

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Pleurotus sajor-caju* E *Pleurotus djamor*

FERNANDA MARIA BONOMINI
PROF^a Dra. REGINA MARIA MIRANDA GERN

JOINVILLE - SC

2017

FERNANDA MARIA BONOMINI

PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Pleurotus sajor-caju* E *Pleurotus djamor*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – Univille.

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Maria Miranda Gern.

JOINVILLE – SC

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Bonomini, Fernanda Maria
B719pProdução de enzimas por Pleurotus sajor-caju e Pleurotus djamor/Fernanda Maria
Bonomini; orientador Dra. Regina Maria Miranda Gem.– Joinville: UNIVILLE, 2017.

86f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente–Universidade da Região
de Joinville)

1.Enzimas. 2. Pleurotus djamor.3.Pleurotus sajor-caju. 4. Fungos – Cultivo.
I.Gem, Regina Maria Miranda. II. Título.

CDD 572.7

Termo de Aprovação

"Produção de Enzimas por *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus djavanor*"

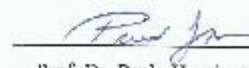
por

Fernanda Maria Bonomini

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)

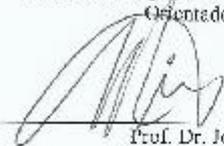


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeira da França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Jorge Luiz Nizow
(UFSC)



Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de março de 2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern, pelo apoio, ensinamentos e perseverança depositados em mim. Obrigada pela orientação e todo auxílio necessário para que este trabalho se concretizasse.

À minha família que sempre reconheceu meu potencial, me deu suporte e apoio financeiro para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Filipe, por ter me acompanhado nos fins de semana à Univille, aquele que por várias vezes escutou minhas queixas e frustrações e me deu forças para continuar. Você é muito importante na minha vida.

Ao meu grupo de mestrado Carol, Yara e Monique, poder compartilhar com vocês os trabalhos, estudos e momentos de alegria fez essa experiência do mestrado muito mais valiosa.

Às queridas técnicas Aline e Cláudia, pela paciência, ajuda e tempo que foram destinados a este trabalho.

Ao Prof. Me. Luciano, Prof. Dra. Jamille, Me. Suellen e a graduanda Auriciane, pela ajuda em laboratório e dúvidas tiradas ao longo do tempo.

À banca examinadora pelo tempo e atenção dedicados.

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

Obrigada!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção das enzimas extracelulares lipase, lacase, amilase, celulase, pectinase, protease e inulinase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001. Inicialmente foram realizados ensaios qualitativos em placas de Petri contendo meio WDA e as fontes de carbono específicas para a indução de cada enzima. O crescimento micelial de ambos os fungos pode ser observado em todos os meios de cultivo, indicando a capacidade destes em utilizar a fonte de carbono presente no meio, sugerindo a excreção das enzimas específicas para a degradação do substrato. A presença das enzimas amilase, pectinase e protease foi confirmada pela formação de um halo de degradação do substrato ao redor da colônia fúngica, para ambos os fungos. A presença de lacase foi confirmada pela formação de coloração marrom sob e ao redor da colônia fúngica, para ambos os fungos, indicando a oxidação do guaiacol presente no meio. As enzimas celulase e inulinase não foram detectadas em nenhum dos cultivos. O crescimento fúngico e/ou a presença das enzimas testadas determinou a próxima etapa do trabalho, no qual a produção das enzimas foi avaliada quantitativamente ao longo do cultivo (14 dias) utilizando frascos de Erlenmeyer agitados contendo meio composto por extrato de trigo adicionado da fonte de carbono específica para a indução de cada enzima. As atividades máximas de lacase encontradas foram de 0,037 U/mL para *P. sajor-caju* e 0,144 U/mL para *P. djamor*, no 3º e 9º dias de cultivo, respectivamente. As atividades máximas de amilase encontradas foram de 0,35 U/mL para *P. sajor-caju* e 0,45 U/mL para *P. djamor*, no 11º e 7º dias de cultivo, respectivamente. A enzima pectinase só foi detectada no cultivo de *P. sajor-caju*, alcançando atividade máxima de 0,29 U/mL, no 11º dia de cultivo. Inulinase só foi detectada no cultivo de *P. djamor*, alcançando atividade máxima de 0,62 U/mL, no 9º dia de cultivo. Celulases e proteases não foram detectadas pelo método utilizado neste trabalho, em ambos os cultivos fúngicos. Os resultados obtidos sugerem que ambos os fungos apresentam potencial biotecnológico para a produção de enzimas de interesse comercial.

Palavras-chave: *Pleurotus*, enzimas, cultivo sólido, cultivo submerso.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the production of the extracellular enzymes lipase, laccase, amylase, cellulase, pectinase, protease and inulinase by *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 and *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001. Initially, qualitative assays were performed on Petri dishes containing WDA medium and the specific carbon sources for the induction of each enzyme. Mycelial growth of both fungi could be observed in all culture media, indicating their ability to utilize the carbon source in the medium, suggesting the excretion of the specific enzymes for substrate degradation. The presence of the amylase, pectinase and protease enzymes was confirmed by the formation of a halo of degradation of the substrate around the fungal colony, for both fungi. The presence of laccase was confirmed by the formation of brown staining under and around the fungal colony, for both fungi, indicating the oxidation of guaiacol present in the medium. The enzymes cellulase and inulinase were not detected in any of the cultures. The fungal growth and/or the presence of the enzymes tested determined the next stage of the work, in which the production of the enzymes was evaluated quantitatively throughout the culture (14 days) using agitated Erlenmeyer flasks containing a culture medium composed of wheat extract added with the carbon source specific for the induction of each enzyme. The maximum laccase activity was 0.037 U/mL for *P. sajor-caju* and 0.144 U/mL for *P. djamor*, on the 3rd and 9th days of culture, respectively. The maximum amylase activities were 0.35 U/mL for *P. sajor-caju* and 0.45 U/mL for *P. djamor*, on the 11th and 7th days of culture, respectively. Pectinase was only detected for *P. sajor-caju*, reaching maximum activity of 0.29 U/mL, on the 11th day of culture. Inulinase was only detected in *P. djamor* cultivation, reaching maximum activity of 0.62 U/mL, on the 9th day of culture. Cellulases and proteases were not detected by the method used in this work, in both fungal cultures. The results suggest that both fungi present biotechnological potential for the production of enzymes of commercial interest.

Keywords: *Pleurotus*, enzymes, solid cultivation, submerged cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações catalisadas por lipase.....	17
Figura 2 – Estrutura de uma lacase de <i>Trametes versicolor</i>	20
Figura 3 – Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido..	21
Figura 4 - Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico.....	25
Figura 5 – Estrutura-base de uma molécula de fruto-oligossacarídeo com as unidades de ligações de frutose β -2,1.....	28
Figura 6 – Delineamento experimental.....	34
Figura 7 – Placas de Petri inoculadas com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (a) e <i>Pleurotus djamor</i> (b) em meio cultivo contendo Rodamina B e óleo de soja como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de lipase.	46
Figura 8 – Placas de Petri inoculadas com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (a) e <i>Pleurotus djamor</i> (b) em meio de cultivo contendo guaicol como substrato indutor da lacase apresentado resultado positivo para a produção de enzima.	47
Figura 9 – Placas de Petri inoculadas com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (a) e <i>Pleurotus djamor</i> (b) em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de amilase.	48
Figura 10 – Placas de Petri inoculadas com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (a) e <i>Pleurotus djamor</i> (b) em meio de cultivo contendo pectina como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de pectinase.	48
Figura 11 – Placa de Petri apresentando crescimento fúngico (<i>P. sajor-caju</i>) em meio de cultivo contendo CMC (carboximetilcelulose) como única fonte de carbono.....	50
Figura 12 – Placas de Petri inoculadas com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (a) e <i>Pleurotus djamor</i> (b) em meio de cultivo contendo leite em pó como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de proteases.	50
Figura 13 – Placas de Petri apresentando crescimento fúngico de <i>P. sajor-caju</i> (a) e <i>P. djamor</i> (b) em meio de cultivo contendo inulina como única fonte de carbono.....	51
Figura 14 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em meio de cultivo contendo guaicol como substrato.....	53

Figura 15 - Cinética de produção de lacase pelo fungo <i>Pleurotus djamor</i> UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo guaicol como substrato.....	53
Figura 16 - Cinética de produção de amilase e açúcares redutores (AR) pelo fungo <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono..	55
Figura 17 - Cinética de produção de amilase e açúcares redutores (AR) pelo fungo <i>Pleurotus djamor</i> UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono...	56
Figura 18 - Cinética de produção de pectinase e açúcares redutores (AR) pelo fungo <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em meio de cultivo contendo pectina cítrica como única fonte de carbono.	57
Figura 19 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por <i>Pleurotus djamor</i> UNIVILLE 001 contendo pectina cítrica como única fonte de carbono.....	57
Figura 20 - Cinética de produção de açúcares redutores por <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono.	60
Figura 21 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por <i>Pleurotus djamor</i> UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono.	60
Figura 22 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 019 em cultivo contendo inulina como única fonte de carbono.	62
Figura 23 - Cinética de produção de inulinase pelo fungo <i>Pleurotus djamor</i> UNIVILLE 001 em cultivo contendo inulina como única fonte de carbono	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS –ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico)

AR – açúcar redutor

CCB – Coleção de Culturas de Basidiomicetos

CMC – carboximetilcelulose

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNS - ácido 3,5 dinitrosalicílico

TCA - ácido tricloroacético

TMT - tandem mass tag

TRIS - tris-(hidroximetil)-aminometano

U – unidade internacional de atividade enzimática

V_C - volume do caldo enzimático

V_R - volume da reação

WDA – meio extrato de trigo-dextrose-ágar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	13
a) Geral	13
b) Específicos	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Bioprospecção	14
2.2 Enzimas	15
2.2.1 Lipases	15
2.2.2 Lacases	19
2.2.3 Amilases	21
2.2.4 Pectinases	22
2.2.5 Celulases	23
2.2.6 Proteases	26
2.2.7 Inulinases	27
2.3 Fungos	29
2.4 <i>Pleurotus</i>	30
2.4.1 Produção de enzimas por <i>Pleurotus</i> spp.	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Micro-organismo e manutenção	34
3.2 Avaliação qualitativa do crescimento micelial e da produção de enzimas por <i>Pleurotus sajor-caju</i> e <i>Pleurotus djamor</i>	35
3.2.1 Presença de lipase	35
3.2.2 Presença de lacase	36
3.2.3 Presença de amilase	36
3.2.4 Presença de pectinase	36
3.2.5 Presença de celulase	37
3.2.6 Presença de protease	37
3.2.7 Presença de inulinase	37
3.3 Quantificação da produção de enzimas por <i>Pleurotus sajor-caju</i> e <i>Pleurotus djamor</i>	38
3.3.1 Atividade lipolítica	38

3.3.2	Atividade de lacase	39
3.3.3	Atividade amilolítica.....	40
3.3.4	Atividade pectinolítica.....	41
3.3.5	Atividade celulolítica	42
3.3.6	Atividade proteolítica	43
3.3.7	Atividade inulinolítica.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Avaliação qualitativa da produção de enzimas.	46
4.1.1	Presença de lipase	46
4.1.2	Presença de lacase	46
4.1.3	Presença de amilase	47
4.1.4	Presença de pectinase	48
4.1.5	Presença de celulase	49
4.1.6	Presença de protease.....	50
4.1.7	Presença de inulinase	51
4.2	Avaliação quantitativa da produção de enzimas	52
4.2.1	Atividade lipolítica	52
4.2.2	Atividade de lacase.....	52
4.2.3	Atividade amilolítica	55
4.2.4	Atividade pectinolítica.....	56
4.2.5	Atividade celulolítica	59
4.2.6	Atividade proteolítica	61
4.2.7	Atividade inulinolítica	61
5	CONCLUSÃO	64
6	REFERÊNCIAS.....	66

INTRODUÇÃO

O interesse por processos biotecnológicos tem crescido e ganhado destaque nos últimos anos, sendo um dos responsáveis pelo desenvolvimento tecnológico mundial. A utilização destes processos possibilita a obtenção de uma ampla gama de metabólitos, sendo as enzimas um dos seus principais produtos (FLORENCIO, 2011).

As enzimas são biocatalisadoras altamente eficazes, e estão envolvidas em vários processos metabólicos, como os processos essenciais para a vida, ou seja, na replicação do DNA e sua transcrição, na síntese de proteínas, metabolismo e transdução de sinal, entre outros. Possuem a capacidade de realizar transformações químicas muito específicas, tornando-se muito úteis para processos industriais, sendo possível a produção em larga escala (KUMAR et al., 2014; LI et al., 2012). Usualmente, estes processos que utilizam enzimas na indústria, são relativamente simples, fáceis de operar e são eficientes energeticamente (ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas são produzidas comercialmente, na maioria dos processos, a partir de micro-organismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos e facilidade e controle operacional, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação (FLORENCIO, 2011; ORLANDELLI et al., 2012). Dentre os micro-organismos que se destacam na produção biotecnológica de enzimas encontram-se os fungos, com destaque para os da classe dos basidiomicetos, popularmente conhecidos como cogumelos.

