

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO NO
CAMPUS DA UFAM PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.**

Bolsista: Flávia de Carvalho Paiva, FAPEAM

MANAUS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB – B/0002/2008

**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO NO
CAMPUS DA UFAM PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.**

Bolsista: Flávia de Carvalho Paiva, FAPEAM

Orientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS

2009

RESUMO

As enzimas hidrolíticas são amplamente empregadas nas mais diversas indústrias, como por exemplo, na indústria têxtil, de detergentes, alimentícia, de papel e de couro. Algumas importantes hidrolases são as enzimas amilases, proteases, xilanases e celulasas. A demanda por enzimas fúngicas de uso industrial é crescente, pois estes oferecem vantagens, como: crescimento rápido em espaço limitado; utilização de substratos baratos; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e através da manipulação genética das linhagens. Nesta situação, a região Amazônica mostra-se como um largo campo de estudos, apresentando grande potencial fúngico para contribuir com o setor industrial. Com o intuito de selecionar microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas e proteolíticas, o potencial enzimático de fungos filamentosos amazônicos isolados do solo no Campus da UFAM foi avaliado através de testes qualitativos e quantitativos, para isso foi obtido o extrato enzimático bruto dos fungos por meio do crescimento em meio líquido contendo farelo de trigo como substrato, o qual foi utilizado para determinação enzimática qualitativa e quantitativa das referidas enzimas e para a determinação da concentração de Proteínas totais. Dos fungos isolados, 20 foram avaliados quanto à capacidade em produzir as enzimas de interesse, por causa da diversidade fúngica analisada houve grande variação nos resultados.

PALAVRA-CHAVE: Enzimas hidrolíticas; Fungos filamentosos; Região Amazônica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	8
3. REFERENCIAL TEÓRICO	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Coleta dos fungos	14
4.2. Indução da produção de enzimas e obtenção do extrato enzimático	14
4.3. Determinação enzimática qualitativa	15
4.4. Determinação enzimática quantitativa	16
4.4.1. Determinação de Proteínas totais	16
4.4.2. Determinação das enzimas celulolíticas	16
4.4.3. Determinação das enzimas xilanolíticas	17
4.4.4. Determinação das enzimas amilolíticas	17
4.4.5. Determinação das enzimas proteolíticas	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Enzimas xilanolíticas	22
5.2. Enzimas amilolíticas	27
5.3. Enzimas proteolíticas	31
5.4. Enzimas celulolíticas	35
6. CONCLUSÕES	39
AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS	41
CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	47

Todo homem, por natureza, quer saber.

Aristóteles

1. INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações com as questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia têm incentivado a busca de tecnologias “limpas”, sofisticadas e baratas. Neste contexto, a tecnologia enzimática tem ganhado espaço, isoladas ou juntamente com células íntegras, as enzimas são usadas como biocatalizadores em processos industriais bem como na despoluição ambiental.

A celulose e hemicelulose, dentre os materiais naturais, são biopolímeros abundantes. As transformações destes em açúcares livres podem ser realizadas através da ação de ácidos, bases, compostos oxidantes e enzimas produzidas por microrganismos.

Os microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à diversidade bioquímica, crescimento rápido, com requerimento limitado de espaço, o que diminui o custo de produção em relação às enzimas de origem animal ou vegetal; produção independente de variações sazonais e localização geográfica; utilização de substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo; e pela facilidade de manipulação genética das linhagens, através de evolução dirigida, engenharia de proteínas ou tecnologia do DNA recombinante.

A utilização de enzimas fúngicas permite menor custo de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais e oferece um amplo espectro de características físico-químicas (MANFIO *apud* OLIVEIRA *et al.* 2006). Logo, a identificação de fungos produtores de enzimas com aplicação industrial, a seleção de condições de cultivo ótimas e a caracterização dessas enzimas, constituem linhas de pesquisas importantes, capazes de gerar informações essenciais para o desenvolvimento de processos industriais economicamente mais competitivos. Nesta situação, a região Amazônica mostra-se como um

vasto campo de estudos, apresentando grande potencial fúngico para contribuir com o setor industrial.

Neste contexto o presente trabalho visou isolar fungos filamentosos Amazônicos do solo do campus da UFAM, com potenciais biotecnológicos para degradarem biopolímeros, excretando enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas, xilanases e proteases) em meio líquido de fermentação, utilizando um substrato bastante complexo (farelo de trigo).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar fungos filamentosos produtores de enzimas amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas e proteolíticas.

2.2. Específicos

- Avaliar qualitativamente o potencial das enzimas amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas e proteolíticas excretadas por fungos filamentosos isolados do Campus da UFAM.

- Avaliar quantitativamente o potencial das enzimas amilolíticas, celulolíticas, xilanolíticas e proteolíticas excretadas por fungos filamentosos isolados do Campus da UFAM.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

As enzimas são catalisadores biológicos, normalmente de natureza protéica, que participam de muitas reações bioquímicas, tendo como principal função o controle metabólico. Essas moléculas são bastante específicas e apresentam variados usos e funções. Elas têm sido utilizadas pelo homem desde os tempos mais antigos, hoje oferecem as mais diversas aplicações na indústria biotecnológica, pois comparadas aos catalisadores químicos, apresentam benefícios como alta especificidade, condições suaves de reação e redução de problemas ambientais e toxicológicos (COELHO *et al.*, 2008).

As enzimas mais utilizadas nos processos industriais são as hidrolases ou enzimas hidrolíticas, que catalisam a quebra de grandes biopolímeros em pequenas unidades. São grandemente utilizadas pelas indústrias têxteis, de detergentes, alimentícia, de papel e de couro (KIRK *et al.*, 2002; NIELSEN *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2006). Dentre as hidrolases mais importantes estão às amilases, proteases, xilanases e celulases, empregadas amplamente nas mais diversas indústrias.

As amilases ou enzimas amilolíticas são responsáveis pela degradação da molécula de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Apresenta grande importância biotecnológica nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA e PANDEY *apud* FERNANDES, 2007). O amido é um polissacarídeo de reserva energética presente em diferentes partes das plantas superiores, como grãos, raízes, rizomas, tubérculos, sementes e caules. Tem ampla utilização nos processos industriais, tais como: papelaria, têxtil, farmacêutica, alimentícia, química, agroquímica, de detergentes e atuam como substrato no preparo de meios de fermentação e como fonte renovável de energia, na produção de

biocombustíveis (FRANCO *et al.*, 2003). Os grânulos amiláceos são compostos da mistura de dois polissacarídeos estruturalmente diferentes, a amilose e a amilopectina. A hidrólise do amido ocorre por duas vias diferentes: química (ácidos, calor e pressão) e enzimática, sendo este segundo muito visado pelo mercado mundial. As enzimas amilolíticas são os agentes mais importantes na formação de hidrolisados, pois tem a capacidade de catalisar as reações de quebra das moléculas do amido liberando dextrinas e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. As amilases podem ser classificadas, dependendo do mecanismo de ação na quebra das moléculas, como endo ou exoenzimas, que inclui as principais enzimas amilolíticas: α -amilases e β -amilases (GUPTA *et al.*, 2003; SUMERLY *et al.*, 2003). Além da ampla aplicação das α -amilases no ramo industrial, como alimentício, têxtil, de detergentes, fermentação e papelaria, outro setor está sendo bastante visado nas últimas décadas, o da produção de biocombustível por meio da hidrólise de grão de amido (GUPTA *et al.*, 2003). O etanol é considerado uma fonte de energia renovável na natureza, sendo continuamente produzido pela hidrólise de açúcares durante a fermentação. A utilização de enzimas amilolíticas como fonte alternativa na obtenção de etanol, daria ao Brasil uma maior capacidade de aumentar a produção de biocombustíveis, gerando um grande impacto na economia.

