênio do caldo de cana para a produção de açúcar. Já a enzima lipase é adicionada a ossos moídos para que estes sejam desengordurados previamente antes de serem de matéria prima para a produção de gelatinas (55).

Outras aplicações de enzimas na produção de alimentos e bebidas são: produção de xaropes, eliminação da água oxigenada durante o processamento dos alimentos, desdobramento de óleos e gorduras, principalmente em laticínios; remoção do sabor amargo em cítricos, na fermentação do cacau, extração do óleo de oliva, maceração de polpas e na clarificação e extração de sucos e vinhos (58).

FUNGOS COMO PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido (22, 59) e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (9).

A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores atual da Biotecnologia Industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases (60).

A produção de enzimas por fungos ocorre naturalmente durante a infecção do fungo na planta. Muitos fungos fitopatogênicos (aqueles que causam doenças em plantas) produzem enzimas extracelulares importantes, indicativas da patogenicidade, para a degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese (61, 62).

Já outros fungos capazes de produzir enzimas são conhecidos como endofíticos e colonizam o interior de plantas saudáveis, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Esses fungos não causam danos aos seus hospedeiros, ao contrário, os beneficiam atuando como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, controlando-os por meio de competição por nutrientes, produção substâncias antagonistas, parasitando o

patógeno ou induzindo a planta a desenvolver resistências aos patógenos (63).

Segundo Tan e Zou (64) a produção enzimática por fungos endofíticos é variável, estando relacionada à especificidade entre a planta hospedeira e o fungo. Durante o parasitismo dos fungos endofíticos sobre os fitopatogênicos estão envolvidas enzimas hidrolíticas como quitinases e proteases, que atuam sobre o patógeno (63) degradando as paredes celulares de suas hifas (65-67). É relatada ainda a produção de enzimas líticas, como pectinases, celulases e lipases, para facilitar a entrada dos endofitos no tecido vegetal por aberturas naturais ou artificiais (68). Essas enzimas funcionam também como um mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra invasão microbiana e/ou para obter nutrientes do hospedeiro (64).

O conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética de fungos filamentosos tornou possível a exploração de seu imenso potencial para a produção de uma grande variedade de enzimas de aplicação industrial (69). A primeira etapa para produção de enzimas a partir de um microrganismo consiste na identificação e aquisição do microrganismo produtor, que pode ser uma linhagem selvagem ou modificada por genética clássica ou por técnicas de Biologia Molecular (31). Como exemplificado na Tabela 1, muitas enzimas obtidas a partir de fungos selvagens já são produzidas para fins comerciais.

Tabela 1. Enzimas comerciais já obtidas a partir de fungos.

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	dextranase
<i>Chryphonectria parasítica</i>	protease aspártica
<i>Humicola insolens</i>	celulase, β -glucanase, xilanase
<i>Penicillium camembertii</i>	lipase
<i>Penicillium citrinum</i>	lrotease
<i>Penicillium funiculosum</i>	pectinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	lipase

Continuação da Tabela 1-

<i>Rhizopus delemar</i>	glucoamilase
<i>Rhizopus niveus</i>	glucoamilase, protease
<i>Rhizopus oryzae</i>	aminopeptidase, glucoamilase, lipase
<i>Talaromyces emersonii</i>	β -glucanase
<i>Trichoderma reesei</i>	celulase, xilanase
<i>Trichoderma viride</i>	celulase

Fonte: European Commission (32). Adaptado de Bon et al. (31)

Considerando que o rendimento da produção de enzimas por fungos selvagens em muitos casos é baixo, a tecnologia do DNA recombinante tornou possível um aumento significativo do rendimento da enzima produzida por meio da introdução de múltiplas cópias do gene que codifica para a enzima de interesse. Nesta técnica, enzimas codificadas por genes de

origem animal, vegetal ou microbiana são introduzidos em microrganismos hospedeiros bem adaptados à fermentação em larga escala (31, 32, 70-73). Como exemplificado na Tabela 2, algumas enzimas obtidas a partir de fungos recombinantes já são produzidas para fins comerciais.

Tabela 2. Enzimas comerciais produzidas por fungos recombinantes, onde o fungo hospedeiro recebeu de um fungo doador o gene de interesse para a expressão da enzima comercial.