Dentre as principais enzimas comerciais estudadas produzidas por fungos, estão as lipases, que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol (MESSIAS et al., 2011), lacases, que catalisam a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas (fenóis) com concomitante redução de oxigênio a água (MINUSSI, 2002; MADHAVI e LELE, 2009), amilases, que possuem ação sobre o amido liberando diversos produtos e apresentam importantes aplicações biotecnológicas principalmente nas indústrias farmacêutica, têxtil, detergente e alimentícia (FERNANDES, 2007), pectinases, que catalisam a degradação das substâncias pécticas pertencentes ao material vegetal (SANTI et al.,

2014), celulases, enzimas chave na bioconversão de materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (FLORENCIO, 2011), proteases, que constituem o grupo mais importante entre as enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total das enzimas comercializadas em todo mundo para utilização nos mais diversos setores (NEVES, 2014) e as inulinases, que constituem uma importante classe de enzimas na produção de frutose por meio da hidrólise enzimática da inulina e são também utilizados na síntese de fruto-oligossacarídeos, produto utilizado como ingrediente funcional em alimentos, sendo considerado um alimento prebiótico (SING e GILL, 2006).

Fungos do gênero *Pleurotus*, da classe dos basidiomicetos, são conhecidos por produzir enzimas lignocelulolíticas tais como lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e celulases (CASTRO et al., 2004). No entanto, pouco se conhece sobre a produção de pectinases, lipases, amilases, inulinases e proteases por este gênero.

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção das enzimas extracelulares lipase, lacase, amilase, celulase, pectinase, protease e inulinases por duas espécies de *Pleurotus*, *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, mantidos no banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE.

OBJETIVOS

a) Geral

Avaliar a produção de lipases, lacases, amilases, pectinases, celulases, proteases e inulinases pelos fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001.

b) Específicos

- Avaliar, de forma qualitativa, a produção de lipases, lacases, celulases, proteases, amilases, pectinases e inulinases pelos fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001;
- Quantificar as enzimas cujo crescimento micelial e/ou teste qualitativo obteve resultado positivo para produção, em cultivo submerso, ao longo do tempo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioprospecção

Os recentes avanços da biotecnologia e das ciências afins levaram à intensificação da exploração econômica dos recursos da biodiversidade, gerando o termo bioprospecção ou prospecção da biodiversidade. A bioprospecção se tornou um elemento fundamental para as indústrias reconhecerem o valor econômico da biodiversidade e pode ser definida como a pesquisa da diversidade biológica à procura de potenciais valiosos contidos em recursos genéticos e bioquímicos de valor comercial que, eventualmente, pode fazer uso dos conhecimentos tradicionais (PEREIRA, 2009).

O artigo 7º da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 define bioprospecção como “qualquer atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial uso comercial” (BRASIL, 2001). O mesmo documento ainda define o acesso ao conhecimento tradicional como sendo a “obtenção de informação sobre o conhecimento ou prática, individual ou coletiva, associada ao patrimônio genético, de comunidade indígena ou de comunidade local, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando sua aplicação industrial ou de outra natureza”. Logo, esta medida provisória difere a atividade exploratória do patrimônio genético e conhecimentos tradicionais, a ele associados, para fins científicos daquela para fins comerciais, denominando somente a última como sendo bioprospecção (MAGALHÃES et al., 2007).

Dentre os principais compostos produzidos por micro-organismos encontram-se os ácidos orgânicos (OKINO et al., 2005; WENDISCH et al., 2006; SAUER et al., 2008), antibióticos (CLARDY et al., 2006), polissacarídeos com potencial medicinal (CARDOSO et al., 2008), os biossurfactantes (FONTES, 2008; MARTINS et al., 2008; PINTO et al., 2009), vitaminas (GONÇALVES, 2006) e as enzimas (CARVALHO et al., 2005; LIBARDI JR, 2010; QUEVEDO-HIDALGO et al., 2015), que serão alvo deste trabalho.

2.2 Enzimas

As enzimas são proteínas que funcionam como catalisadoras em reações químicas, sem serem consumidas no processo, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos. Elas agem diminuindo a barreira de ativação entre o reagente e o produto, acelerando enormemente a velocidade de reação. Cada proteína enzimática é específica para a catálise de uma determinada reação e cada reação no interior de uma célula é catalisada por uma enzima diferente (NELSON e COX, 2002).

As enzimas são bastante versáteis 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 (ORLANDELLI, 2012).

Dentre as principais enzimas estudadas, as lipases (MESSIAS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011), lacases (FIRMINO e FURTADO, 2014), amilases (FIRMINO e FURTADO, 2014), celulases (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; SANDHU e MAITI, 2013), pectinases (UENOJO e PASTORE, 2007), inulinases (SINGH e GILL, 2006; VIJAYARAGHAVAN et al., 2009) e proteases (FIRMINO e FURTADO, 2014) estão em evidência por terem um grande potencial biotecnológico de produção e aplicação.

2.2.1 Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que clivam ligações de éster em substratos lipídicos (GURURAJ et al., 2016). Têm como substrato natural os triglicerídeos e sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar. Essas enzimas podem ser encontradas em células de tecidos animais (pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais e também podem ser produzidas por micro-

organismos (fungos e bactérias) (PASTORE et al., 2003; PAQUES e MACEDO, 2006; GURURAJ et al., 2016).

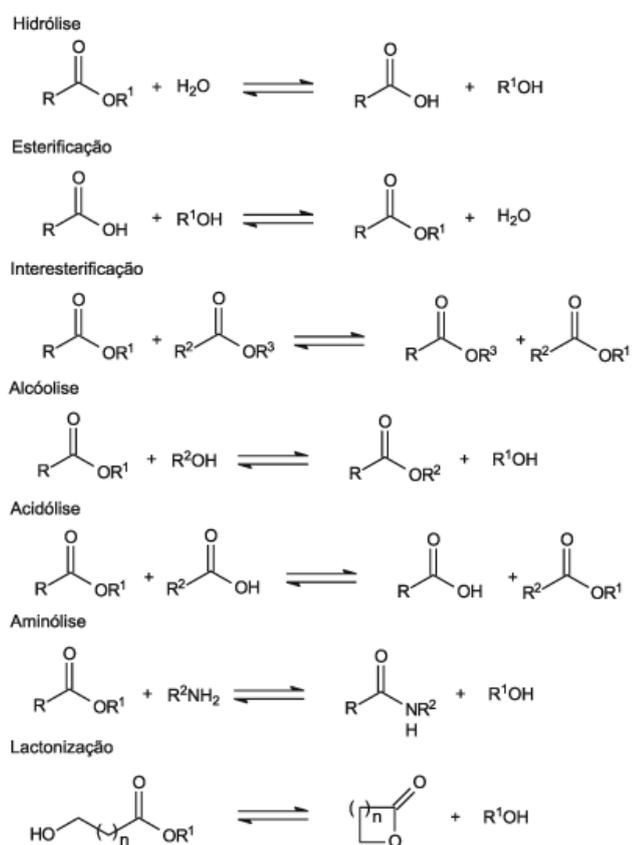
Sua primeira utilização foi em 1856, quando Claude Bernard a isolou do suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Anos depois, o interesse pelas lipases microbianas aumentou devido à estabilidade e facilidade de obtenção em comparação com as de origem animal (MESSIAS et al., 2011).

Dependendo da origem, as lipases podem apresentar massa molar variando de 20 a 70 kDa, atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando entre ambiente e 70 °C. O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina; o resíduo nucleofílico da serina é localizado no C-terminal da fita β_5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ β em torno de α ”, designada como a cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha β central consistindo de 8 diferentes fitas β (β_1 - β_8) conectadas com seis α hélices (A-F). A ação catalítica acontece na interface orgânica-aquosa e necessita de um substrato emulsionado para ser efetiva na hidrólise. Sua forma tridimensional faz com que ocorra a “ativação interfacial”, pois seu sítio ativo é coberto por uma superfície entrelaçada que funciona como uma tampa, a qual é ativada e aberta ao encontrar a interface orgânica-aquosa no meio da reação, deixando seu centro ativo acessível ao substrato e expondo uma larga superfície hidrofóbica, a qual facilita a ligação da enzima à interface (CASTRO et al., 2004).

As lipases são capazes de catalisar diversas reações como de hidrólise, esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, e juntamente com diferentes formas de especificidade de substrato existentes, conferem a essas enzimas um grande potencial de aplicações (PASTORE et al., 2003).

Na Figura 1 estão demonstradas as reações catalisadas por lipases e um importante fator a ser destacado é a atividade da água no meio reacional, ponto determinante para cada classe de reação.

Figura 1– Reações catalisadas por lipase.



FONTE: PAQUES e MACEDO, 2006.

Suas aplicações são variadas, sendo que normalmente em escala industrial são utilizadas as lipases microbianas. No Quadro 1, podemos verificar alguns exemplos de diferentes aplicações industriais que a enzima lipase apresenta.

Quadro 1 – Aplicações industriais de lipases.

INDÚSTRIA	AÇÃO	PRODUTO OU APLICAÇÃO
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
Panificação	Melhorador de sabores	Prolongar a vida de prateleira
Bebidas	Aromas	Bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento de sabores	Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes
“Health foods”	Transesterificação	Produção de alimentos com apelo nutricional
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lípidios específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Papel	Hidrólise	Melhoria da qualidade de papel
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro

Fonte: COLLA et al. (2012)

As lipases podem ser utilizadas na redução dos níveis de sólidos suspensos e lipídeos, desobstruindo também filmes de óleos em tubulações, o que causa um aumento da vida útil dos equipamentos (MENDES et al., 2005).

Um fator limitante para sua utilização é de que as lipases comercializadas são encontradas com um preço elevado, fator justifica sua crescente pesquisa e produção por meio de micro-organismos, como os fungos, com potencial natural para a elevada produção dessas enzimas e de uma forma mais viável economicamente (RODRIGUES et al., 2016).

Os fungos ganham destaque na produção de lipases, pois além de produzirem enzimas extracelulares, facilitando sua recuperação no meio de cultivo, também na sua maioria, não são nocivos à saúde humana (MESSIAS et al., 2011). Os fungos filamentosos têm sido estudados como bons produtores de lipases microbianas, sendo os gêneros mais citados *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium*(MESSIAS et al., 2011; COLLA et al., 2012).

Roveda et al. (2010) avaliaram a produção de lipase por fungos isolados de efluentes de laticínios, dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium* e obtiveram atividade máxima de até 2,250 U/mL.

Algumas lipases também são obtidas por meio de bactérias e actinomicetos. Os gêneros mais estudados são *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptomyces* sp. e *Pseudomonas* sp. (MESSIAS et al., 2011). Também podem ser

encontradas lipases sintetizadas por algumas espécies de leveduras como *Candida rugosa*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *Ophiostoma piliferum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. lipolytica* e *Yarrowia lipolytica* (CARVALHO, 2012). Alguns estudos também relatam a produção de lipases por *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus ostreatus* (GUIZELINI et al., 2015; ALMEIDA, 2016).

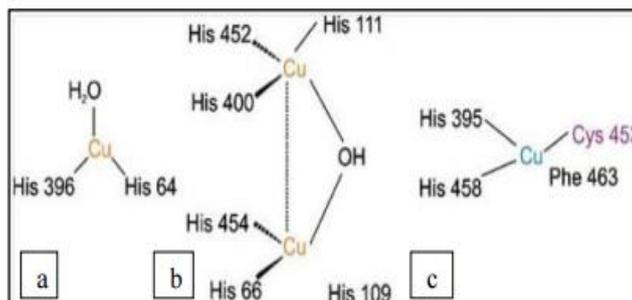
2.2.2 Lacases

As lacases (E.C. 1.10.3.2) têm sido muito exploradas devido ao seu grande número de aplicações biotecnológicas. A lacase foi isolada pela primeira vez a partir da seiva da árvore laca japonesa *Rhus Verniciferae* foi descrita por Yoshida em 1883 (KUDANGA e ROES-HILL, 2014).

Pertencente à família das oxidases, a lacase depende de oxigênio para catalisar reações (SANTOS, 2012). As lacases são enzimas que possuem um centro catalítico multicobre que catalisam, por abstração de um elétron, reações com uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio molecular para água (KUDANGA e ROES-HILL, 2014; PACHECO e SOARES, 2014).

Geralmente, as lacases possuem no seu centro ativo quatro átomos de Cobre por monômero, classificados em três grupos diferentes, segundo estudos realizados por ressonância paramagnética (EPR) e espectroscopia UV/visível. O Cobre T1 é o principal aceptor de elétrons e está covalentemente ligado a um resíduo de cisteína, o que confere a intensa cor azul à enzima. O Cobre T2 possui um centro mononuclear incolor e juntamente com os Cobres T3 (binuclear) formam uma estrutura trinuclear onde o oxigênio é reduzido a água (KUDANGA e ROES-HILL, 2014). Na Figura 2 está representada a estrutura de uma lacase.

Figura 2– Estrutura de uma lacase de *Trametes versicolor*, composta por 4 átomos de cobre, distribuídos em 3 centros catalíticos: T2 (a), T3 (b) e T1 (c).



FONTE: ALVES (2011).

As lacases vêm ganhando importância devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos e esta aplicação vem sendo utilizada em diversos processos como remoção de lignina de polpas kraft em indústrias de papel e celulose, biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados, análise de drogas, produção de bioetanol, clarificação de vinhos e chás e produção de biossensores, entre muitos outros, por apresentarem baixa especificidade por substratos (FIRMINO e FURTADO, 2014; PACHECO e SOARES, 2014).