As xilanases ou enzimas xilanolíticas hidrolisam moléculas de xilana, principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas. As enzimas xilanolíticas oferecem diversas aplicações na indústria biotecnológica. Sua aplicação se divide em duas categorias: associada a outras enzimas ou livre. Na primeira categoria, as xilanases são aplicadas na indústria alimentícia, visando clarificação de sucos e vinhos, fabricação de pães e na etapa da filtração da cerveja rompendo sólido em suspensão (BIELY, 1985; VAN DER BROECK *apud* MACIEL, 2006). Na segunda categoria a aplicação de xilanases ocorre nas indústrias têxtil (desengomagem de fibras naturais) e de celulose e papel. O interesse em

enzimas degradadoras de xilana cresceu muito nos últimos anos, especialmente devido ao potencial de aplicação biotecnológico dessas enzimas, pois as mesmas estão associadas às celulases, ambas tornam-se capazes de remover paredes celulares vegetais, liberando o seu conteúdo, para ser utilizado em processos de produção de substâncias responsáveis por sabor ou aroma, na extração de polissacarídeos e proteínas de sementes e folhas, ou produzindo protoplastos de plantas superiores para uso em pesquisas genéticas. Estas associações enzimáticas também podem ser utilizadas em indústrias alimentícias para o melhoramento da extração a frio de óleo de sementes, produção de sucos de frutas e vegetais, clarificação de sucos de frutas, melhoramento da reidratação de vegetais secos e fabricação de café solúvel, chá e vinho. Entretanto, existem algumas áreas de aplicação das enzimas xilanolíticas nas quais as atividades celulolíticas devem estar ausentes, como exemplo, a obtenção de polpa de celulose e seu branqueamento, na indústria de papel, bem como no processamento de fibras de plantas como o linho, cânhamo e juta em indústria têxtil (FERREIRA-FILHO, 1994, HALTRICH *et al.*, 1996; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). Na indústria de papel, as xilanases vêm sendo utilizadas no pré-branqueamento de polpas “kraft” , facilitando a remoção de lignina, e reduzindo o grau de polimerização do xilano residual, com conseqüente redução da demanda de cloro requerido durante o processo e da liberação de organo-clorados nos efluentes (CLARKE *et al.*, 1997). Portanto, as xilanases possuem um grande potencial para aplicações biotecnológicas, sendo utilizadas na clarificação de sucos de frutas e vinhos, em panificação, na conversão de xilana contida em materiais lignocelulósicos em xilose e principalmente, na etapa de biobranqueamento em indústrias de papel e celulose, diminuindo o impacto ambiental causado por este setor industrial.

As celulases ou enzimas celulolíticas hidrolisam a celulose e seus derivados gerando moléculas de glicose. Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, como: extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais,

aromatizantes e do amido da batata doce, e ainda, participam dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG *apud* RUEGGER *et al.*, 2004). Na indústria têxtil são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras soltas e microfibrilas compostas basicamente de celulose e também são usadas no processo de desbotamento do jeans (MUSSATTO *et al.* 2007). Podem ser utilizadas também na biodegradação de componentes das indústrias de polpa e de papel (QUEIROZ *et al.* 2002). De acordo com o modo de ação, os componentes dos sistemas de celulases são geralmente classificados como: endoglucanases (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolases, EC 3.2.1.4); exoglucanases, incluindo celodextrinases (1,4- β -D-glucan glucanohidrolases, EC 3.2.1.74) e celobiohidrolases (1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, EC 3.2.1.91); e β -glicosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolases, EC 3.2.1.21). Endoglucanases clivam ao acaso ligações internas de regiões amorfas das cadeias de celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos, e por essa razão quantificadas com substratos solúveis, como carboximetilcelulose. Exoglucanases atuam de modo processivo, hidrolisando ligações nas extremidades redutoras ou não redutoras, liberando glicose ou celobiose como principais produtos (Figura 1), sendo quantificadas com o uso de substratos cristalinos como avicel (LYND *et al.*, 2002).

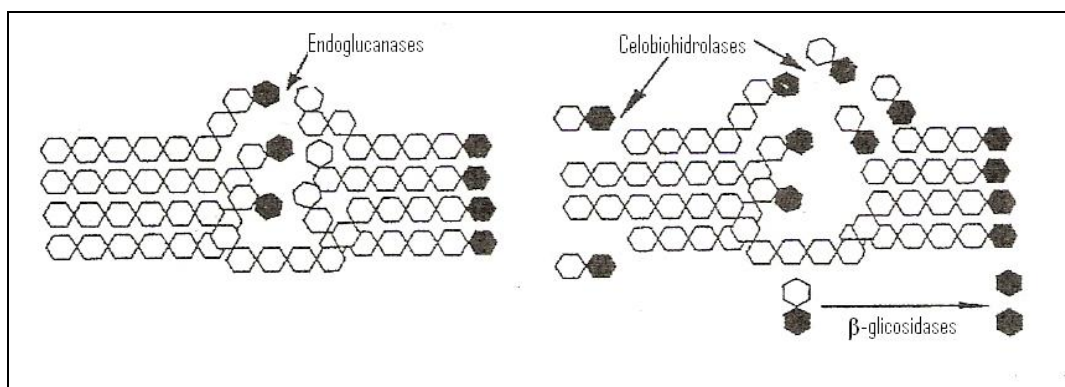


Figura 1 – Ação das enzimas celulolíticas. FONTE: Béguin & Aubert, 1994.

As Proteases ou enzimas proteolíticas são responsáveis pela clivagem de proteínas, sendo que a característica de ação da protease pode variar em função de sua origem e estrutura química. São enzimas que exibem diversas funções nos mais variados setores, cerca de 60% do mercado mundial de enzimas hidrolíticas corresponde à aplicação de proteases na indústria (DIAS, 2007). Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras. Certas modificações específicas e seletivas de proteínas durante a ativação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colabora no transporte de proteínas secretórias na membrana. As proteases têm também uma variedade de aplicações, principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição (RAO *et al.*, 1998).

Os fungos representam a principal fonte de enzimas, pois são capazes de sobreviver nos mais variados ambientes e oferecem muitas vantagens, como: crescimento rápido em espaço limitado; produção independente de variações sazonais e localização geográfica; utilização de

resíduos agrícolas e agroindustriais; diversidade bioquímica; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e através da manipulação genética das linhagens (GODFREY & WEST, 1996; RAO *et al.*, 1998; SCHIMID *et al.*, 2001; KIRK *et al.*, 2002). Esses fatores aliados a preocupação com o meio ambiente, a viabilidade do processo de produção e a qualidade do produto tornou crescente a demanda por enzimas fúngicas de uso industrial (PANDEY *apud* FERNANDES 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta dos fungos

Os fungos foram coletados de vários pontos do solo da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) nas proximidades do mini-campus, o qual apresenta características de um Latossolo Amarelo distrófico, de textura argilosa e pH ácido. Após coletados os microrganismos foram plaqueados em meio Agar Dextrose Batata (BDA), contendo clorafenicol como antibiótico, através de diluições sucessivas no meio de cultura e em seguida incubadas a temperatura ambiente. O crescimento das colônias foi acompanhado a cada 24 horas. Após o crescimento, as colônias de fungos passaram por sucessivos repiques até a obtenção de colônias puras. E, em seguida preservadas em água destilada (CASTELLANI, 1939).

4.2. Indução da produção de enzimas e obtenção do extrato enzimático

Para induzir a produção das enzimas os fungos foram inoculados em meio Czapek modificado, contendo 3 g/L de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,0 g/L de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4), 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,5 g/L de cloreto de potássio (KCl), 10 mg/L de sulfato ferroso hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 10 g/L de farelo de

trigo como fonte de carbono. Em quadruplicata, foi obtido o extrato enzimático bruto dos fungos isolados, ainda não identificados, para futuras determinações enzimáticas e de proteínas totais através de testes qualitativos e quantitativos. Para isso, discos com 1,0 cm de diâmetro do meio sólido BDA, a qual permitiu a produção de diferentes enzimas pelos fungos. Foram mantidos por cinco dias em condições estacionárias a temperatura ambiente, após esse período a biomassa foi separada do extrato enzimático (ou filtrado de cultura) por filtração a vácuo e por centrifugação (4.000 g/10 minutos), obtendo-se assim o filtrado de cultura ou extrato enzimático bruto.

4.3. Determinação enzimática qualitativa

A determinação qualitativa da atividade enzimática foi realizada em duplicata por meio do método de “cup-plate” modificado, em meios de cultura sólido contendo 20g/L de ágar e 10g/L do substrato indutor como fonte de carbono, os quais foram: amido para amilase, carboximetilcelulose (CMC) para celulase, leite desnatado para protease e xilano de aveia para xilanase. Em seguida foram incubados a aproximadamente 30°C por 24 horas, sendo acompanhado a cada 12 horas.