Fungo hospedeiro	Fungo doador	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	arabinofuranosidase, catalase
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Peniophora</i> sp.	fitase
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Myceliophthora</i> sp.	celulase, lacase
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizomucor</i> sp.	lipase, protease
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	aminopeptidase
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	β -glucanase

Fonte: European Commission (32). Adaptado de: Bon et al. (31)

A manutenção e estocagem da linhagem microbiana utilizada para a produção de enzimas são etapas de extrema importância e requerem um minucioso e permanente trabalho de Microbiologia Industrial, a fim de assegurar viabilidade do microrganismo, a reprodutibilidade dos resultados experimentais obtidos em trabalhos de pesquisa e prevenir mudanças genéticas que levem à redução ou perda de propriedades fenotípicas ou bioquímicas. São diversas as técnicas de manutenção e conservação de microrganismos, dentre elas repicagens periódicas, conservação em parafina ou glicerol, liofilização e crioconservação (2, 74).

Segundo Paiva e Sá-Pereira (48), a descoberta de uma nova enzima significa encontrar uma nova função microbiana, portanto, o maior número possível de microrganismos deve ser investigado. Assim, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, para a obtenção de enzimas a partir de outros fungos filamentosos, como mostram os exemplos a seguir. Pitson et al. (75) estudaram as glucanases do fungo filamentoso

Acremonium persicinum, mostrando a relação existente entre β -glucanases e β -glucosidases, em que os produtos de hidrólise das β -1,3 e β -1,6 glucanases são degradados pelas β -glucosidases, gerando oligossacarídeos, principalmente glucose.

Um estudo feito por Maria, Sridhar e Raviraja (76) avaliou a produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos (*Acremonium* sp., *Alternaria chlamydosporus*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp.) isolados de plantas de mangue (*Acanthus ilicifolius* e *Acrostichum aureum*) na Índia, utilizando o processo de fermentação em estado sólido. A produção de celulase e lipase foi observada em todos os fungos, enquanto amilase e protease em apenas quatro isolados.

Segundo Do Canto e Menezes (77), embora o Brasil importe a maior parte das enzimas que utiliza, o país possui um enorme potencial para esta produção, devido à abundância de matéria orgânica existente

(resíduos agrícolas, como palha de arroz, bagaço de cana, etc.) que pode ser utilizada como substrato de baixo custo para fermentações e também, devido à enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial.

Sena et al. (22) destacam que a região do semiárido baiano possui uma diversidade biológica ainda pouco explorada, com organismos resistentes a condições extremas e, em consequência, enzimas de enorme potencial para aplicação industrial. Estes autores testaram 20 fungos filamentosos, ainda não identificados, quanto a produção de enzimas a partir da fermentação em meio líquido, sendo que 12 apresentaram produção de protease. Apenas dois fungos produziram pectinase e três produziram celulase.

Luz et al. (78) avaliaram a produção enzimática de 29 fungos endófitos isolados de pinha (*Annona squamosa*) e graviola (*Annona muricata*) em Pernambuco, incubando os fungos em placas de Petri contendo o meio de cultura da enzima específica e medindo-se os diâmetros dos halos de degradação enzimática. Dezenove fungos (65,5%) de diversos gêneros (*Acremonium*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Nigrospora* e *Phomopsis*) apresentaram a produção de lipase. Já para a produção de protease, apenas cinco isolados (17,2%), dos gêneros *Acremonium*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cylindrocladium*, apresentaram resultado positivo. Nenhum endófito testado produziu as enzimas hidrolíticas extracelulares celulase e amilase, comuns em fungos fitopatogênicos, o que indica que os endófitos isolados não apresentam enzimas relacionadas à patogenicidade.

Já Souza et al. (23) testaram a produção de enzimas por basidiomicetos da Amazônia a partir da fermentação em meio líquido contendo substratos indutores. Como resultados, o fungo *Pycnoporus sanguineus* se destacou como melhor produtor de proteases, fenoloxidasas e pectinases; já o fungo *Trametes* sp. foi o melhor produtor de amilases e celulases. A obtenção destas enzimas foi influenciada pela utilização de substratos indutores: entre outras fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura, o farelo de trigo favoreceu a produção de amilases que apresentaram os maiores halos de degradação de amido em meios sólidos adequados à sua

deteção. Já em relação às proteases, os maiores halos de degradação foram provenientes de enzimas obtidas no cultivo dos fungos em meio suplementado com proteínas presentes em um concentrado de peixe.