Pode-se verificar o potencial de aplicação das lacases por meio do número de patentes registradas no “Unites States Patent Office – USPTO (2009)” (37 registros) e no “European Patent Office – EPO (2009)” (371 registros) envolvendo a síntese e aplicações desta enzima.

Embora a enzima esteja presente em plantas, insetos e bactérias, sua fonte mais importante são os fungos, particularmente os basidiomicetos, e neste grupo, os mais eficientes para sua produção são os associados à decomposição da madeira, entre eles, *Trametes versicolor*, *Plebia radiata*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus* (ALVES, 2010; BETTIN, 2010; SHRADDHA et al., 2011). Algumas espécies de *Trichoderma*, como, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* também são fontes de lacase (SHRADDHA et al., 2011).

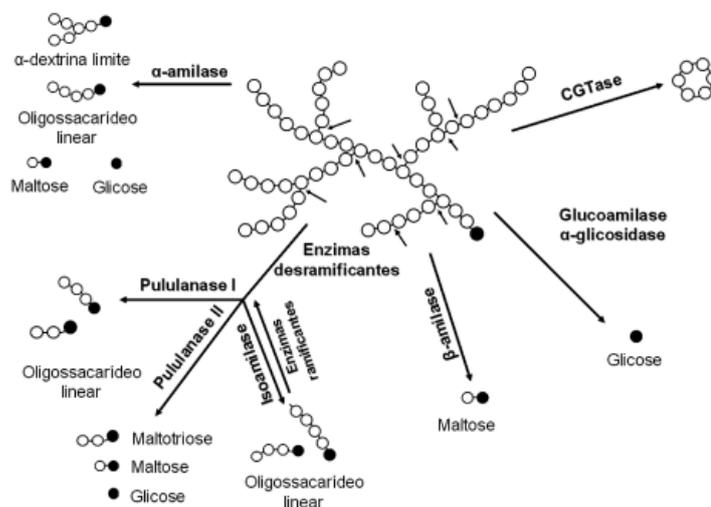
Existem relatos da produção de lacase por bactérias como *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus* e *Marinomonas mediterranea* (SHRADDHA et al., 2011).

2.2.3 Amilases

As amilases compõem um grupo de enzimas responsáveis pela degradação da molécula do amido e são de grande importância na biotecnologia atual com aplicações entre a área alimentícia, de fermentações, têxtil, até a indústria de papéis, ocupando importante lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, ficando atrás apenas das enzimas proteases (PANDEY et al., 2000; GUPTA et al., 2003; ORLANDELLI et al., 2012).

Esse grupo de enzimas está dividido em duas categorias, endoamilases e exoamilases. Endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de diversos comprimentos, quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina. A α -amilase é a endoamilase mais conhecida. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4, como β -amilase ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como amiloglicosidase e glicosidase. Também são exemplos de exoamilases a ciclodextrina glicosiltransferase e a α -amilase maltogênica (GUPTA et al., 2003; FERNANDES et al., 2007). Na Figura 3 é possível observar uma síntese da ação conjunta das enzimas que degradam a molécula do amido.

Figura 3– Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (•) extremidade redutora; (o) extremidade não redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido.



FONTE: GONÇALVES (2006).

As amilases estão presentes em animais, plantas e micro-organismos, porém, devido às vantagens que apresentam, como menor tempo de produção, as amilases microbianas chamam a atenção do mercado de enzimas (OLIVEIRA et al., 2007).

As enzimas amilases são geralmente produzidas por bactérias da espécie *Bacillus subtilis* (STRIPECKE, 2006). Quanto às amilases obtidas por meio dos fungos, seus principais produtores são *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Rhizopus* spp. e *Mucor rouxii* (ORLANDELLI et al., 2012).

2.2.4 Pectinases

As enzimas pectinolíticas compreendem um grupo de enzimas responsáveis pela degradação das substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Estas substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alta massa molar que formam o maior componente da lamela média e paredes celulares primárias de células vegetais (SANTOS, 2007), que além de contribuir para dar firmeza e estrutura aos tecidos vegetais, também são responsáveis pela diferença de textura de frutas e vegetais durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento, sendo sua maior fonte de extração obtida das frutas cítricas (SANTI et al., 2014).

As pectinases são classificadas de acordo com o modo de ataque à molécula dos polímeros pécticos, mais especificamente, ao esqueleto galacturônico. Elas são divididas em três grupos: protopectinases, esterases (pectinesterases) e as despolimerases (hidrolases e liases). O grupo das esterases remove os grupos metil éster, as despolimerases são responsáveis por catalisar a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas, e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (SANTOS, 2007; UENOJO e PASTORE, 2007; SANTI et al., 2014).

Elas podem ser produzidas por vegetais ou micro-organismos (fungos, leveduras e bactérias). Sua síntese pode sofrer influência dos componentes do meio de cultura, principalmente da fonte de carbono, presença de indutores (pectina e

derivados) e das condições de cultivo como, pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (UENOJO e PASTORE, 2007).

Devido à fácil produção e diversidade dessas enzimas, os fungos filamentosos são os mais empregados para produção em escala industrial, pois o pH ideal de pectinases secretadas por fungos se assemelha ao pH de muitos sucos de frutas (cerca de 3,0 a 5,5) (SANTI et al., 2014). Enzimas pectinases são mais vantajosas quando produzidas em fermentação sólida, por permitir a formação de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação (UENOJO e PASTORE, 2007).

As enzimas pectinases começaram a ser utilizadas em escala comercial em 1930 e desde então, elas têm importante aplicação na indústria de processamento de frutas e vegetais, incluindo produção de sucos, vinhos, alimentos, papel, café, entre outros. Também possuem funções na extração de óleos vegetais, recuperação de óleos essenciais, melhoramento na extração de amido de mandioca, ração animal e na indústria têxtil. Somente elas, contribuem com aproximadamente 10% da produção total de enzimas (MUKESH et al., 2012; SANTI et al., 2014).

Aspergillus niger, *Rhizopus* spp. e *Penicillium* spp. são os principais gêneros de fungos capazes de produzir as enzimas pectinases (ORLANDELLI et al., 2012).

Várias espécies de *Pleurotus* também já foram identificadas como capazes de sintetizar essas enzimas. *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI et al., 2001) e *Pleurotus eryngii* (WANG, 2001) são alguns exemplos encontrados na literatura.

2.2.5 Celulases

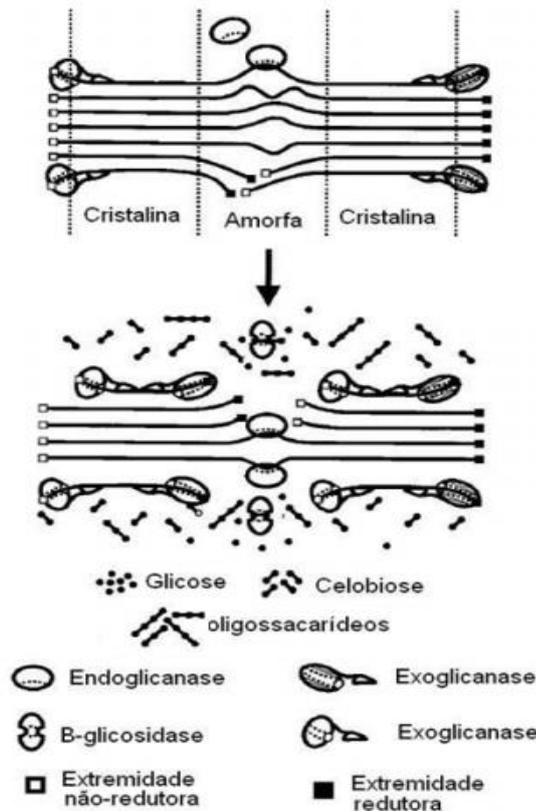
Durante a Segunda Guerra Mundial foi quando estas enzimas começaram a ser estudadas, devido à deterioração de fardas, barracas, bolsas e demais objetos fabricados de algodão. Um grupo de pesquisa das forças armadas liderado por Elwyn T. Reese foi quem isolou uma linhagem do fungo filamentoso *Trichoderma viride* e a esta foi atribuída à característica de excretar enzimas capazes de degradar celulose, nomeadas como celulase. A partir de então, deu-se início no aumento das

pesquisas e produção destas enzimas comercialmente, por volta de 1970 (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; DELABONA, 2011).

As celulasas são enzimas altamente específicas que atuam em cooperação para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que gera maior interesse industrial, pois posteriormente pode ser convertido em etanol (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela Enzyme Commission (EC) com o código 3.2.1.X, onde X varia com a celulase avaliada. Então, assim como as pectinases, elas também são divididas em três grandes grupos de acordo com seu local de atuação, neste caso, no substrato celulósico. Endoglucanase é a enzima responsável por iniciar a hidrólise e clivar ligações internas e menos compactadas da fibra celulósica, diminuindo o comprimento da fibra. Exoglucanases são enzimas que atuam na região externa da celulose, liberando glicose e celobiose como produto e por fim, o grupo das β -glicosidases que possui a função de hidrolisar os produtos de celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002; CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Na Figura 4 está exemplificado o esquema da hidrólise da celulose pelo sistema celulósico.

Figura 4- Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulases.



FONTE: DELATORRE (2010).

Muitos micro-organismos produtores de celulases já foram identificados, incluindo algumas bactérias anaeróbicas e aeróbicas, actinomicetos, algumas classes de fungos filamentosos, plantas (Fragária) e também animais (moluscos e insetos) e, em todos estes, foi verificada a capacidade de degradar a celulose natural (DELABONA, 2011).

O mecanismo de hidrólise das celulases produzidas por bactérias é menos conhecido que o dos fungos (DELATORRE, 2010). Entre as bactérias aeróbicas estão *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Nocardiopsis* sp., *Pseudomonas* sp., *Thermomonospora* sp. entre outras (BAKARE et al., 2005; LEE et al., 2008; XIAO et al., 2010; YIN et al., 2010; SARATALE e OH, 2011; VERMA et al., 2012). Compreendendo as bactérias anaeróbicas com capacidade de produzirem celulases estão *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp., entre outras (McGAVIN e FORSBERG, 1988; FUJINO et al., 1989; WOOD, 2000).

Atualmente, as espécies de fungos mais utilizadas para produção destas enzimas são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* e

Humicola isolens, sendo a espécie *Trichoderma reesei*, melhor caracterizada e mais utilizada industrialmente para produção de celulasas (KING et al., 2009; ROCHA, 2010; FLORENCIO, 2011).

Nos fungos, as principais espécies de *Pleurotus* já verificadas com a capacidade de produzir celulasas são *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* (MENEZES, 2009; CARDOSO, 2012).

2.2.6 Proteases

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas das proteínas levando à formação de grupos amina (NH_2) e carboxila (COOH), originando polipeptídeos de menor massa molar e/ou aminoácidos livres.

Enzimas proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente e são utilizadas na indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, no tratamento do couro, na recuperação de prata em filmes de raios X e no tratamento de resíduos industriais (NASCIMENTO e MARTINS, 2006; ORLANDELLI et al., 2012; PEREIRA, 2012).

Sua função é a degradação de compostos tipicamente proteínicos, como sangue, manchas de ovos e leite (NASCIMENTO e MARTINS, 2006). Também possui a característica de alterar a elasticidade e textura do glúten e melhorar a cor e o sabor do pão. As proteases estão presentes na indústria de laticínios com a utilização da quimosina, que promove a coagulação do leite (para a produção de queijos), além de ser higroscópica, causando o endurecimento de laticínios em pó. No amaciamento de carnes são utilizadas proteases como papaína, bromelina e ficina e ainda na indústria alimentícia, elas são utilizadas na clarificação de vinhos. Enzimas proteolíticas também possuem aplicação no processamento da seda por facilitar o manuseio e aumentar a qualidade da fibra (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Proteases de origem microbianas são preferidas devido ao seu rápido crescimento, pequeno espaço requerido para o cultivo e à grande variedade catalítica que dispõem. Em geral, também são mais estáveis que as originadas de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (NEVES, 2014).

Vegetais, animais e micro-organismos (fungos e bactérias) são fontes de proteases, mas alguns estudos envolvendo leveduras (SILVA-NEVES et al., 2006) também já foram observados (NEVES, 2014).

Entre as espécies de bactérias que produzem as enzimas proteases, a que mais podemos encontrar na literatura são as da espécie *Bacillus subtilis* (DAS e PRASAD, 2010). *Aspergillus melleus*, *Aspergillus oryzae*, *Chryphonectria parasitica* e *Rhizopus niveus* são os fungos filamentosos que mais se destacam na síntese de proteases (ORLANDELLI et al., 2012). Entre os fungos do gênero *Pleurotus* capazes de produzir estas enzimas, podemos destacar as espécies *P.florida* e *P. ostreatus* (NEVES, 2014).

2.2.7 Inulinases

Inulinases (EC 3.2.1.7) são 2,1- β -D-frutano fructanohidrolase que convertem inulina, um polímero de frutose ligadas em β -2,1, em frutose (TREICHEL, 2004). Foram descobertas em 1900, por Lindner, que observou a capacidade de utilização de inulina por cepas de *Kluyveromyces marxianus* (COGHETTO, 2011).

A inulina é um polímero constituído de cadeias lineares de frutoses, terminadas com resíduos de glicose. É muito utilizada na indústria de alimentos, pois sua composição confere um sabor adocicado sem alterar o produto final, além disso, apresenta algumas características específicas, como baixa solubilidade em água e a capacidade de aumentar a viscosidade do meio (SOUZA et al., 2015).