A seleção dos fungos produtores das referidas enzimas foi visualizada com formação de halos de degradação enzimática, com a adição de soluções corantes no meio de cultivo de acordo com a enzima analisada: solução de iodo a 0,1 N ou vapores de iodo para amilase; vermelho congo a 0,1% para celulase e xilanase. A protease não necessita de solução corante, a medida que o leite é degradado pela enzima o halo enzimático fica bem visível a olho nú. Com o aparecimento de halos, a atividade hidrolítica dos fungos foi estimada semi-quantitativamente, usando um índice enzimático (IE), o qual é expresso pela relação do diâmetro médio do halo de degradação e do diâmetro do cup-plate (HANKIN, L. e ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975).

4.4. Determinação enzimática quantitativa

As determinações quantitativas das atividades enzimáticas e de proteínas foram feitas em triplicata.

4.4.1. Determinação de Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada através do método descrito por Lowry (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

4.4.2. Determinação das enzimas celulolíticas

Para determinação da atividade de enzimas celulolíticas serão determinadas as atividades endoglucanase e β -glucosidase. A atividade endoglucanase ou CMCase consistiu na adição de 50 μ L do extrato enzimático bruto mais 50 μ L do substrato carboximetilcelulose a 1% em meio tamponado e incubado por 30 minutos a 50°C. A reação foi interrompida com 300 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e mantida por cinco minutos em banho fervente para desativar a enzima. Em seguida adicionou-se 1,5 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita de acordo com Miller (1959), utilizando glicose como padrão, onde uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de grupos redutores (glicose) por minuto.

A atividade celulolítica de β -glucosidase foi dosada pelo método de Berghem's & Pettersson (1974) modificado, através da incubação por 10 minutos a 50 °C de 50 μ L do extrato enzimático bruto com 200 μ L do substrato *p*-nitrofenil (*p*-PNP) a 0,2% em meio tamponado, a atividade enzimática foi interrompida com 500 μ L de bicarbonato de sódio a 10%, em seguida adicionou-se 1.750 μ L de água destilada e a liberação de *p*-PNP foi mensurada no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade internacional (IU) de atividade

de β -glucosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de p -PNP por minuto sob as condições do ensaio, utilizando p -PNP como padrão.

4.4.3. Determinação das enzimas xilanolíticas

A atividade xilanolítica foi determinada por meio da incubação de 100 μL do filtrado de cultura com 750 μL de solução de xilano a 1%, mais 300 μL do tampão acetato pH 6,5 50 mM, por 10 minutos a 50 °C, formando o complexo enzima/substrato. Em seguida, adicionou-se a 250 μL do complexo enzima/substrato 250 μL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), deixando por cinco minutos em banho fervente para desativar a enzima, adicionou-se então 2,5 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita segundo Miller (1959) utilizando xilose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de xilose por minuto.

4.4.4. Determinação das enzimas amilolíticas

Para determinação da produção de amilases foi determinada a atividade amilolítica sacarificante através da incubação por 30 minutos a 37 °C 100 μL de solução de amido a 1% em meio tamponado, 50 μL do tampão acetato 50 mM pH 6,0 e 50 μL do extrato enzimático bruto. Após esse período, adicionou-se 1,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) para interromper a reação, deixando por cinco minutos a 100 °C. Em seguida, resfriou em banho de gelo e adicionou-se 3,0 mL de água destilada para mensurar a liberação de maltose no comprimento de onda de 550 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita utilizando maltose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de maltose por minuto (MILLER, 1959).

4.4.5. Determinação das enzimas proteolíticas

A determinação da atividade proteolítica foi determinada por meio do método de Leighton et al. (1973) modificado, sendo dosada através da incubação 30 μ L do filtrado de cultura com 50 μ L solução de azocaseína 1% (ou caseína) em meio tamponado a 45 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 240 μ L de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm. Em seguida neutralizou-se adicionando 160 μ L do sobrenadante e 280 μ L de NaOH 1M e foi feita a leitura no comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001 por minuto em uma hora a 440 nm (para azocaseína) ou 280 nm (para caseína), sendo expressa em U/mL.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O solo é um dos ambientes no qual se encontra uma enorme diversidade de microrganismos, desta forma foram coletados fungos do solo da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde 20 isolados fúngicos foram avaliados qualitativamente e quantitativamente quanto à capacidade em produzir enzimas amilolíticas, xilanolíticas, proteolíticas e celulolíticas em meio líquido sintético suplementado com farelo de trigo como fonte de carbono, o qual se mostrou como um ótimo substrato capaz de induzir a produção de diferentes hidrolases pelos microrganismos (Figura 2).

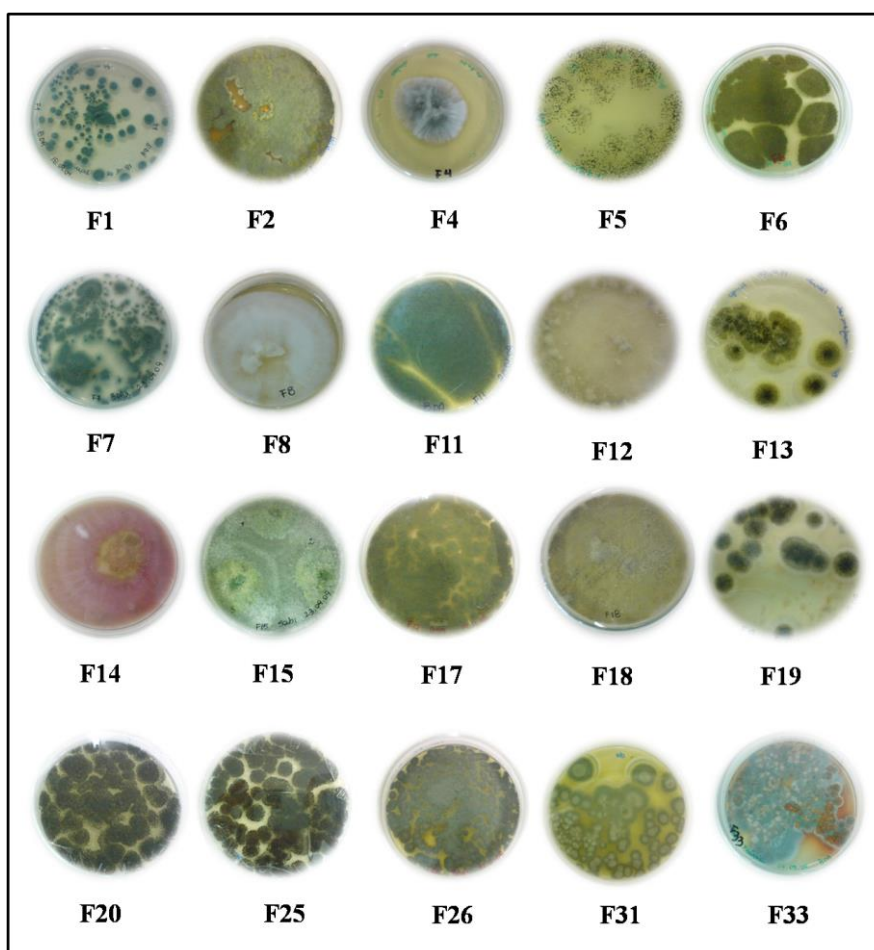


Figura 2 – Fungos isolados do solo da Universidade federal do Amazonas (UFAM).

FONTE: Paiva, 2009.

As enzimas avaliadas neste estudo podem ser obtidas de animais, vegetais, bactérias, fungos e leveduras, com ampla aplicação nos diversos setores da indústria. As principais indústrias consumidoras de enzimas são: indústrias de detergente, processamento de amido, laticínios, cervejarias, sucos de frutas e vinhos, panificação, têxtil e papel, couro, entre outras indústrias (LIMA *et al*, 2001).

Para a determinação enzimática qualitativa a zona mais clara ao redor do “cup plate” corresponde ao halo indicador de degradação enzimática, através do qual foi possível estabelecer o índice enzimático (I.E.), demonstrando a capacidade dos fungos em degradar os substratos de acordo com a enzima analisada (xilano de aveia para xilanases, amido para amilases, leite desnatado para proteases e carboximetilcelulose para celulasas), como foi descrito no item 4.3.

Para a determinação quantitativa das enzimas avaliadas os procedimentos utilizados estão descritos no item 4.4., através dos quais foi possível definir a atividade enzimática em unidade por mL (U/mL) a concentração de proteínas (mg/mL) e a atividade específica em unidade por miligrama de proteína (U/mg proteína) nas condições de ensaio utilizadas.