Recentemente, Baptista et al. (79) demonstraram uma alta taxa de produção das enzimas lignina peroxidase e lacase, por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*, quando utilizados individualmente ou em consórcio, em meios de cultura líquidos contendo óleo diesel como fonte de carbono. Como o óleo diesel é uma mistura complexa de alcanos e compostos aromáticos que frequentemente são reportados como contaminantes de solo através de derrames acidentais, estes fungos possuem potencial para utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados com resíduos de petróleo e/ou derivados.

Segundo Miranda et al. (80) os fungos mitospóricos são importantes degradantes de compostos orgânicos devido principalmente a atividade da enzima lacase. Em estudo na degradação de efluentes da indústria têxtil no município de Caruaru - PE, foi feita a quantificação de três principais enzimas lignolíticas, manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase, mostrando que os quatro fungos estudados (*Aspergillus* sp., *Curvularia lunata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes*) são produtores de lacase provavelmente devido a presença de cobre no meio de cultura assim como nos efluentes estudados, os mesmos também apresentam fácil cultivo e crescimento rápido.

COMENTÁRIOS

Apesar do histórico existente do estudo de enzimas de outras origens que não microbiana e do importante número de importações de enzimas realizado em nosso país, trabalhos como os citados acima confirmam que o Brasil possui uma enorme diversidade de microrganismos que podem ser explorados para a produção de diferentes enzimas de interesse industrial nas mais diversas áreas.

Ravely Casarotti Orlandelli, Vânia Specian, Aretusa Cristina Felber, João Alencar Pamphile*

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá
Av Colombo, 5790. Departamento de Biologia Celular e Genética, Bloco
H67, Laboratório de Biotecnologia Microbiana.
Jardim Universitário, CEP: 87020-900 - Maringá - Paraná - Brasil.
E-mail: prof.phamphile@gmail.com

Recebido em 28/05/2012

Revisado em 21/09/2012

Aceito em 16/10/2012

REFERÊNCIAS

- (1) LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.
- (2) SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.
- (3) HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts: an introduction**. Berlin: Springer Verlag, 1988.
- (4) EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESYA, B.; CARUPT, P. A. Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. **Journal of Pharmaceutical Science**, Hoboken, v. 80, n. 8, p. 744-749, ago. 1991.
- (5) ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J. H. Use of snake as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, out. 1990.
- (6) DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, jan. 1991.
- (7) PATEL, R. N. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 31, n. 6, p. 804-826, nov. 2002.
- (8) PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 7, p. 1077-1082, fev. 2003.
- (9) COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- (10) VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.
- (11) FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- (12) FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.
- (13) WOICIECHOWSKI, A. L. **Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda* obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L [+] láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae***. 1997. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.
- (14) RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de

- proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan./abr. 2001.
- (15) ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 5, p. 525-528, jan. 2004.
- (16) KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**, New York, v. 84, n. 3, p. 207-211, set. 2002.
- (17) MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M. M. C.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR, M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, New York, v. 76, n. 1, p. 23-27, jan. 2001.
- (18) MAHADIK, N. D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 12, p. 2031-2034, out. 2004.
- (19) PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, 2006.
- (20) PRIEST, F. G. **Extracellular enzymes**. London: Van Nostrand Reinhold, 1984.
- (21) JENNINGS, D. H. Inorganic nutrition. In: BERRY, D. R. (Ed.). **Physiology of industrial fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988. p. 76-96.
- (22) SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, jul./dez. 2006.
- (23) SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 116-124, dez. 2008.
- (24) KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.14, p. 93-100, maio 2003.
- (25) LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 29, p. 258-263, set. 2001.
- (26) SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 734-738, mar. 2006.
- (27) PHADTARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 15, n. 1, p. 72-76, jan. 1993.
- (28) FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agrossistemas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- (29) KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**, New York, v.84, p. 207-211, set. 2002.
- (30) GERHARTZ, W. **Enzymes in industry: production and applications**. New York: VHC Publishers, 1990.
- (31) BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