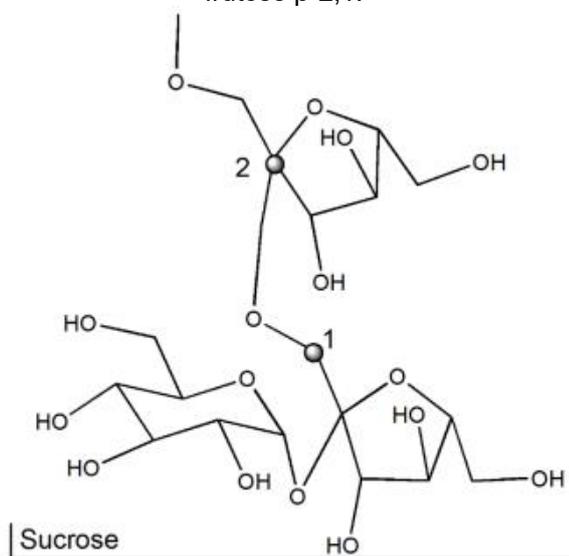
Podem ser divididas em duas categorias de acordo com o seu modo de ação, exo-inulinases e endo-inulinases. Exo-inulinases quebram as ligações β -2,1 da inulina a partir do terminal não redutor da cadeia, liberando frutose como único produto da reação (GUIRAUD e GALZY, 1989). Endo-inulinases quebram as ligações β -2,1 internas da inulina em diferentes pontos da cadeia, produzindo oligômeros de frutose (VANDAMME e DERYCKE, 1983).

Inulinases catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (SOUZA et al., 2015). Elas podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contêm inulina como dália, chicórias,

alcachofras e yacon (HAULY e MOSCATTO, 2002) ou através de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (TREICHEL, 2004; VIJAYARAGHAVAN et al., 2009).

Na indústria alimentícia elas têm grande importância na produção de xarope de frutose pela hidrólise enzimática da inulina, com rendimentos de até 95%. Garantem um poder adoçante com menor cariogenicidade e teor calórico. Na área médica, é utilizada como ferramenta de diagnóstico em problemas renais (SANTIAGO e SOUZA-MOTTA, 2006). Estas enzimas também têm sido utilizadas na produção de fruto-oligossacarídeos. Esses compostos têm recebido especial atenção pelo aumento da procura no consumo de alimentos saudáveis ou seus ingredientes. A ingestão de fruto-oligossacarídeos estimula o aumento da população de bifidobactérias, principal gênero de bactérias da microflora intestinal (TREICHEL, 2004). Na Figura 5 está descrita a estrutura base de uma molécula de fruto-oligossacarídeo, com moléculas de sacarose ligadas a uma ou mais porções de frutose em β -2,1.

Figura 5– Estrutura-base de uma molécula de fruto-oligossacarídeo com as unidades de ligações de frutose β -2,1.



FONTE: TRINCONE (2015).

As inulinases obtidas por meio de leveduras mais estudadas são aquelas produzidas por *Kluyveromyces* (*K. marxianus* var. *marxianus*, incluindo *K. marxianus* e *K. fragilis*, se estendendo a *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *bulgaricus*). Elas são consideradas ideais na produção de inulinases, pois crescem rapidamente

em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades da enzima (COGHETTO, 2011).

Também já foi verificada a produção destas enzimas por bactérias, mas seu rendimento neste micro-organismo não se compara a fungos ou leveduras. Entretanto, devido à habilidade de um grande número de bactérias sobreviver a altas temperaturas, estudos isolando bactérias que podem produzir inulinases estáveis em elevadas temperaturas vêm sendo desenvolvidos. *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Staphylococcus* são alguns exemplos de bactérias capazes de produzir estas enzimas (SINGH e GILL, 2006; CASTANON, 2013).

Tanaka et al. (1972) e Nakayama (1983) produziram enzimas inulinolíticas utilizando cepas bacterianas de *Arthrobacter ureafaciens*. Takahashi et al. (1985) utilizou cepas de *Streptococcus salivarius*. Allais et al. (1987), Uzunova et al. (2001), Uzunova et al. (2002) e Zhrebtsov et al. (2002) já estudaram o gênero *Bacillus* spp. para produção de inulinase e obtiveram resultados positivos.

Inulinases podem ser produzidas por diversas linhagens de fungos. *Panaeolus papillonaceus* foi o primeiro fungo basidiomiceto do qual se conseguiu a extração desta enzima. Posteriormente, ela já foi produzida por *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium*, e mais tarde, por meio de muitas pesquisas, concluiu-se que *Aspergillus* spp. estão entre as melhores fontes para produção de inulinases (SINGH e GILL, 2006; CASTANON, 2013).

2.3 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, isto é, possuem núcleo com membrana nuclear e são quimiorganotróficos. Apresentam dois tipos morfológicos principais, os fungos filamentosos, que formam hifas e as leveduras, que se distinguem dos fungos por serem unicelulares. Eles desenvolvem-se em matéria orgânica morta e seu crescimento é afetado por fatores químicos e físicos como umidade, temperatura, pH, concentração de oxigênio, micronutrientes, fontes de carbono, entre outros (PUTZKE e PUTZKE, 1998; ALVES, 2010).

Sua forma usual de reprodução é por formação de esporos e são importantes na cadeia alimentar porque decompõem vegetais mortos e assim, reciclam elementos vitais. São também úteis para os animais, auxiliando-os na quebra de lignina e celulose de plantas, possibilitando assim sua digestão. As plantas também dependem de simbiose com fungos, que as ajudam a absorverem minerais e água do solo. Para o homem, os fungos são muito utilizados como alimentos (cogumelos) e na produção de alimentos e bebidas, bem como na produção de compostos com propriedades terapêuticas e medicinais (PUTZKE e PUTZKE, 1998; TORTORA et al., 2008; FACCHINI et al., 2014).

Os fungos compõem um reino distinto, o reino Fungi. Hibbet et al. (2007) descrevem uma abrangente classificação filogenética do Reino Fungi, com base em recente análise filogenética molecular. Dessa forma, correntemente, são propostos sete filos: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Neste último, encontram-se os fungos da podridão branca e os cogumelos comestíveis e medicinais.

2.4 *Pleurotus*

Fungos do gênero *Pleurotus* pertencem à classe dos basidiomicetos, são classificados como fungos da podridão branca e têm potencial para serem utilizados como biocatalisadores devido à sua versatilidade no ataque de uma ampla variedade de compostos por meio de enzimas intra e/ou extracelulares (MARCO-URREA et al., 2009).

O gênero *Pleurotus* compõe um grupo de cogumelos dispersos mundialmente, são invasores, apresentam grande produtividade e adaptabilidade e seu complexo enzimático inclui as enzimas celulase, celobiase, hemicelulases, ligninases e lacases (CASTRO et al., 2004).

São comestíveis e de aroma agradável, rico em vitaminas e aminoácidos e que apresenta propriedades terapêuticas. São conhecidos no Brasil como cogumelo gigante ou fungi e adaptam-se a diversos substratos sem a necessidade de uma

pré-fermentação. Possuem rápido crescimento, destacando-se em relação a outros organismos (GERN et al, 2000; DIAS et al., 2003; BETTIN et al., 2011).

Os resíduos agroindustriais como palha-de-arroz, serragem, bagaço de cana-de-açúcar e muitos outros representam uma fonte lignocelulósica abundante e renovável de substratos que podem ser utilizados para a produção de cogumelos e seus metabólitos. Poppe (2004) realizou uma pesquisa em nível mundial e relata que cerca de 90 tipos de resíduos agroindustriais foram comprovados como substrato para o crescimento de fungos do gênero *Pleurotus*. No entanto, alguns resíduos listados, como palha decereal, serragem e toras de madeira, podem ser subdivididos em pelo menos 100 tipos individuais de resíduos relacionados a diferentes espécies de plantas. Isto significa que, de fato, uma variedade de cerca de 200 resíduos diferentes estão disponíveis como substratos para *Pleurotus*. Além do cultivo sólido para a produção de corpos frutíferos (basidiomas), *Pleurotus* vem sendo cultivado em meio líquido (cultivo submerso) para produção de biomassa com propriedades terapêuticas (GERN et al., 2008; FACCHINI et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015).

O cultivo em meio líquido apresenta algumas vantagens em relação ao cultivo em meio sólido, como menor área para o cultivo, melhor controle de parâmetros como pH, temperatura, oxigênio dissolvido etc. e facilidade de extração dos produtos excretados. Atualmente, tem-se estudado cada vez mais a utilização de substratos renováveis, com o intuito de elevar a produção de enzimas e diminuir os custos na produção. O tipo de resíduo utilizado também influencia diretamente o tipo da enzima produzida (GREGORI et al., 2008; MELO et al., 2014).

Vários estudos envolvendo este gênero de cogumelos têm isolado, identificado e relatado seus produtos por apresentarem um grande número de propriedades e atividades importantes tanto na saúde quanto no meio ambiente como ação antitumoral (DALONSO et al., 2010) e antimicrobiana (WISBECK et al., 2005), diminuir o colesterol sanguíneo (KIM et al., 2002), capacidade de biorremediação de solos contaminados (PURNOMO et al., 2010), biodegradação de compostos poluentes (FURLAN et al., 2008; LIBARDI JR. et al., 2012) e na bioconversão de resíduos agroindustriais (RAMPINELLI et al., 2010).

Uma importante característica destes fungos é a de possuir a habilidade de secretar várias enzimas lignocelulolíticas, como peroxidases, lacases (LIBARDI JR.,

2010; SANTOS et al., 2015), celulases (KOSHY, 2012), proteases (SHIN e CHOI, 1998; SILVA et al., 2015), amilases (KITAMURA et al., 2016), pectinases (HUERTA, et al., 2014) e lipases (GUIZELINI et al., 2015).

2.4.1 Produção de enzimas por *Pleurotus* spp.

A produção de lipase por *Pleurotus sapidus* foi relatada por Zorn et al. (2003). Os autores avaliaram a hidrólise de ésteres de carotenoides provenientes de páprica e cravo-de-defunto (malmequer) pelo caldo de cultivo livre do micélio fúngico. A enzima fúngica foi capaz de promover a hidrólise completa de vários ésteres de carotenoides na ausência de sais biliares para a emulsificação. Linke et al. (2005) isolaram lipases do sobrenadante do caldo de cultivo submerso de *Pleurotus sapidus* utilizando fracionamento em coluna de espuma. Os autores obtiveram atividade de 312 U/L em meio de cultivo nutriente, na ausência de glicose, após 5 dias de cultivo. Guizelini et al. (2015) avaliaram o crescimento de *Pleurotus pulmonarius* em cultivos contendo óleo vegetal, azeite de oliva e tween 20. Os autores obtiveram redução de até 98,93% do óleo. Almeida (2016) detectou produção de lipase por *P. ostreatus* também em meio de cultivo contendo azeite de oliva e tween 20.

A produção de lacase pelo gênero *Pleurotus* pode ser realizada tanto em cultivo sólido quanto submerso, e dois fatores extremamente importantes são o tipo de substrato e o método de cultivo do fungo, garantindo assim a expressão das enzimas lignocelulolíticas e uma boa proporção das enzimas produzidas (LIBARDI JR., 2010). A síntese de enzimas é fortemente afetada pela linhagem do fungo, composição do substrato e principalmente pela concentração de nitrogênio no meio de cultivo (D'AGOSTINI et al., 2011). Outro fator de sucesso na produção de lacase em escala laboratorial é observada quando há agitação no meio de cultivo (CABANA, 2007). Um estudo realizado por Quevedo-Hidalgo et al. (2015) objetivando a produção de lacases por *Pleurotus ostreatus* reporta atividade máxima da enzima de 4.693,4 U/L. Téllez-Téllez et al. (2008) compararam a produção de lacases em cultivos sólido e submerso utilizando *Pleurotus ostreatus*. Os autores

verificaram uma maior atividade enzimática em cultivo sólido (13.000 U/L) do que em cultivo submerso (2.430 U/L). Em uma revisão sobre produção de lacases por fungos do gênero *Pleurotus*, Rampinelli (2016) reporta atividade enzimática variando de 500 U/L (ABO-STATE et al., 2011) a 15.000 U/L (ZUCCA et al., 2011) para *Pleurotus sajor-caju* e de 20,2 U/L (LIBARDI JR. et al., 2011) a 20.000 U/L (SILVA et al., 2012) para *Pleurotus ostreatus*, indicando a dependência da produção e da atividade da enzima com o meio e as condições de cultivo utilizadas, bem como com a espécie fúngica produtora.

Existe um conjunto complexo de enzimas hidrolíticas envolvidas na biodegradação de celulose (KOSHY, 2012). Souza et al. (2008) estudaram a síntese de celulase por fungos do gênero *Pleurotus*, em meio sólido, utilizando CMC como fonte de carbono. Halos claros indicando a degradação da CMC de até 20,43 mm de diâmetro foram observados, em 96 horas de incubação. Quevedo-Hidalgo et al. (2015) avaliaram a produção de endoglucanases e exoglucanases por *Pleurotus ostreatus* e encontraram atividades máximas de 17,4 U/L e 1,325 U/L, respectivamente.