Todos os fungos filamentosos exibiram atividade para mais de uma enzima em meio líquido contendo farelo de trigo, essa versátil atividade enzimática tem sido mostrada por diversos fungos em outros estudos. Por se tratar de diferentes isolados fúngicos a produção de enzimas variou de acordo com o microrganismo.

Comparando os resultados dos testes quantitativos com os qualitativos foi observado que o valor do índice enzimático (I.E) neste estudo não foi um parâmetro confiável, para a seleção de fungos filamentosos produtores das referidas enzimas. Onde, para alguns fungos foram observados resultados contrários nos testes, de forma que um mesmo fungo apresentou resultado negativo no teste qualitativo e positivo para o teste quantitativo da mesma enzima. Isso demonstrou que, o tamanho do halo produzido nos testes qualitativos, ou o valor do índice

enzimático, nem sempre correspondeu a atividade enzimática quantitativa, isso pode ter ocorrido devido as condições utilizadas para a fermentação não serem as condições ótimas de cultivo necessárias para cada isolado fúngico (como por exemplo, temperatura, tempo, nutrientes, pH, etc.). Esta mesma situação também foi observada por MACIEL (2006) no desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xilanases utilizando bagaço de cana e farelo de soja, por isso torna-se extremamente importante a realização de testes quantitativos antes de descartar microrganismos que podem ser propícios produtores de hidrolases extracelulares.

Até o momento, apenas doze dos fungos manipulados tiveram o seu gênero identificado por meio da caracterização morfológica (Tabela 1), levando em consideração as suas características microscópicas e macroscópicas. Porém, devido à grandiosidade do trabalho o período de um ano não foi suficiente para dar continuidade à identificação dos fungos isolados, portanto a não identificação das espécies fúngicas trabalhadas tornou difícil a comparação dos resultados obtidos com atividades padronizadas de outros fungos com espécies definidas. Sendo necessária a realização de estudos mais precisos, como por exemplo, a taxonomia molecular, para a identificação das espécies estudadas.

Mas, vale ressaltar que, o intuito deste estudo foi selecionar fungos filamentosos provenientes de solo amazônico, bons produtores de pelo menos uma das enzimas avaliadas, para que estes pudessem servir como base em outros estudos de purificação e de otimização das condições ótimas de cultivo dos complexos enzimáticos produzidos. Portanto, os fungos isolados e avaliados neste estudo, estão mantidos na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da UFAM e aqueles que apresentaram as melhores atividades enzimáticas estão sendo utilizados e serão posteriormente identificados em outros estudos desta unidade de pesquisa.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível selecionar três isolados fúngicos de maior destaque (F6 e F7 para produção de xilanase e F19 para produção de β -glucosidase) para futuros estudos de purificação e das condições ótimas de cultivo da enzima produzida por estes

microrganismos, que estão sendo realizados por outros membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM/UFAM.

Tabela 1 – Identificação do gênero dos isolados fúngicos.

Isolados fúngicos	Gênero	Isolados fúngicos	Gênero
F1	<i>Penicillium</i>	F14	<i>Fusarium</i>
F2	Não definido	F15	<i>Trichoderma</i>
F4	Não definido	F17	<i>Aspergillus</i>
F5	<i>Aspergillus</i>	F18	Não definido
F6	<i>Aspergillus</i>	F19	<i>Aspergillus</i>
F7	<i>Penicillium</i>	F20	<i>Aspergillus</i>
F8	Não definido	F25	<i>Aspergillus</i>
F11	Não definido	F26	Não definido
F12	Não definido	F31	Não definido
F13	<i>Aspergillus</i>	F33	<i>Penicillium</i>

FONTE: Paiva, 2009.

5.1. Enzimas xilanolíticas

A importância da enzima xilanase se dar devido a sua vasta aplicação no setor industrial, a qual pode ser aplicada livre de celulasas nas indústrias têxtil e de celulose e papel, ou associada a outros polissacarídeos como celulasas e pectinases na indústria de alimentos (BIELY, 1985).

Dos microrganismos isolados 95% apresentaram atividade para a enzima xilanase (E.C.3.2.1.8.), destes treze fungos obtiveram resultados positivos no ensaio qualitativo e 19

fungos demonstraram atividade xilanolítica nos testes quantitativos, tais resultados comprovam a maior confiabilidade da determinação quantitativa.

Na determinação qualitativa a reação positiva foi visualizada com ou sem a adição da solução reveladora, vermelho congo a 1%, na superfície do ágar, neste último caso o halo tornou-se visível ao colocar a placa de Petri contra a luz (Figura 3). Dos fungos analisados os treze que obtiveram resultado positivo, manifestaram I.E. variando de 0,1 a 1,1 (Tabela 2).

A determinação xilanolítica quantitativa foi realizada pelo método de Miller (1959) utilizando xilose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de xilose (açúcar redutor) por minuto. Os 19 fungos que apresentaram a capacidade de excretar xilanase em meio líquido, contendo farelo de trigo como fonte de carbono, demonstraram resultados diversos, exibindo atividade enzimática que variou de 1,67 U/mL a 45,96 U/mL. Nas condições de ensaio utilizadas os fungos dos gêneros *Penicillium* (F7, F11, F33 e F1) e *Aspergillus* (F6, F5, F13, F20 e F19) destacaram-se com as maiores atividades xilanolíticas (Tabela 2).

De acordo com a literatura consultada as xilanases podem ser obtidas a partir de vários fungos filamentosos, como por exemplo, fungos do gênero: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Talaromyces*, entre outros (KHENG, 2005; PANDEY, 1999). No entanto, a produção de xilanase comercial se concentra principalmente nos fungos *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

Neste estudo, o isolado F7, *Penicillium sp.*, apresentou ótimos resultados na produção de xilanase tanto no índice enzimático do teste qualitativo (1,0) , quanto nos testes analíticos para a atividade em U/mL (45,96 U/mL) e atividade específica (133,99 U/mg de proteína). Estes resultados comprovam, juntamente com outros autores, que muitas espécies deste gênero tem sido estudadas em relação a produção de xilanases, destacando-se *Penicillium*

funiculosum e *Penicillium expansum*, as quais foram cultivadas em meio de cultura contendo carboximetilcelulose e apresentaram atividade enzimática de 15,3 U/mg e 13,9 U/mg, respectivamente (GOMES et al., 2007). Além disso, utilizando meio de cultura contendo farelo de trigo, foi determinada a atividade xilanolítica de 26 U/mg para *P. expansum* e 16 U/mg *P. funiculosum* (MISHRA et al., 1985; QUERIDO et al., 2006). MILAGRES (1994) encontrou variados resultados referentes à produção de xilanases pela espécie fúngica *P. janthinellum* em diferentes fontes polissacarídicas, porém as maiores atividades xilanolíticas foram determinadas em xilana (120 U/mL) e hidrolisado hemicelulósico (98,48 U/mL).

Além do gênero *Penicillium*, este estudo apresentou resultados relevantes na produção de xilanase por fungos do gênero *Aspergillus*, com destaque para o isolado F6 um *Aspergillus* sp. com atividade xilanolítica de 42,37 U/mL, no entanto este fungo apresentou resultado negativo no ensaio qualitativo, isto mostra mais uma vez a grande importância de se fazer o teste quantitativo para determinar a capacidade enzimática do microrganismo antes de descartar um bom produtor de xilanase.

Em outros estudos várias espécies de *Aspergillus* têm sido descritas como produtoras de xilanases, incluindo *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. tamaraii* e *A. fumigatus* (BAILEY AND POUTANEN, 1989; HALTRICH et al., 1996; KADOWAKI et al., 1997; SIEDENBERG et al., 1998). MACIEL (2006) demonstrou que os microrganismos que apresentaram as atividades xilanolíticas mais elevadas foram da espécie *Aspergillus niger*, variando de 110 a 200 U/mL e os maiores índices enzimáticos (de 1,1 a 1,4), utilizando bagaço de cana e farelo de soja. REIS et al. (2003) ao utilizaram diferentes fontes de carbono, encontraram atividades enzimáticas para produção xilanases por *Aspergillus nidulans* bastante diversificadas, com destaque para a produção de xilanase utilizando distintas porcentagens de farelo de trigo, o que variou de 73 U/mL (com 1% do substrato) a 269 U/mL (5% do substrato). E ainda, REIS et al. (2008) utilizando xilano de birchwood 1% e carboximetil celulose 1%, determinaram ótimas atividades xilanolíticas para diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, com destaque para *Aspergillus ochraceus* com 378,3 U/mL.