- (32) EUROPEAN COMMISSION. **Collection of information on enzymes – final report**. Contract no. B4-3040/2000/278245/MAR/E2, 2002. Disponível em <<http://europa.eu.int/comm/environment/dansub/enzymerepcomplete.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2012.
- (33) COUTO, S.; SANROMAN, M. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 76, n. 3, p. 291-302, out. 2006.
- (34) ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. 2001. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- (35) IGNATIUS, N. F. J. **Process control of solid-state fermentation: simultaneous control of temperature and moisture content**. 2002. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Wageningen Universiteit, Wageningen, 2002.
- (36) RODRIGUEZ COUTO, S.; SAROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-219, fev. 2005.
- (37) RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- (38) PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. **Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001.
- (39) SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, jul. 2005.
- (40) MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 5, p. 715-721, dez. 2002.
- (41) PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- (42) ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, New York, v. 54, n.1, p. 85-87, jan. 1995.
- (43) SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. **Janus**, Lorena, n. 4, p. 164-183, 2º sem. 2006.
- (44) SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- (45) ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 405-412.
- (46) ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 179-204.
- (47) WISEMAN, A. **Handbook of enzyme Biotechnology**. New York: John Wiley Sons, 1985.
- (48) PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da Biologia Molecular no aprimoramento da produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 29-53.
- (49) MAURER, K. H. Detergents proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, n. 3, p. 330-334, ago. 2004.

- (50) SIM, Y. C.; NAM, Y. S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I. S.; RHEE, J. S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, Berlin, v. 58, n. 4, p. 252-256, abr. 2003.
- (51) FOX, C. A baby care skin protectant. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, n. 8, p. 34-38, ago. 2005.
- (52) McCARTHY, T. C.; LALOR, E.; HANNIFFY, O.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Comparison of wild-type and UV-mutant β -glucanase-producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 32, n. 4, p. 125-134, abr. 2005.
- (53) GIESE, E. C. **Produção de beta-glucanases por *Trichoderma harzianum* Rifai para obtenção de gluco-oligosacarídeos a partir de botriosferana.** 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2008.
- (54) KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345-351, ago. 2002.
- (55) VITOLO, M. 2001. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). **Biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 387-420.
- (56) VAN DAM, H. W.; HILLE, J. D. R. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 37, n. 3, p. 245-252, mar. 1992.
- (57) USTUNOL, Z.; HICKS, C. L. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 7, p.8-16, jan. 1990.
- (58) COURI, S.; PARK, Y.; PASTORE, G.; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 153-178.
- (59) GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.
- (60) MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da α -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas.** 2005. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- (61) BATEMAN, D. F.; BASHAM, H. G. Degradation of plant-cell walls and membranes by microbial enzymes. In: HEITEFUSS R.; WILLIAMS, P. H. (Eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology. New Series: Physiological Plant Pathology.** New York: Springer-Verlag, 2001. p. 316-355.
- (62) SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S. L.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 20, n. 3, p. 649-655, jul./set. 2006.
- (63) PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, nov./dez. 2002.
- (64) TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 18, p. 448-459, ago. 2001.
- (65) ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, ago. 2007.
- (66) GUTHRIE, J. L.; CASTLE, A. J. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, n. 10, p. 961-967, out. 2006.
- (67) SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA,

- J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. J. In vitro antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, The Hague, v. 163, n. 1, p. 49-58, jan. 2007.
- (68) POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 8, p. 1815-1823, ago. 1991.
- (69) TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; DE MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FELIPE, M. S. S. O uso de leveduras e fungos filamentosos para a expressão heteróloga de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 55-70.
- (70) ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, n. 3, p.191-199, set. 2003.
- (71) OLEMPKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 45, n. 2, p. 144-158, jul. 2006.
- (72) PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 2, p.126-132, nov. 2005.
- (73) PUNT, P. J.; VAN BIEZEN, N.; CONESA, A.; ALBERTS, A.; MANGNUS, J.; VAN DEN HONDEL, C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 200-206, maio 2002.
- (74) DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Technology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986.
- (75) PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 21, n. 3, p. 182-190, ago. 1997.
- (76) MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, Thailand, v. 1, n. 1, p. 67-80, jun. 2005.
- (77) DO CANTO, W. L.; MENEZES, T. J. B. Estudos econômicos – alimentos processados. **Produção, usos e mercado de enzimas**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995.
- (78) LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 128-134, abr./jun. 2006.
- (79) BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C., ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 8, n. 1, p. 1-7, jan. 2012.
- (80) MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; GOUVEIA, E. R.; MACHADO, K. M. G.; GUSMÃO, N. B. Decolorization of laundry effluent by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 18, p. 4216-4224, mar. 2012.