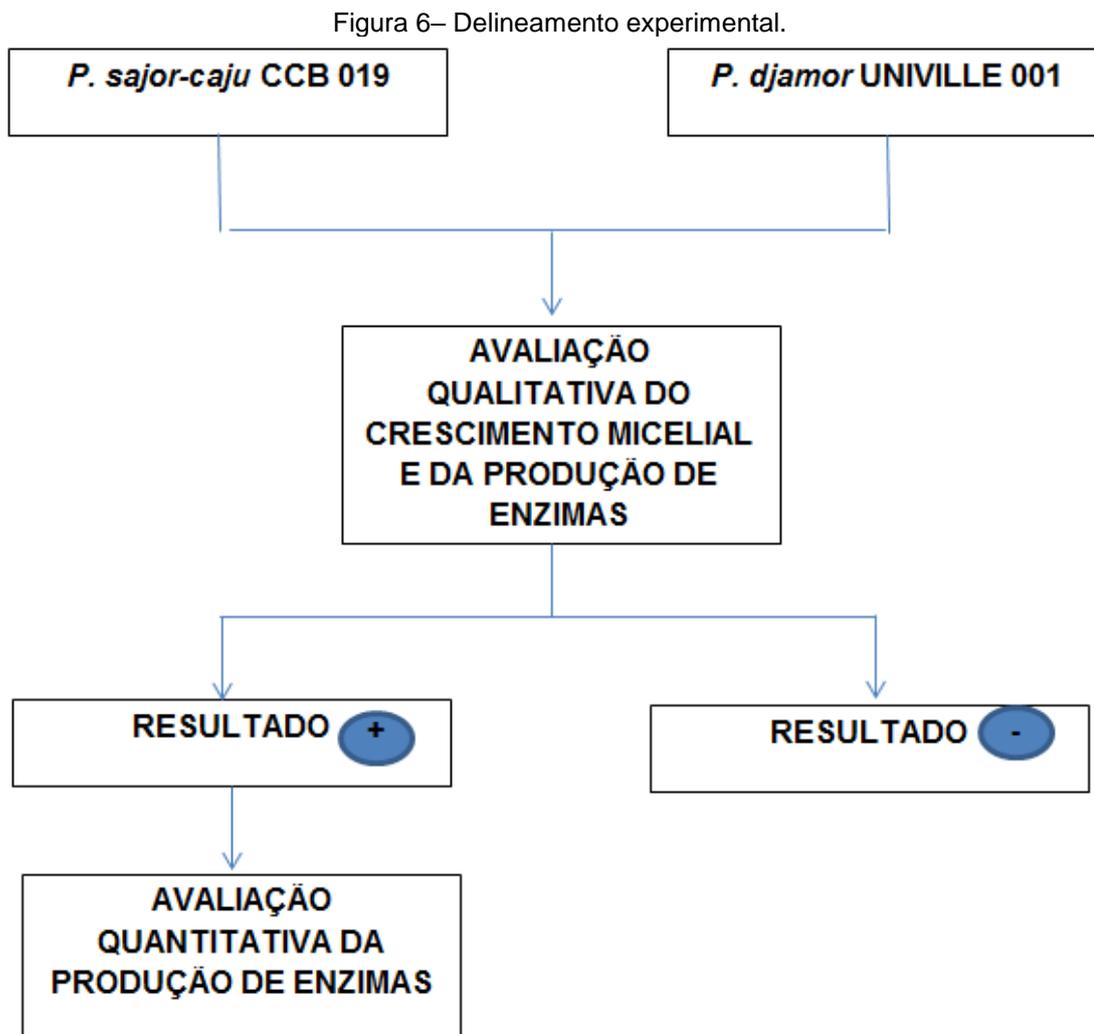
Palmieri et al. (2001) verificaram a produção de proteases fúngicas cultivando *Pleurotus ostreatus* em diferentes substratos e os valores para atividades encontradas variaram entre 0,03 e 10 U/mL. Souza et al. (2008) avaliaram a produção de proteases por *Pleurotus sp.* em meio sólido, utilizando leite-gelatina como substrato. O resultado máximo dos halos foi de 15,9 mm de diâmetro em 96 horas de incubação. Téllez-Téllez et al. (2008) verificaram a produção de enzimas proteolíticas por *Pleurotus ostreatus* em cultivo sólido e cultivo líquido, porém só foi observada a produção das enzimas no cultivo sólido.

Huerta et al. (2014) avaliaram a produção de enzimas pectinolíticas por *Pleurotus ostreatus* e a atividade máxima foi observada após 168 horas de cultivo.

Não foram encontrados, na literatura, artigos relacionados à produção de inulinase por *Pleurotus* spp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental utilizado neste trabalho está apresentado na Figura 6.



3.1 Micro-organismo e manutenção

Este trabalho foi desenvolvido utilizando as linhagens *Pleurotus sajor-caju* CCB019, obtida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, isolada no Campus Joinville da UNIVILLE (Joinville, SC). Ambas as linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio WDA (FURLAN et al., 1997) composto por 20 g de glicose e 15 g de ágar para cada litro de extrato de trigo. O extrato de trigo foi preparado pela

infusão em água de grãos de trigo previamente lavados, na proporção de 1:2 (grãos:água deionizada, m/m). Os grãos foram mantidos por 10 min em ebulição, resfriados à temperatura ambiente e filtrados em gaze e peneira. O extrato de trigo livre dos grãos foi utilizado no preparo do meio WDA. As placas de Petri contendo o meio WDA e completamente colonizadas pelos fungos (30°C, aproximadamente 7 dias) foram armazenadas sobre refrigeração ($4\pm 1^\circ\text{C}$) e repicadas a cada 3 meses.

3.2 Avaliação qualitativa do crescimento micelial e da produção de enzimas por *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus djamor*

A avaliação qualitativa do crescimento micelial e da produção de enzimas foi realizada pelo cultivo sólido dos fungos em meio de cultivo contendo substrato e suplementos próprios para a identificação da produção de cada enzima. Os meios de cultivo foram autoclavados a 120°C e 1 atm, por 10 min e vertidos assepticamente (aproximadamente 20 mL) em placas de Petri esterilizadas. As placas contendo o meio de cultivo foram inoculadas com um disco de ágar (9 mm) contendo o micélio fúngico proveniente da cultura de manutenção (item 3.1) e incubadas por até 4 dias, a 30°C. Em todos os testes, o crescimento micelial foi avaliado pela presença do conjunto de hifas formando o micélio fúngico, característico do gênero *Pleurotus*.

3.2.1 Presença de lipase

A avaliação da produção de lipase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 20 g de glicose e 15 g de ágar dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1) e suplementado com 1% (v/v) de óleo de soja (Soya®), 0,001g/L de Tween 80 e 0,001g/L de rodamina B (Êxodo). A detecção da produção de lipase baseou-se na interação de rodamina B com os ácidos graxos liberados na hidrólise enzimática do óleo de soja. Após a incubação, as placas foram irradiadas com luz UV e o resultado positivo foi verificado pela formação de halo fluorescente alaranjado (KOUKER e JAEGER, 1987).

3.2.2 Presença de lacase

A avaliação da produção de lacase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar, 40 mg de CuSO_4 como indutor de lacase e 0,1% de guaiacol (Vetec) como substrato da enzima (MELO et al., 2016; DEVASIA e NAIR, 2016) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A presença da cor marrom intenso sob e ao redor da colônia, resultante da oxidação do guaiacol, foi considerada reação positiva para a presença de atividade de lacase.

3.2.3 Presença de amilase

A avaliação da produção de amilase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar e 10 g de amido (Synth) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). Após o período de incubação dos fungos, 2 mL de solução de lugol (5 g de KI; 1 g de iodo; 100 mL de H_2O) foram vertidos sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução de lugol foi descartada. Neste teste, o amido presente no meio de cultura, ao reagir com o iodo (lugol), forma um complexo de cor azul intensa. A formação de um halo claro ao redor da colônia indica que o amido foi degradado pela presença da amilase, impedindo o desenvolvimento da cor azul (MARCHI, BORGES e MIZUBUTI, 2006).

3.2.4 Presença de pectinase

A avaliação da produção de pectinase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar e 3 g de pectina cítrica (Sigma) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). Após o período de incubação dos fungos, 2 mL de solução de lugol (5 g de KI; 1 g de iodo; 100 mL de H_2O) foram vertidos sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução de lugol foi descartada e a atividade pectinolítica detectada pela formação de halo amarelado circundando zona

azulada indicando a degradação da pectina (MARCHI, BORGES e MIZUBUTI, 2006).

3.2.5 Presença de celulase

A avaliação da produção de celulase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar e 5 g de CMC dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). Decorrido o período de incubação, foram adicionados 10 mL de solução vermelho congo (1 g/L) em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Posteriormente, o excesso foi drenado e 10 mL de solução de NaCl (1M) foram adicionados em cada placa, deixando-se agir por 30 minutos, também em temperatura ambiente. O corante Congo Red é adsorvido na superfície hidrofóbica da CMC e após a remoção do excesso de solução salina, a observação de zonas claras de hidrólise em torno das colônias, indica a degradação da CMC pela presença da enzima celulase (TEATHER e WOOD, 1982).

3.2.6 Presença de protease

A avaliação da produção de proteases foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar e 50 g de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). Para evitar coagulação proteica, o extrato de trigo e a solução de leite em pó foram autoclavados separadamente (121°C e 1 atm, por 10 min) e após, misturados assepticamente. Decorrido o período de incubação, a presença de halo claro ao redor da colônia indicando a zona de hidrólise proteica foi considerada como teste positivo da presença de proteases.

3.2.7 Presença de inulinase

A avaliação da produção de inulinase foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 15 g de ágar e 10 g de inulina (Fluka) dissolvidos em 1 L de

extrato de trigo (item 3.1). Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de solução de lugol (5 g de KI; 1 g de iodo; 100 mL de H₂O) foram vertidos sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução de lugol foi descartada podendo-se observar a coloração marrom do meio resultante da reação da inulina com o iodo (lugol). A atividade inulinolítica foi detectada pela formação de halo claro ao redor da colônia (LI et al., 2011) indicando que a inulina foi degradada pela presença da inulinase, impedindo o desenvolvimento da cor marrom.

3.3 Quantificação da produção de enzimas por *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus djamor*

A quantificação da atividade enzimática foi realizada pelo cultivo submerso dos fungos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 200 ml de meio de cultivo contendo substrato próprio para a produção (indução) de cada enzima. Os frascos foram autoclavados a 121°C, por 10 min, inoculados com 3 discos de ágar contendo micélio fúngico proveniente da cultura de manutenção (item 3.1) e mantidos sob agitação (movimento rotatório) a 100 min⁻¹, por 14 dias. Para a determinação da atividade enzimática, amostras de 3 mL foram retiradas periodicamente (0, 3, 5, 7, 9, 11 e 14 dias) e centrifugadas (8.870 x g) para remoção das células. O sobrenadante foi congelado e utilizado como caldo enzimático bruto.

3.3.1 Atividade lipolítica

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 20 g de glicose dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1) e suplementado com 1% (v/v) de óleo de soja (Soya®) e 0,001g/L de Tween 80. A atividade lipolítica foi quantificada pelo método titulométrico, de acordo com Dellmora-Ortiz et al. (1997). 2,5 mL de emulsão de óleo de oliva 50% (v/v) (substrato) em goma guar 0,1% (p/v) foram adicionados a 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e 1,5 mL do caldo enzimático bruto. A mistura foi mantida sob agitação magnética, a 37°C. Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma

mistura de etanol, acetona e água (1:1:1 v/v/v). Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação contra NaOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Um “branco” de cada amostra foi preparado pela inativação da enzima por adição prévia da mistura etanol-acetona ao meio reacional. Uma unidade de atividade enzimática determinada pelo método titulométrico (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

3.3.2 Atividade de lacase

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 40 mg de CuSO₄ como indutor de lacase, 20 g/L de glicose e 0,1% de guaiacol (Vetec) como substrato da enzima (MELO et al., 2016; DEVASIA e NAIR, 2016) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A atividade da enzima lacase foi determinada pelo monitoramento da absorbância (420 nm) produzida pela oxidação do composto ABTS (2,2-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate) na concentração de 1,8 mM, utilizado como substrato (BUSWELL, CAI e CHANG, 1995). Em um volume de 0,8 mL de ABTS foram acrescentados 0,1 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 0,1 mL do caldo enzimático bruto. A mistura foi mantida à 30°C e a variação de absorbância foi monitorada por 1 min. A atividade da enzima foi expressa em U L⁻¹ (μmoles produto min⁻¹ L⁻¹). Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 36.000 M⁻¹ cm⁻¹. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 1.

$$\frac{U L^{-1} = \Delta ABS * V_R * 10^6}{\epsilon * V_C * t} \quad \text{Eq. 1}$$

Na qual:

Δ ABS, absorbância final - absorbância inicial;

ε, coeficiente de extinção molar (36.000 M⁻¹cm⁻¹);

V_C, volume de caldo enzimático (L);

V_R, volume da reação (L);

t, tempo de reação (min).