Na literatura são encontrados vários trabalhos utilizando resíduos industriais e agroindustriais como fonte indutora de xilanase, como por exemplo, bagaço de cana, sabugo de milho, farelo de trigo, entre outros. Tais relatos juntamente com os resultados obtidos neste estudo comprovam o êxito destes substratos, inclusive do farelo de trigo, na produção de xilanases por diferentes espécies de fungos filamentosos.

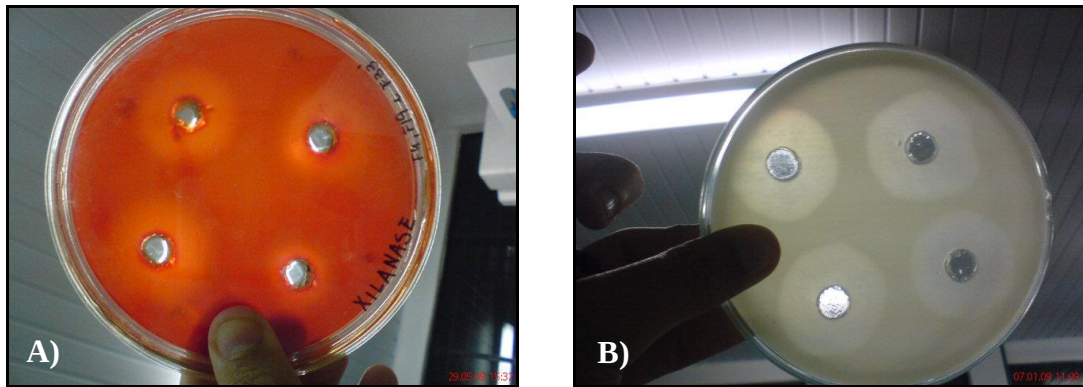


Figura 3 – Resultado positivo para os testes qualitativo para xilanase. A) Com utilização de solução corante; B) Sem a utilização de solução corante. FONTE: Paiva, 2009.

Tabela 2 – Atividades enzimáticas qualitativas e quantitativas dos isolados fúngicos para enzimas xilanolíticas.

Isolados fúngicos	Resultado	Índice enzimático	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
F1	+	0,8 ± 0,0	21,78 ± 1,56	59,37 ± 0,91
F2	-	0	15,36 ± 0,52	22,03 ± 1,33
F4	+	0,1 ± 0,0	3,75 ± 0,04	4,89 ± 1,37
F5	-	0	17,78 ± 0,95	41,01 ± 2,98
F6	-	0	45,96 ± 1,25	35,64 ± 2,67
F7	+	1,0 ± 0,0	42,37 ± 0,26	133,99 ± 9,57
F8	-	0	2,29 ± 0,38	2,86 ± 0,31
F11	+	0,8 ± 0,0	38,37 ± 0,62	31,81 ± 1,61
F12	+	0,7 ± 0,1	20,20 ± 1,16	46,59 ± 3,12
F13	+	0,8 ± 0,0	25,51 ± 0,21	78,33 ± 2,63
F14	-	0	1,67 ± 0,14	1,78 ± 0,02
F15	+	0,4 ± 0,0	14,81 ± 0,30	33,15 ± 3,10
F17	+	1,1 ± 0,1	12,85 ± 1,20	5,50 ± 0,47
F18	-	0	0	0
F19	+	0,6 ± 0,0	16,80 ± 0,99	120,00 ± 8,27
F20	+	0,7 ± 0,0	17,03 ± 0,66	50,07 ± 3,15
F25	+	1,1 ± 0,0	15,23 ± 0,36	24,23 ± 1,01
F26	+	0,4 ± 0,0	5,93 ± 0,59	11,79 ± 0,25
F31	-	0	7,34 ± 0,88	7,76 ± 0,00
F33	+	0,9 ± 0,2	30,93 ± 0,78	52,23 ± 3,32

Onde: I.E. = índice enzimático, (+) indica a presença de halo e (-) a ausência de halo; ND =

atividade não determinada. FONTE: Paiva, 2009.

5.2. Enzimas Amilolíticas

As enzimas amilolíticas apresentam importante papel industrial, podendo ser utilizadas das seguintes formas: como aditivos em detergentes, na sacarificação do amido, na indústria alimentícia, na indústria de papel e na indústria têxtil, entre outras. As amilases podem ser obtidas em microrganismos, animais e plantas (OLIVEIRA *et al*, 2007).

Na determinação qualitativa 18 fungos apresentaram resultados positivos e somente 2 foram negativos. A produção de enzimas amilolíticas foi visualizada com a utilização de vapores de iodo para a revelação dos halos de degradação enzimática ao redor do “cup plate” (Figura 4). Os índices enzimáticos (I.E.) variaram de 0,1 a 0,9, os isolados que apresentaram maiores I.E. foram F7 e F20 (Tabela 3). SOUZA *et al.* (2008) encontraram atividade amilolítica qualitativa de Basidiomycetes da Amazônia, expressas em halos que variaram de 7,0 a 17,5 mm.



Figura 4 – Resultados positivos dos testes qualitativos para Amilases.

FONTE: Paiva, 2009.

Os isolados que obtiveram resultados negativos no teste qualitativo, F15 e F33, exibiram as atividades enzimáticas mais baixas nos ensaios analíticos, como será mostrado a seguir, indicando que tais microrganismos não são bons produtores de amilases, pelo menos

quando se utiliza farelo de trigo como fonte de carbono. Estes resultados negativos da determinação enzimática em meio sólido podem ser explicados pela baixa produção de enzimas amilolíticas como demonstraram os testes quantitativos.

Na determinação quantitativa de amilases, todos os 20 isolados fúngicos exibiram capacidade de produzir Amilases, o que foi comprovado através da determinação da atividade amilolítica sacarificante, realizada pelo método de quantificação de açúcares redutores, utilizando maltose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de maltose por minuto (Miller, 1959). As amilases podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser: endoamilases (α -amilase, CGTase e pululanase) que cortam ao acaso as ligações glicídicas no interior da molécula, e exoamilases (β -amilase e glucoamilase) que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora. A β -amilase é considerada uma enzima sacarificante porque produz açúcares a partir do amido, no caso produz apenas maltose (FOOD INGREDIENTS BRAZIL, 2009).

Todos os microrganismos demonstraram atividade enzimática amilolítica de forma diversificada, a qual alterou de 0,21 a 5,57 U/mL, com destaque para os fungos dos gêneros *Penicillium* (F7 e F11) e *Aspergillus* (F6) que exibiram as atividades enzimáticas mais altas (Tabela 3). As amilases podem ser obtidas de diversas fontes, como plantas, animais e microrganismos, sendo descrito por outros autores a produção de amilases pelos seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *A.niger*, *A.flavus*, *A.awamori*. SILVA et al. (1998) determinaram a atividade para glucoamilase de 18,75 U/mL no filtrado de cultura de *Aspergillus fumigatus*, utilizando farelo de aveia a 2%. HERMANN et al. (2003) por meio de uma fermentação no estado sólido utilizando bagaço de laranja e farelo de arroz, encontraram atividades amilolíticas diversificadas variando 3,29 U/mL a 17,48 U/mL em três dias de fermentação de acordo com os diferentes tratamentos avaliados. GUIMARÃES et al.

(2006) encontraram atividades de amilases extracelulares que variaram de 2,20 U/mL a 160,80 U/mL na avaliação de diversas espécies de fungos filamentosos produtores de enzimas de interesse industrial, com destaque para algumas espécies do gênero *Aspergillus*, especialmente para *Aspergillus phoenicis* que apresentou atividade amilolítica de 118,80 U/mL.

Pode-se considerar que as atividades amilolíticas dos isolados fúngicos avaliados neste estudo foram baixas se comparadas com os resultados demonstrados pelos autores citados acima. No entanto, o uso de diferentes métodos e o fato de os fungos analisados não terem suas espécies reconhecidas, a comparação dos resultados obtidos com atividades enzimáticas padronizadas de outros fungos, inclusive de espécies do gênero *Penicillium*, tornou-se bastante difícil.

Tabela 3 – Atividades enzimáticas qualitativas e quantitativas dos isolados fúngicos para enzimas amilolíticas.

Isolados fúngicos	Resultado	Índice enzimático	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
F1	+	0,4 ± 0,0	0,85 ± 0,07	2,33 ± 0,32
F2	+	0,3 ± 0,0	1,39 ± 0,07	1,99 ± 0,15
F4	+	0,4 ± 0,0	0,33 ± 0,05	0,42 ± 0,06
F5	+	0,4 ± 0,1	1,11 ± 0,06	2,56 ± 0,09
F6	+	0,5 ± 0,1	3,77 ± 0,35	2,91 ± 0,13
F7	+	0,9 ± 0,2	5,57 ± 0,19	17,60 ± 0,55
F8	+	0,1 ± 0,0	0,87 ± 0,01	1,10 ± 0,08
F11	+	0,5 ± 0,1	4,34 ± 0,09	3,60 ± 0,20
F12	+	0,3 ± 0,1	0,27 ± 0,02	0,61 ± 0,04
F13	+	0,2 ± 0,1	1,41 ± 0,07	4,32 ± 0,11
F14	+	0,4 ± 0,1	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,01
F15	-	ND	0,23 ± 0,01	0,52 ± 0,02
F17	+	0,7 ± 0,1	2,01 ± 0,00	0,86 ± 0,00
F18	+	0,5 ± 0,1	0,46 ± 0,01	0,72 ± 0,04
F19	+	0,4 ± 0,0	1,51 ± 0,05	5,70 ± 0,39
F20	+	0,9 ± 0,0	1,44 ± 0,12	4,23 ± 0,46
F25	+	0,6 ± 0,0	1,57 ± 0,14	2,50 ± 0,05
F26	+	0,4 ± 0,1	0,50 ± 0,06	0,99 ± 0,03
F31	+	0,1 ± 0,0	0,59 ± 0,02	0,62 ± 0,05
F33	-	ND	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,01

Onde: I.E. = índice enzimático, (+) indica a presença de halo e (-) a ausência de halo; ND = atividade não determinada. FONTE: Paiva, 2009.

5.3. Enzimas Proteolíticas

As enzimas proteolíticas são extremamente importantes na fisiologia de organismos vivos, pois são responsáveis pela hidrólise total de proteínas, por isso são encontradas em diversas fontes tais como: animais, vegetais e microrganismos. Entre os microrganismos produtores de proteases estão bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Além disso, as proteases possuem uma grande importância comercial, sendo aplicada amplamente na indústria, como por exemplo, na produção de bebidas e alimentos, na formulação de detergentes, no processamento de couro e pele, na formulação de medicamentos e na nutrição animal (RAO *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 1999).

Nos testes qualitativos para enzimas proteolíticas doze fungos (60%) exibiram capacidade em degradar o leite desnatado do meio sólido, apresentando halos enzimáticos translúcidos sem a necessidade de adicionar solução reveladora na superfície do ágar, ou seja, mostrando reação positiva quanto à competência em produzir proteases (Figura 5). Os índices enzimáticos (I.E.) alteraram de 0,1 a 0,7, onde os isolados dos gêneros *Penicillium* (F1 e F7) e *Aspergillus* (F6 e F17) destacaram-se com os maiores valores de I.E. (Tabela 4). TEXEIRA *et al.* (1996) ao avaliarem qualitativamente 142 espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium* quanto a capacidade em produzir proteases, mostraram que as espécies do gênero *Aspergillus* exibiram os maiores índices enzimáticos, com destaque para *Aspergillus flavus*. No entanto as espécies do gênero *Penicillium* também demonstraram bons resultados.

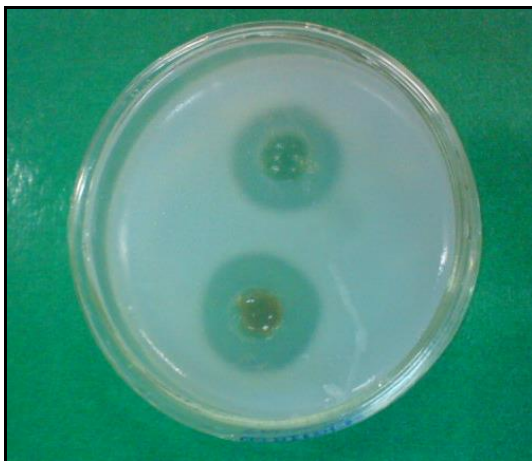


Figura 5 – Resultado positivo do teste qualitativo para Protease.

FONTE: Paiva, 2009.

Na seleção quantitativa de fungos produtores de enzimas proteolíticas foi determinada a atividade de Proteases totais nos 20 isolados fúngicos pelo método de Leighton et al. (1973) modificado, onde uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001 por minuto em uma hora nas condições do ensaio descritas no item 4.4.5. Todos os 20 fungos produziram enzimas proteolíticas, apresentando resultados bem distintos, de tal forma que as atividades enzimáticas variaram de 3,28 a 58,53 U/mL, com destaque para os isolados dos gêneros *Penicillium* (F7 e F11) e *Aspergillus* (F6 e F17) com as atividades enzimáticas mais altas, como demonstra a tabela 4.

Estes resultados são comprovados por outros autores, que demonstraram a capacidade da produção de enzimas proteolíticas pelos mais variados microrganismos, isso ocorre devido à importância fisiológica que as proteases representam na sobrevivência desses seres vivos, tanto que na literatura consultada destacam-se as seguintes espécies de microrganismos: *Aspergillus melleus*, *Aspergillus Níger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Endothia parasítica*, *Lactobacillus casei*, *Micrococcus caseolyticus*, *Mucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Streptomyces fradiae*,

Candida aquática, *Candida intermédia*, entre outros. Entretanto, alguns microrganismos produzem uma quantidade baixa de enzimas dificultando sua aplicação industrial, porém com a otimização das condições ótimas de cultivo pode ser possível aumentar significativamente a produção enzimática.

Mais uma vez, alguns fungos apresentaram resultados positivos nos procedimentos quantitativos e negativos nos qualitativos, se tratando do mesmo fungo, da mesma enzima e de condições idênticas de ensaio, estes resultados dão indícios da possibilidade de haver diversos tipos de proteases, as quais podem ser proteases alcalinas ou proteases ácidas e nos testes qualitativos o meio sólido não teve as condições ótimas de cultivo ajustadas para cada distinto microrganismo, o que pode ter prejudicado a avaliação da presença de diferentes famílias de proteases. Neste caso, o ensaio quantitativo se mostrou mais preciso, pois dosou proteases totais.

Tabela 4 – Atividades enzimáticas qualitativas e quantitativas dos isolados fúngicos para enzimas proteolíticas.

Isolados fúngicos	Resultado	Índice enzimático	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
F1	+	$0,7 \pm 0,0$	$33,38 \pm 3,57$	$90,91 \pm 4,62$
F2	-	0	$16,18 \pm 1,87$	$23,15 \pm 2,07$
F4	+	$0,5 \pm 0,1$	$28,88 \pm 2,58$	$37,25 \pm 7,55$
F5	-	0	$10,40 \pm 0,57$	$23,97 \pm 0,85$
F6	+	$0,6 \pm 0,2$	$50,85 \pm 2,69$	$39,35 \pm 0,20$
F7	+	$0,7 \pm 0,1$	$58,53 \pm 1,73$	$184,84 \pm 6,57$
F8	+	$0,1 \pm 0,0$	$17,68 \pm 0,39$	$22,31 \pm 1,82$
F11	+	$0,6 \pm 0,2$	$54,50 \pm 0,35$	$45,17 \pm 1,84$
F12	-	0	$17,83 \pm 1,66$	$41,12 \pm 4,23$
F13	-	0	$12,68 \pm 0,53$	$38,94 \pm 2,62$
F14	+	$0,6 \pm 0,0$	$11,58 \pm 0,39$	$12,44 \pm 1,32$
F15	+	$0,2 \pm 0,1$	$3,28 \pm 0,53$	$7,28 \pm 0,65$
F17	+	$0,6 \pm 0,0$	$56,15 \pm 0,00$	$24,15 \pm 0,00$
F18	-	0	$18,80 \pm 0,42$	$29,38 \pm 1,42$
F19	+	$0,3 \pm 0,0$	$9,43 \pm 0,67$	$35,42 \pm 1,15$
F20	+	$0,1 \pm 0,0$	$5,40 \pm 0,14$	$15,88 \pm 0,80$
F25	-	0	$13,73 \pm 0,11$	$21,85 \pm 1,26$
F26	+	$0,7 \pm 0,0$	$7,55 \pm 0,21$	$15,09 \pm 1,60$
F31	-	0	$29,53 \pm 0,39$	$31,41 \pm 3,36$
F33	-	0	$9,75 \pm 0,21$	$16,47 \pm 0,99$

Onde: I.E. = índice enzimático, (+) indica a presença de halo e (-) a ausência de halo; ND =

atividade não determinada. FONTE: Paiva, 2009.