3.3.3 Atividade amilolítica

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 10 g de amido (Synth) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A atividade de amilase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise do amido pela enzima. 0,5 mL do caldo enzimático bruto foram adicionados a 0,5 mL de uma solução 0,5% (m/v) de amido solúvel em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. A reação foi conduzida a 37 °C, sob agitação, por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) procedendo-se a determinação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise do amido, de acordo com Miller (1959), usando como padrão a D- glicose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 e 1,0 g/L. A mistura foi incubada por 10 min a 100°C e a reação foi novamente interrompida, por resfriamento em banho de gelo. Após o resfriamento, 8 mL de água foram adicionados e a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Bel Photonics), no comprimento de onda de 540 nm. Um branco da amostra foi preparado substituindo-se o extrato enzimático por água. Para avaliar a presença de açúcares redutores provenientes do caldo enzimático, amostras contendo tampão fosfato 100 mM, pH 6,5, em substituição à solução de amido, foram submetidas ao mesmo procedimento das demais amostras e a quantidade de açúcares redutores encontrada foi diminuída daquela proveniente da reação do caldo enzimático com o amido. A concentração de açúcares redutores assim determinada também foi utilizada para a construção das curvas de concentração de AR no meio de cultivo. Uma unidade de amilase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de açúcares redutores (como equivalentes de glicose) por minuto, nas condições estabelecidas no teste, calculada de acordo com a Equação 2.

$$\frac{U}{mL} = AR * \frac{V_R}{V_C} * \frac{1}{t} \text{Eq. 2}$$

Na qual:

AR = Açúcar redutor ($\mu\text{mol/mL}$);

V_R = Volume da reação (mL);

V_C = Volume do caldo enzimático (mL);

t = tempo de reação (min).

3.3.4 Atividade pectinolítica

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 10 g de pectina cítrica (Sigma) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A atividade de pectinase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise da pectina. 0,5 mL de uma solução de pectina cítrica 0,5% (Sigma) em tampão citrato 0,1 M e pH 4,0, incubados em banho-maria à 50 °C durante 5 min para estabilização da temperatura foram adicionados de 0,5 mL do extrato contendo a enzima, agitando-se vigorosamente. A reação foi incubada a 50 °C durante 15 min, interrompendo-se a reação com a adição de 1,0 mL de DNS, procedendo-se a determinação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise da pectina, de acordo com Miller (1959), usando como padrão o ácido D-galacturônico monoidratado (Sigma) (0,1, 0,2, 0,5 e 0,8 e 1,0 g/L). A mistura foi incubada por 10 min a 100°C e a reação foi novamente interrompida, por resfriamento em banho de gelo. Após o resfriamento, 8 mL de água foram adicionados e a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Bel Photonics), no comprimento de onda de 540 nm. Um branco da amostra foi preparado substituindo-se o extrato enzimático por água. Para avaliar a presença de açúcares redutores provenientes do caldo enzimático, amostras contendo tampão citrato 0,1 M e pH 4,0, em substituição à solução de pectina, foram submetidas ao mesmo procedimento das demais amostras e a quantidade de açúcares redutores encontrada foi diminuída daquela proveniente da reação do caldo enzimático com a pectina. A concentração de açúcares redutores assim determinada também foi utilizada para a construção das curvas de concentração de AR no meio de cultivo. A unidade de atividade foi determinada como a quantidade de ácido D-galacturônico liberado por mililitro por minuto ($\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$) nas condições estabelecidas, e calculada utilizando a Equação 3.

$$\frac{U}{\text{mL}} = AR * \frac{V_R}{V_C} * \frac{1}{t} \quad \text{Eq. 3}$$

Na qual:

AR = Açúcar redutor ($\mu\text{mol/mL}$);
 V_R = Volume da reação (mL);
 V_C = Volume do caldo enzimático (mL);
 t = tempo de reação (min).

3.3.5 Atividade celulolítica

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 10 g de carboximetilcelulose (CMC) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A atividade da celulase foi determinada pelo método da carboximetilcelulose (CMC), seguindo uma adaptação do procedimento descrito em Ghose (1987), baseado na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de CMC devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose. Uma amostra de 0,5 mL do extrato enzimático foi adicionada a 0,5 mL de uma solução de CMC (Sigma) a 1% (m/v), preparada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, sendo mantida em banho termostático a 50°C durante 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi adicionada de 1 mL de DNS, de acordo com metodologia desenvolvida por Miller (1959), usando como padrão a D- glicose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 e 1,0 g/L. A mistura foi incubada por 10 min a 100°C e a reação foi novamente interrompida, por resfriamento em banho de gelo. Após o resfriamento, 8 mL de água foram adicionados e a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Bel Photonics), no comprimento de onda de 540 nm. Com o fim de determinar a concentração de açúcares redutores provenientes do caldo de cultivo, amostras na qual 0,5 mL do extrato enzimático foram misturados com 0,5 mL da solução de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) em substituição a carboximetilcelulose foram submetidas ao mesmo procedimento das demais amostras e a quantidade de açúcares redutores encontrada foi diminuída daquela proveniente da reação do caldo enzimático com a CMC. A concentração de açúcares redutores assim determinada também foi utilizada para a construção das curvas de concentração de AR no meio de cultivo. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose, por minuto, a 50 °C e foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\frac{U}{mL} = AR * \frac{V_R}{V_C} * \frac{1}{t} \quad \text{Eq. 4}$$

Na qual:

AR = Açúcar redutor ($\mu\text{mol/mL}$);

V_R = Volume da reação (mL);

V_C = Volume do caldo enzimático (mL);

t = tempo de reação (min).

3.3.6 Atividade proteolítica

A avaliação da produção de proteases foi realizada utilizando-se um meio de cultivo composto por 50 g de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). Para evitar coagulação proteica, o extrato de trigo e a solução de leite em pó foram autoclavadas separadamente e após, misturados assepticamente. A atividade proteolítica foi determinada de acordo com Merheb (2010). A mistura da reação foi composta de 0,4 mL de caseína (Sigma) 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 como substrato; 0,4 mL tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 35°C e ao final de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10%. As amostras foram centrifugadas a 2300 x g, por 5 minutos. Um controle foi preparado, no qual o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. A absorbância da mistura reativa foi lida a 280 nm em espectrofotômetro UV-1601PC UV - visible - Shimadzu. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições definidas no ensaio. A atividade proteolítica foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$\frac{U}{mL} = \Delta ABS * \frac{V_R}{V_C} * \frac{1}{t} * \frac{1}{0,1}$$

Eq. 5

Na qual:

ΔABS , absorbância final - absorbância inicial;

V_R é o volume da reação (mL);

V_c é o volume de caldo enzimático (mL);

t é o tempo da reação (min).

3.3.7 Atividade inulinolítica

P. sajor-caju e *P. djamor* foram cultivados em meio de cultivo composto por 10 g de inulina (Fluka) dissolvidos em 1 L de extrato de trigo (item 3.1). A atividade de inulinase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise da inulina pela inulinase. 0,5 mL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 0,5 mL de uma solução de inulina (Fluka) a 2% (m/v) em 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 9,0. A mistura foi incubada a 55°C, por 10 min. Após esse tempo, a reação foi adicionada de 1 mL de DNS, de acordo com metodologia desenvolvida por Miller (1959), usando como padrão a D-frutose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 e 1,0 g/L. A mistura foi incubada por 10 min a 100°C e a reação foi novamente interrompida, por resfriamento em banho de gelo. Após o resfriamento, 8 mL de água foram adicionados e a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Bel Photonics), no comprimento de onda de 540 nm. Com o fim de determinar a concentração de açúcares redutores provenientes do caldo de cultivo, amostras na qual 0,5 mL do extrato enzimático foram misturados com 0,5 mL da solução de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) em substituição a inulina foram submetidas ao mesmo procedimento das demais amostras e a quantidade de açúcares redutores encontrada foi diminuída daquela proveniente da reação do caldo enzimático com a inulina. A concentração de açúcares redutores assim determinada também foi utilizada para a construção das curvas de concentração de AR no meio de cultivo. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de frutose, por minuto, a 50 °C e foi calculada de acordo com a Equação 6.

$$\frac{U}{mL} = AR * \frac{V_R}{V_C} * \frac{1}{t} \quad \text{Eq. 6}$$

Na qual:

AR = Açúcar redutor (μmol/mL);

V_R = Volume da reação (mL);

V_C = Volume do caldo enzimático (mL);

t = tempo de reação (min).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação qualitativa da produção de enzimas.

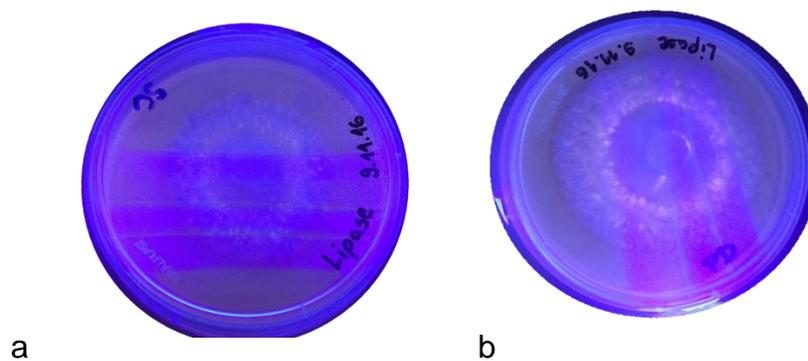
4.1.1 Presença de lipase

A detecção da produção de lipase baseou-se na interação da Rodamina B com os ácidos graxos liberados após a hidrólise enzimática do óleo, que pode ser observada na forma de fluorescência laranja com luz UV (CARISSIMI et al., 2007).

Após a incubação, as placas foram irradiadas com luz UV e o resultado positivo foi verificado pelo surgimento de halo fluorescente alaranjado.

Tanto as placas inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* quanto às inoculadas com *Pleurotus djamor* apresentaram resultados positivos tanto para o crescimento micelial utilizando óleo de soja como única fonte de carbono para a produção da enzima lipase (Figura 7).

Figura 7– Placas de Petri inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* (a) e *Pleurotus djamor* (b) em meio cultivo contendo Rodamina B e óleo de soja como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de lipase.

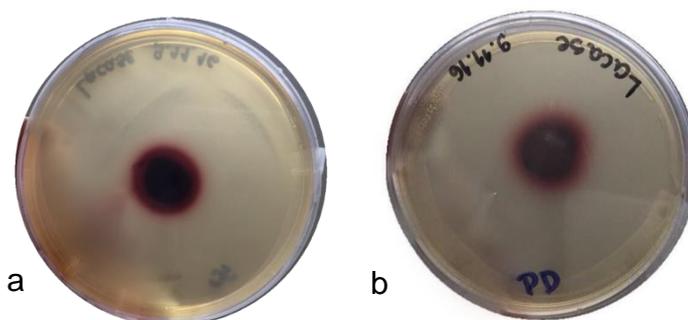


4.1.2 Presença de lacase

Após 96 horas de incubação foi possível observar a presença da cor marrom sob e ao redor da colônia fúngica em ambos os cultivos (*P. sajor-caju* e *P. djamor*) (Figura 8), indicando a oxidação do guaiacol pela lacase.

O guaiacol tem sido muito utilizado como substrato e indicador eficiente para o ensaio de lacase. A cor marrom intensa desenvolvida devido à oxidação do guaiacol pela lacase pode ser correlacionada com sua atividade usualmente lida em 450 nm (DESAI et al., 2011).

Figura 8– Placas de Petri inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* (a) e *Pleurotus djamor* (b) em meio de cultivo contendo guaiacol como substrato indutor da lacase apresentado resultado positivo para a produção de enzima.



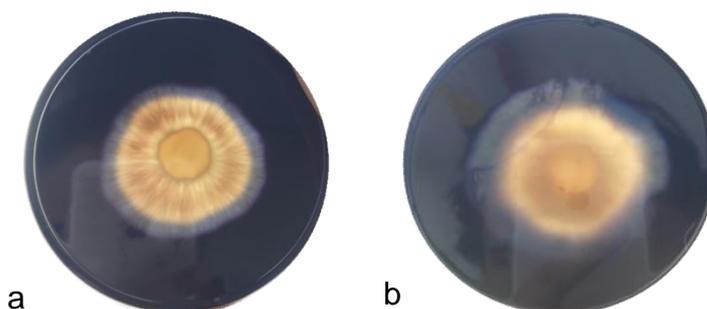
Pateis et al. (2012) realizaram um estudo visando encontrar novas linhagens de fungos produtores de lacases. Entre os 40 isolados testados, sob três indicadores diferentes (guaiacol a 0,02%, siringaldazina a 0,1%, ou o corante remazol brilliant blue (RBBR) a 0,05%), as espécies *Flaviporus venustus*, *Ganoderma djamor*, *Ganoderma lucidum*, *Hydnopolyporus fimbriatus*, *Inonotus splitgerberi*, *Oudemansiella canarii*, *Phelinus linteus*, *Pleurotus albidus* e *Xylaria globosa* apresentaram resultado positivo para produção de lacase em todos os três testes realizados.

4.1.3 Presença de amilase

Em ambos os cultivos (*P. sajor-caju* e *P. djamor*) (Figura 9) que utilizaram amido como única fonte de carbono foi possível observar o surgimento de um halo amarelado circundando o micélio fúngico, indicando a hidrólise do amido pela amilase.

O teste do lugol é amplamente utilizado devido à facilidade e rapidez dos resultados. As moléculas de amido podem ter diferentes graus de ramificação, na qual a conformação mais comum da amilase é uma hélice com seis resíduos em volta, que quando moléculas de iodo (presentes no lugol) se encaixam dentro dessa hélice, formam um complexo de amido-iodo, caracterizado pela cor azul-escuro (CAMPBELL e FARRELL, 2007). Com essa formação de coloração é possível identificar a presença ou não do amido e assim identificar a atividade da amilase.