5.4. Enzimas Celulolíticas

Para seleção de fungos produtores de enzimas celulolíticas foram realizados testes qualitativos e quantitativos para duas celulasas, β -glucosidase e CMCase. A determinação qualitativa seguiu os procedimentos descritos no item 4.3., no entanto todos os isolados fúngicos avaliados apresentaram resultados negativos, sem a presença de halo indicador de degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC). Estes resultados contradizem outros autores que demonstraram resultados positivos para a determinação de CMCase em meio sólido. SOUZA *et al.* (2008) encontraram atividade celulolítica qualitativa de Basidiomycetes da Amazônia, expressas em halos que variaram de 10,6 a 21,4 mm. GOMES (2007) testou 50 espécies fúngicas para atividade celulolítica, destes 11 apresentaram uma zona de difusão clara ao redor da colônia, indicando a hidrólise da celulose, com destaque para *Aspergillus fumigatus* e *Stilbella clavispora* que apresentaram os halos mais significativos. RUEGGER *et al.* (2004) encontraram boas atividades celulolíticas para diferentes espécies fungos filamentosos isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (SP) cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C, onde o índice enzimático (I.E.) variou de 1,2 a 5,0, com destaque para espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente para *Penicillium miczynskii* demonstrando o maior I.E.

No entanto, nos ensaios quantitativos os 20 fungos demonstraram atividade para pelo menos uma das enzimas ou até mesmo para as duas. A determinação da atividade da enzima endoglucanase ou CMCase foi feita de acordo com Miller (1959), utilizando glicose como padrão, onde uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de grupos redutores (glicose) por minuto. Dos fungos isolados onze exibiram atividade para CMCase, a qual alterou de 0,01 a 0,06 U/mL, porém todos apresentaram valores bastante baixos (Tabela 5). Estes resultados contradizem Ruegger *et al.* (2004), que obtiveram bons resultados para fungos filamentosos produtores de CMCase utilizando o

mesmo substrato (farelo de trigo). Mas, colaboram com outros autores que obtiveram baixos resultados para a produção da enzima CMCase, como por exemplo, REIS *et al.* (2003) que demonstraram atividades cmcásicas bastante irrelevantes para *Aspergillus nidulans* empregando diferentes fontes de carbono, apresentando atividade de 0,040 a 0,051 U/mL utilizando o substrato farelo de trigo em porcentagens distintas. E ainda, MENEZES *et al.* (2009) que determinaram pouca atividade cmcásica para todas as linhagens avaliadas utilizando bagaço de cana como substrato. No entanto, o uso de diferentes métodos torna difícil a comparação com resultados de outros autores. De acordo com Ruegger *et al.* (2004), é importante ressaltar também que na natureza os fungos produtores de celulasas interagem com outros organismos celulolíticos e com aqueles que degradam vários polímeros, tal associação é responsável pela completa hidrólise dos substratos celulósicos nos ambientes onde estes organismos estão inseridos. Logo sugere-se que as baixas atividades cmcásicas exibidas pelos fungos avaliados pode ser resultado de fatores como: a baixa qualidade do substrato Carboximetilcelulose utilizado nos procedimentos deste estudo; ou ainda, o fato dos fungos não precisarem produzir grande quantidade de CMCase para degradar o substrato farelo de trigo, já que foram capazes de produzir outras enzimas que agiram em sinergismo para o mesmo fim, inclusive outras enzimas celulolíticas que não foram dosadas neste estudo, como por exemplo, a avicelase.

A determinação quantitativa de β -glucosidase foi realizada pelo método de Berghem's & Pettersson (1974) modificado, onde uma unidade internacional (U) de atividade de β -glucosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de *p*-Nitrofenil (*p*-PNP) por minuto sob as condições do ensaio, utilizando *p*-PNP como padrão. Dos fungos analisados, 19 apresentaram atividade enzimática, a qual variou de 1,11 a 38,99 U/mL, com maior destaque para os isolados fúngicos F5 e F19 ambos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, os quais exibiram os maiores valores para atividade enzimática (Tabela 5).

Segundo Silva *et al.* (1994), os principais fungos celulolíticos produtores de celulasas incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporium lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp e *Chaetomium* sp (BISARIA & GHOSE, 1981). De acordo com Stevens & Payne (1977), as diversas espécies de *Aspergillus* são conhecidas por produzirem altos níveis de β -glicosidase. Onde, *Aspergillus niger* pode ser considerado, muitas vezes superior aos outros fungos reconhecidos como bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como por exemplo, o *Trichoderma viride* (GOKHALE, 1986). Portanto, as atividades enzimáticas para β -glucosidase determinadas neste estudo para os fungos filamentosos analisados colaboram com os resultados de outros estudos científicos que afirmam a alta capacidade de *Aspergillus* sp. na produção da celulase β -glucosidase.

Tabela 5 – Atividades enzimáticas (qualitativa e quantitativa) para enzimas celulolíticas.

Isolado fúngico	Atividade Qualitativa	Atividade Quantitativa			
	Resultado	β-glucosidase		CMCase	
		Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
F1	-	19,52 ± 0,10	53,35 ± 3,28	ND	ND
F2	-	5,42 ± 0,04	7,77 ± 0,26	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01
F4	-	3,11 ± 0,44	3,98 ± 0,61	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00
F5	-	38,99 ± 2,78	89,97 ± 8,13	ND	ND
F6	-	16,61 ± 0,72	12,89 ± 1,18	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
F7	-	18,58 ± 1,88	58,54 ± 2,13	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,00
F8	-	1,11 ± 0,00	1,40 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,00
F11	-	18,45 ± 0,10	15,29 ± 0,61	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
F12	-	1,81 ± 0,27	4,18 ± 0,67	ND	ND
F13	-	7,76 ± 1,65	23,76 ± 4,45	0,06	0,18
F14	-	ND	ND	ND	ND
F15	-	2,08 ± 0,17	4,63 ± 0,05	ND	ND
F17	-	15,58 ± 1,06	6,67 ± 0,50	ND	ND
F18	-	5,08 ± 0,27	7,96 ± 0,99	ND	ND
F19	-	29,21 ± 0,62	109,97 ± 6,62	ND	ND
F20	-	11,81 ± 0,09	34,70 ± 0,59	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00
F25	-	15,15 ± 1,90	24,02 ± 1,44	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
F26	-	9,42 ± 0,30	18,83 ± 2,07	ND	ND
F31	-	6,97 ± 0,44	7,40 ± 0,43	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
F33	-	5,79 ± 0,21	9,77 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,04 ± 0,00

Onde: (+) indica a presença de halo e (-) a ausência de halo; ND = atividade não

determinada. FONTE: Paiva, 2009.

6. CONCLUSÃO

- O farelo de trigo se mostrou como uma ótima fonte de carbono, favorecendo a produção de diferentes enzimas por fungos filamentosos.
- Das enzimas avaliadas neste estudo as que demonstraram melhores resultados foram Xilanases, Amilases, Proteases e β -glucosidase, no entanto é muito provável que os microrganismos isolados tenham produzido outras enzimas que não foram consideradas nessa pesquisa.
- Para todas as enzimas avaliadas foi bastante notória a grande variação dos resultados obtidos, tal variação está relacionada com a diversidade fúngica analisada.
- A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível selecionar três isolados fúngicos de maior destaque (F6 e F7 para produção de xilanase e F19 para produção de β -glucosidase) para futuros estudos de purificação e das condições ótimas de cultivo da enzima produzida por estes microrganismos, realizados por outros membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM/UFAM.
- Os fungos manipulados ainda não tiveram suas espécies reconhecidas, por isso tornou-se difícil uma comparação mais detalhada dos resultados obtidos com atividades padronizadas de outros fungos. Mas, para fim de seleção de fungos filamentosos produtores de enzimas hidrolíticas, como xilanases, amilases, proteases, β -glucosidase e CMCase, os resultados foram bastante satisfatórios, pois foram capazes de demonstrar a capacidade de diferentes fungos amazônicos, isolados do solo no Campus da UFAM, em produzir as enzimas referidas, as quais oferecem diversas aplicações na indústria biotecnológica, confirmando a Região Amazônica como possuidora de grande diversidade fúngica para cooperar com a biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades encontradas nela.