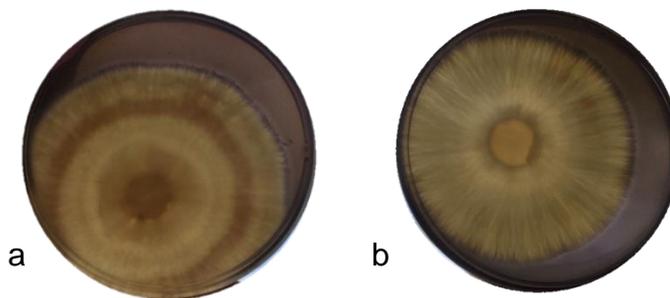
Figura 9– Placas de Petri inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* (a) e *Pleurotus djamor* (b) em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de amilase.



4.1.4 Presença de pectinase

Ambas as espécies de fungos estudadas apresentaram resultados positivos para a produção de pectinases, observado pela formação da coloração amarelada circundando a colônia fúngica, indicando a degradação da pectina utilizada como única fonte de carbono.

Figura 10– Placas de Petri inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* (a) e *Pleurotus djamor* (b) em meio de cultivo contendo pectina como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de pectinase.



Foi analisada a produção de pectinases por 180 isolados de fungos filamentosos crescidos em meio sólido acrescentado de pectina cítrica, fosfato de potássio, extrato de levedura e glicose por quatro dias. A atividade pectinolítica foi observada em 59 isolados, sendo que *Penicillium* sp. produziu halos de até 30 mm de diâmetro (GRIEBELER et al., 2015).

4.1.5 Presença de celulase

A atividade celulolítica não foi detectada em nenhum dos cultivos. Embora tenha havido o crescimento micelial para ambos os fungos, não foi possível detectar o halo claro característico da degradação da CMC utilizada como única fonte de carbono (Figura 11). Pode-se sugerir que traços de glicose possivelmente presente na composição da CMC possam ter proporcionado a fonte de carbono necessária ao crescimento fúngico.

O corante vermelho congo utilizado neste teste tem afinidade com a celulose, e o NaCl é utilizado para retirar o corante das regiões em que o substrato não foi hidrolisado (TEATHER e WOOD, 1982).

Figura 11– Placa de Petri apresentando crescimento fúngico (*P. sajor-caju*) em meio de cultivo contendo CMC (carboximetilcelulose) como única fonte de carbono. O halo claro característico da degradação da celulose pela celulase não foi observado.

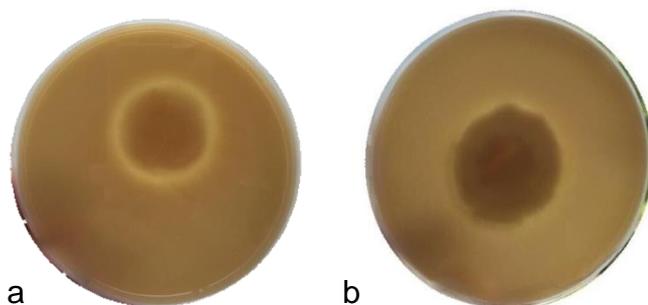


Souza et al. (2008) observaram a produção de enzimas celulolíticas em 10 linhagens fúngicas e encontraram para *Pleurotus* spp. a formação de halos de até 20,43 mm de diâmetro utilizando CMC como substrato indutor.

4.1.6 Presença de protease

Decorrido o período de incubação, foram observadas zonas de hidrólise em torno de ambas as colônias fúngicas (*P. sajor-caju* e *P. djamor*) indicando a hidrólise das proteínas do leite (utilizado como única fonte de carbono) pelas proteases.

Figura 12– Placas de Petri inoculadas com *Pleurotus sajor-caju* (a) e *Pleurotus djamor* (b) em meio de cultivo contendo leite em pó como única fonte de carbono apresentado resultado positivo para a produção de proteases.



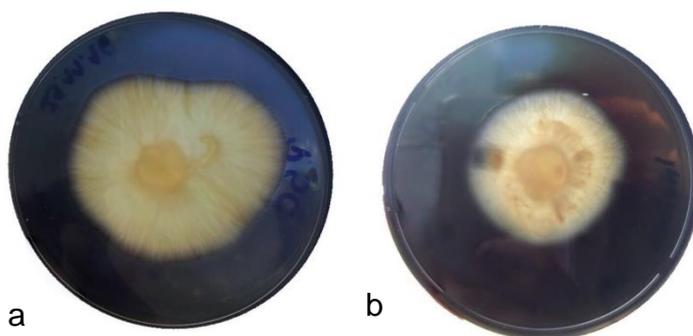
SOUZA et al. (2008) verificaram a produção de enzimas proteolíticas no cultivo de *Trametes*, *Pycnoporus*, *Ganoderma*, *Stereum*, *Daedalea*,

Cantharellus e *Pleurotus* em meio ágar-gelatina-leite durante 24 horas. Todos os fungos testados foram capazes de produzir proteases. Os halos variaram de 10,56 mm de diâmetro para *Stereum* sp. até 23,78 mm para *Pycnoporus sanguineus* 12B, sendo de 15,9 mm para *Pleurotus* sp.

4.1.7 Presença de inulinase

A atividade inulinolítica não foi detectada em nenhum dos cultivos. Embora tenha havido o crescimento micelial para ambos os fungos, não foi possível detectar o halo claro característico da degradação da inulina utilizada como única fonte de carbono (Figura 13). Pode-se sugerir que, semelhante ao ocorrido no teste da celulase, traços de glicose possivelmente presente na composição da inulina utilizada possam ter proporcionado a fonte de carbono necessária ao crescimento fúngico.

Figura 13 – Placas de Petri apresentando crescimento fúngico de *P. sajor-caju* (a) e *P. djamor* (b) em meio de cultivo contendo inulina como única fonte de carbono. O halo amarelado circundando zona azulada característico da degradação da inulina pela inulinase não foi observado.



O Quadro 2 apresenta um compilado dos resultados obtidos para a produção de enzimas por *P. sajor-caju* e *P. djamor*.

Quadro 2 - Resultados qualitativos obtidos para a produção de enzimas por *P. sajor-caju* e *P. djamor*.

Enzima	Micro-organismo
--------	-----------------

	<i>Pleurotus djamor</i>	<i>Pleurotus sajor-caju</i>
Lipase	x	x
Lacase	x	x
Amilase	x	x
Pectinase	x	x
Celulase	-	-
Protease	x	x
Inulinase	-	-

4.2 Avaliação quantitativa da produção de enzimas

4.2.1 Atividade lipolítica

Diversos autores como Mahadik et al. (2002) e Feitosa et al. (2010) utilizaram azeite de oliva como indutor da produção de lipases, porém, quando se deseja aplicar em larga escala, é inviável a adição do azeite devido ao elevado custo deste produto. Desta forma, pode-se estudar a utilização de outros indutores, como o óleo de soja, que foi utilizado neste trabalho. No entanto, embora o resultado do teste qualitativo tenha sido positivo para a presença de lipases, não foi possível quantificar a enzima pelo método escolhido. A produção de lipase por fungos do gênero *Pleurotus* foi relatada por Zorn et al. (2003) e Linke et al. (2005) (*Pleurotus sapidus*). Os autores obtiveram atividade de 312 U/L para a enzima purificada. Guizelini et al. (2015) avaliaram o crescimento de *Pleurotus pulmonarius* em cultivos contendo óleo vegetal, azeite de oliva e tween 20. Os autores obtiveram redução de até 98,93% do óleo em até 8 dias de cultivo contendo 30 g/L do substrato evidenciando a presença de lipases no meio de cultivo. Almeida (2016) estudando a produção de lipase por *P. ostreatus* em azeite de oliva e tween 20, verificou que a enzima fúngica teve maior atividade em meio de cultura contendo azeite de oliva, com produção de $1,10 \times 10^{-3}$ U/mL.

4.2.2 Atividade de lacase

A produção da enzima lacase por *P. sajor-caju* e *P. djamor* pode ser observada nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Ambos os fungos foram capazes de produzir a enzima, o que está de acordo com a literatura reportada por Rothschild et al. (2002) que citaram que a atividade da lacase tem sido relatada em alguns fungos da podridão branca. Neste trabalho, *P. djamor* apresentou produção máxima da enzima de 144,72 U/L, em 9 dias de cultivo enquanto que a produção máxima da enzima por *P. sajor-caju* foi de 37,22 U/L, em 3 dias de cultivo.

Figura 13 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em meio de cultivo contendo guaicol como substrato. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas. A linha representa a curva ajustada aos pontos.

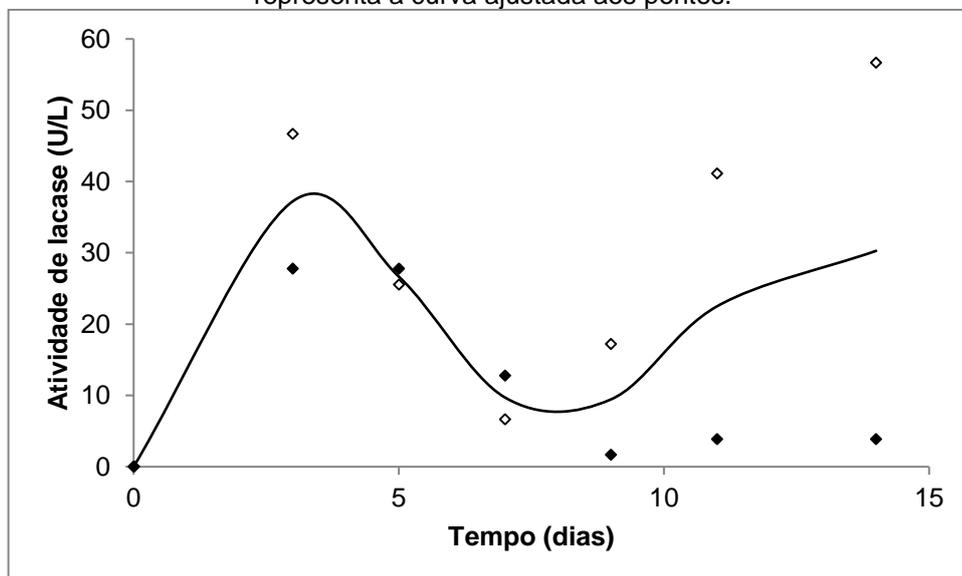
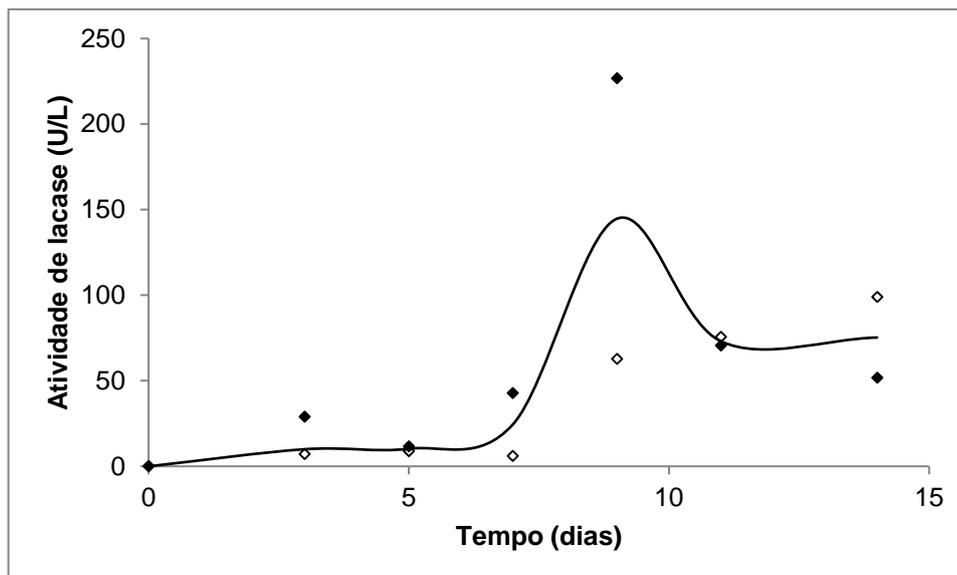


Figura 14 - Cinética de produção de lacase pelo fungo *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo guaicol como substrato. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas. A linha representa a curva ajustada aos pontos.



Diferentes fatores podem influenciar a produção de lacase e consequentemente a formação de produtos, podendo destacar: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração (IKEHATA et al., 2004).

Alexandrino et al. (2007) observaram a síntese de lacases por *Pleurotus ostreatus* em um meio de cultivo à base de casca de laranja e obtiveram 75 U/g como atividade máxima da enzima, em 15 dias de cultivo.

Montanari et al. (2009) avaliaram a síntese de lacase por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator, utilizando glicose e caseína no meio de cultivo em diferentes condições. O melhor resultado obtido continha no meio 5 g/L de glicose e atingiu 50 U/mL em 48 horas de cultivo.

Zucca et al. (2011) encontraram máxima produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* (15 U/mL) utilizando um meio de cultivo contendo ácido ferúlico como indutor da enzima

Libardi JR. et al. (2012) verificaram a produção de lacases e encontraram atividade máxima de 1699,39 U/L (1,699 U/mL) para *P. ostreatus*, em 19 dias de cultivo.

Melo (2015) observou a síntese de lacases por *Pleurotus sajor-caju* em três diferentes meios de cultivo, e obteve a maior atividade enzimática de 35 U/mL em 12 dias de cultivo com o meio OXI (água de imersão de palha de bananeira suplementada com pó de cascas de banana 60 g/L, tartarato de amônio 5,4 mM e glicose 10 g/L).