A minha querida família, meus amores, Lúcio e Suely (pai e mãe), Lucely e Lucinha (irmãs) e Eunice (que faz parte da nossa família), pelo afeto, pelo apoio e por fornecer todos os elementos necessários ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu amor e algumas vezes anjo da guarda também, Daniel Souza, por todo o amor, apoio e dedicação incondicional que me oferece, pela paciência e fortaleza nos momentos mais difíceis e por me fazer uma pessoa mais feliz.

A Professora Leonor Alves de Oliveira da Silva, minha orientadora, pelas oportunidades e ensinamentos oferecidos.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM, em especial a querida amiga Paola e ao nosso saudoso técnico Oto Gil.

Aos meus amigos e amigas, pelo milagre da amizade, que sempre trazem um sabor adocicado a minha vida.

A todos os meus professores, e assim como disse Path Adams, principalmente aqueles que não morreram da cintura para cima. Que sabem ser um verdadeiro mestre, transferindo o conhecimento com a única intenção de formar bons profissionais.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a FAPEAM pela oportunidade e por toda a estrutura oferecida para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M.J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v. 30, p. 5-10, 1989
- BERGHEM, L. E. R.; PETTERSSON, L. G. 1974. Mechanism of enzymatic cellulose degradation – Isolation and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 46, 295-305.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic system. *Trends in Biotechnology* 3: 286-290, 1985.
- BISARIA, VS; GHOSE, TK. Biodegradation of cellulosic materials - substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, ed. 2, p. 90-104, 1981.
- CASTELLANI, A Viability of some pathogenic in fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 225-226, 1939.
- CLARKE, J.H. *et al.* Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.48, p.177-183, 1997;
- COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; DIAS, B. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, Ribeiro. Rj: EPUB, 2008.
- DIAS, R.D. Uso de protease de *Bacillus* spp. Na hidrólise protéica de farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). 2007. 2p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- FERREIRA FILHO, E.X.F. The xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.27, p.1093-1109, 1994.
- FERNANDES, L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Revista eletrônica de Farmácia, Goiás*, Vol. IV (1), 43-51. 2007.

FOOD INGREDIENTS BRAZIL. São Paulo: Editora FiHBA, n. 9, agosto/setembro. 2009.

FRANCO, C. M. L., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, L. J., LEONEL, M., CEREDA, M. P., VILPOUX, O. F., SARMENTO, S. B.S. Produção e Uso de Amidos. **Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas**. Vol. 1, cap. 2, p.21-56, 2003;

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T.; WEST, S. Industrial enzymology. New York: Macmillan Publissers, Inc., 2 ed., p.1-8, 1996.

GOMES, D.N.F. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. Recife, 2007. 94f. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação Em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco

GOKHALE, D. U. Xylanase and beta-xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnology Letters*, v. 8, p. 137-138, 1986

GUIMARAES, L. H. S. ; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. ; M Michelin ; ACS Rizzatti ; Sandrim, V.C. ; ZANOELO, F. F. ; AQUINO, A. C. M. ; BARBOSA JUNIOR, A. ; MLTM Polizeli . Diversity of Filamentous Fungi which Produce Enzymes of Biotechnology Interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R.; GIGRS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, Índia, v. 38, p. 1599-1616, 2003;

HALTRICH, D. *et al.* Production of fungal xylanases. **Bioresour Technol.** v.58. n.2. p.137-161, 1996.

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

HERMANN, S.R.; HERNANDEZ, F.; RIVALDI, J.D.; SILVEIRA, G.G.; SILVA, D.; SOARES, L.H.B; DEL BIANCHI, V.L.; KRIEGER, N.; MORAES, R.O.; DENTIZEN, A. Produção de pectina liase e amilase por fermentação em estado sólido à base de bagaço de laranja e farelo de arroz. In: XIV SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

KADOWAKI, M.K. *et al.* Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 66, p. 97-106, 1997.

KHENG, P. P., OMAR, I. C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*: 27(2): 325-336, 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.345-351, 2002.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R.A. J.; KELLN, R. A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, (76): 103-122.

LIMA, U. A.; AGUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

LOWRY, O. H., Rosebrough, N. F., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002

MACIEL, Gisele Mari. Desenvolvimento de Bioprocesso para produção de Xilanases por Fermentação no estado sólido utilizando bagaço de Cana de açúcar e farelo de soja. 2006. 133f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MENEZES, C.; SILVA, I.; DURRANT, L. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos (Online)*, v. 5, p. 68-78, 2009.

MILAGRES, M.F.M. Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpas Kraft. Doutorado em Bioquímica. Universidade Estadual de Campinas, 1994.

MILLER, GH. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, Amsterdam, v.31, p.426-428, 1959.

MISHRA, C., SEETA, R., RAO, M., 1985. Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. Enzyme Microb. Technol. 7, 295–299.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. Revista Ciência Hoje, São Paulo, vol. 41, nº 242. 2007

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L, A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C, Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 61-66, jan./mar, 2007

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Revista Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, out.-dez, 2006.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R. and NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. Bioresource technology, 77 (1): 149-162, 1999.

QUEIROZ, G.O.; JORDÃO, R.C.C.; SALGUEIRO, A.A. Seleção de microrganismos produtores de celulasas e de lacases a partir de efluentes de fábrica de papel. Revista Química & Tecnológica, Pernambuco, Ano 1, nº01, jul/dez. 2002.

QUERIDO, A. L. S. ; COELHO, J. L. C. ; ARAÚJO, E. F. ; ALVES, V. M. C . Partial Purification and Characterization of Xylanase Produced by *Penicillium expansum*. Brazilian Archives of Biology and Tecnology, v. 49, p. 475-480, 2006.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 597-635, 1998.

REIS, Simone dos ; COSTA, Maria Aparecida Ferreira ; PERALTA, R. M. . Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, PR, v. 25, n. 1, p. 221-225, 2003.

REIS, V. R. A. ; Polizeli M L T M . Screening de fungos filamentosos produtores de xilanases e seleção do. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2008, Ribeirão Preto. Resumos do Siicusp, 2008.

RUEGGER, M.J.S.; TORNISIELO-TAUK, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, Rio Claro, São Paulo, V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.

SCHIMID, A et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409: 258-268, 2001.

SIEDENBERG, D. *et al.* Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process. Biochem.*, Rickmansworth, v. 33, p. 429- 433, 1998.

SILVA, R., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal Fermentation and Bioengineering*, v. 77, p. 109-111, 1994

SILVA, W. B. ; PERALTA, R. M. . Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *A. fumigatus*. *Canadian Journal of Microbiology*, Canadá, v. 44, p. 493-497, 1998.

SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. 1999. *Produção de Proteases de Bacillus subtilis usando óleo de soja como fonte de carbono*. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp.

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*, v. 28, p. 1-9, 2008. ; Série: supl.; ISSN/ISBN: 01012061

STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeasts of genus trichosporon. **Journal of General Microbiology**, v. 100, ed. jun, p. 381-393, 1977.

SUMERLY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. **Hidrólise do Amido**. In: FRANCO, C.M.L. *et al.*(Ed.). *Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*, v. 3, cap. 15, p377-389, 2003;

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v.17, p.39-67, 1997;

TEIXEIRA, M. F. S. ; FERNANDES, O. C. C. ; MACHUCA, A. ; DURÁN, N. .
Detreminação qualitativa de proteases.. Revista da Universidade do Amazonas. Série Ciências
Agrárias, Manaus, v. 1, n. 1/2, p. 39-45, 1996.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Descrição	Ago 200 8	Set	Out	Nov	Dez	Jan 200 9	Fev	Ma r	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Adaptação da metodologia	R	R	R									
Isolamento dos fungos	R	R	R									
Ensaio qualitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas celulolíticas				R								
Ensaio qualitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas amilolíticas					R							
Ensaio qualitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas xilanolíticas						R						
Ensaio qualitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas pectinolíticas							R					
Ensaio quantitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas celulolíticas								R				
Ensaio quantitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas amilolíticas									R			
Ensaio quantitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas xilanolíticas										R		
Ensaio quantitativo para seleção dos fungos produtores de enzimas Proteolíticas											R	
Análise dos dados											R	
Elaboração do Resumo e Relatório Final											R	R
Preparação da Apresentação Final para o Congresso												R

Onde: R = Realizado