Os valores de atividade de lacase encontrados neste trabalho estão de acordo com aqueles reportados na literatura para a produção da enzima em frascos agitados.

4.2.3 Atividade amilolítica

A síntese das enzimas amilolíticas por *P. sajor-caju* e *P. djamor* e a concentração de açúcares redutores no meio de cultivo pode ser observada nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Em ambos os cultivos houve a produção de amilases, mas em quantidades baixas, com máxima atividade de 0,35 U/mL para *P. sajor-caju* (11 dias de cultivo) e 0,45 U/mL para *P. djamor*, em 7 dias de cultivo. Dois picos de atividade são observados para *Pleurotus sajor-caju*, um aproximadamente em 5 dias e outro em aproximadamente 10 dias, sugerindo a atuação de diferentes amilases ou ainda de diferentes isoformas da enzima. Souza et al. (2008) observaram a presença de amilases em *Pleurotus*, em meio sólido, utilizando amido, como fonte de carbono. Após 120 horas de incubação, não foi identificada a presença da enzima nos meios de cultivo.

Interessante observar o aumento da concentração de açúcares redutores no meio de cultivo, indicando que o amido, única fonte de carbono presente, vai gradativamente sendo hidrolisado pela amilase, rendendo glicose livre. O início da liberação dos açúcares redutores parece coincidir com o primeiro pico de atividade amilolítica, mantendo-se constante ao longo do cultivo.

Em meio de cultivo líquido, a produção ou a liberação da glicose, ocorre devido à degradação do amido utilizado como indutor e como fonte de carbono pela ação de amilases excretadas pelos micro-organismos, que pode inibir a produção da enzima (FERNANDES et al., 2007). A liberação de glicose foi evidenciada a partir da determinação de açúcar redutor presente no meio de cultivo líquido (PANDEY et al., 2000).

Figura 15 - Cinética de produção de amilase e açúcares redutores (AR) pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas da atividade amilolítica. A linha cheia (____) representa a curva de atividade amilolítica ajustada aos pontos. A linha tracejada (-----) representa a curva de concentração de açúcares redutores no meio de cultivo.

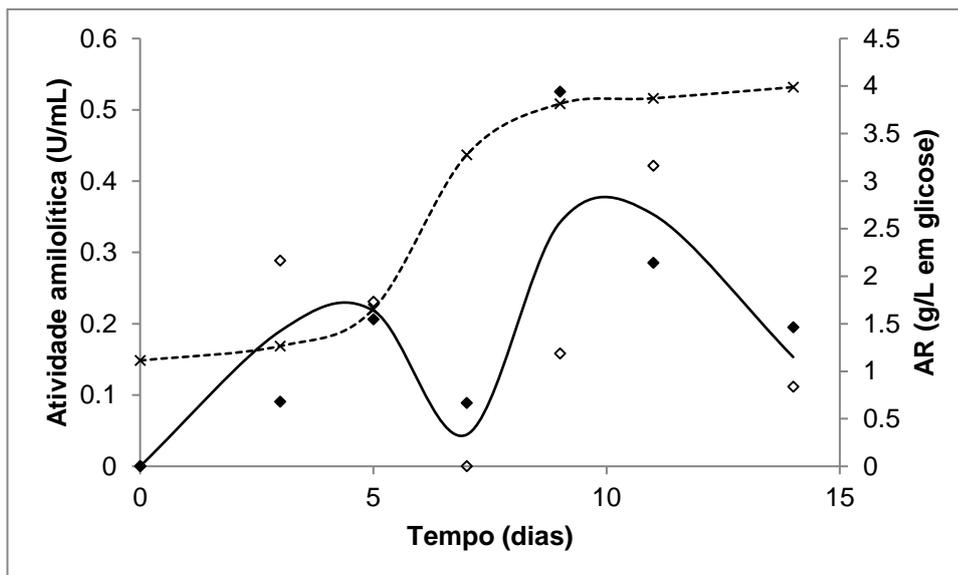
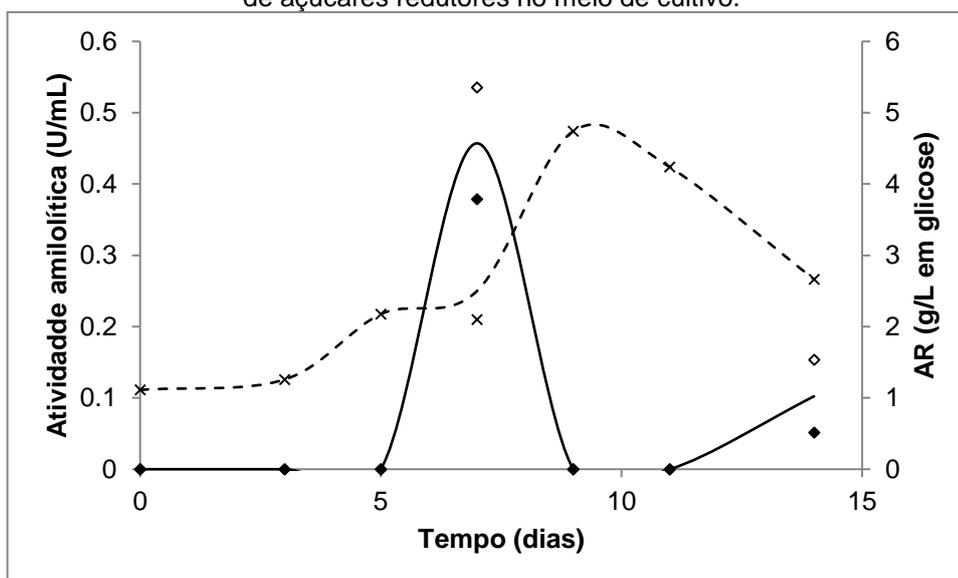


Figura 16 - Cinética de produção de amilase e açúcares redutores (AR) pelo fungo *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo amido como única fonte de carbono. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas da atividade amilolítica. A linha cheia (—) representa a curva de atividade amilolítica ajustada aos pontos. A linha tracejada (----) representa a curva de concentração de açúcares redutores no meio de cultivo.



4.2.4 Atividade pectinolítica

A atividade das enzimas pectinolíticas produzidas por *Pleurotus sajor-caju* e a concentração de açúcares redutores (AR) presentes nomeio de cultivo podem ser observadas nas Figuras 18. O valor máximo de atividade enzimática obtido foi de 0,29 U/mL, verificado no 11º dia de cultivo. Durante o período de cultivo, 2,7 g/L de açúcares redutores foram liberados. Não foi possível detectar atividade pectinolítica no cultivo de *P. djamor* em 14 dias de cultivo, embora tenha havido a liberação de 4,5 g/L de açúcares redutores para o meio, resultantes da hidrólise da pectina cítrica (Figura 19).

Figura 17 - Cinética de produção de pectinasee açúcares redutores (AR) pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em meio de cultivo contendo pectina cítrica como única fonte de carbono. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas da atividade pectinolítica. A linha cheia (—) representa a curva de atividade pectinolítica ajustada aos pontos. A linha tracejada (----) representa a curva de concentração de açúcares redutores no meio de cultivo.

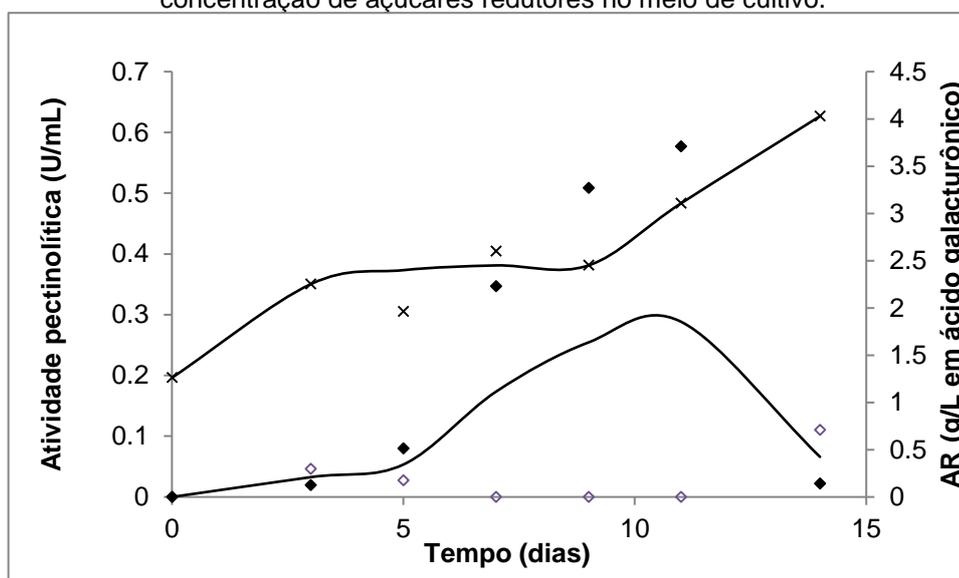
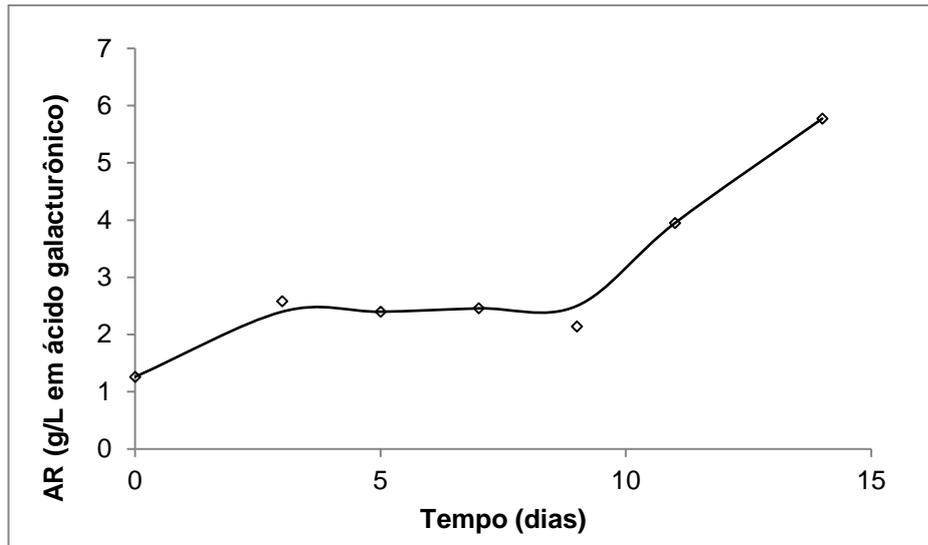


Figura 18 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 contendo pectina cítrica como única fonte de carbono.



Alexandrino et al. (2007) utilizaram um meio a base de resíduo de laranja para cultivar *Pleurotus ostreatus* e avaliar a produção de pectinases. Após 30 dias de cultivo foi utilizado o método DNS para avaliar a atividade enzimática, mas também não houve valores significativos (valores inferiores a $0,2 \text{ U.g}^{-1}$). Souza et al. (2008) observaram a presença de pectinases em *Pleurotus*, em meio sólido, utilizando pectina, respectivamente, como fonte de carbono. Após 120 horas de incubação, não foi identificada a presença das enzimas nos meios de cultivo.

Huerta et al. (2014) observaram a produção de pectinases por *Pleurotus ostreatus* em meio sólido. O estudo teve duração de 24 dias e a atividade máxima foi observada após 168 horas de cultivo (fase do crescimento exponencial). Três isoformas de pectinases puderam ser observadas, indicando que a espécie foi considerada um excelente candidato para a produção destas enzimas para uso industrial.

A análise de pectinases em cultivo sólido usando resíduos provenientes da extração do suco de laranja por *P. ostreatus* (ALEXANDRINO et al., 2007), onde não foi detectada atividade de pectinase, e *P. pulmonarius* que encontrou $9,4 \pm 0,40 \text{ U/ml}$ (INÁCIO et al., 2015). Raymond, Mshandete e Kivaisi (2015) avaliaram a produção de pectinase por *Pleurotus HK-37* em FES ($3,31 \pm 2,40 \text{ U/ml}$), usando resíduo de sisal suplementado com esterco de vaca. Freixo, Karmali e Arteiro (2008) avaliaram a produção de pectinase por *P. ostreatus* ($2,18 \text{ U/ml}$) utilizando bagaço de tomate como fonte de carbono em cultivo submerso. A produção de pectinase por *P. pulmonarius* também foi detectada em cultivo submerso ($0,7 \text{ U/ml}$), usando

glicose como substrato (DÍAZ-GODÍNEZ et al., 2016). Pectinase também foi detectada no cultivo sólido de *P. florida* usando palha de arroz (1,00 U/mL) (MALAYIL; CHANAKYA, 2016). Não foi encontrada nenhuma publicação relatando a produção de pectinase por *Pleurotus sajor-caju*.

A pectina é um heteropolissacarídeo complexo e várias são as enzimas que atuam em sua estrutura (NAIDU e PANDA, 1998). Nem todas essas enzimas produzem açúcares redutores, como são os casos da pectina liase e das pectina-esterases. Desta forma, uma possível atividade pectinolítica pode não ter sido detectada devido à técnica utilizada neste trabalho para determinação da atividade de pectinase.

4.2.5 Atividade celulolítica

Como já visto nos testes qualitativos em fermentação em estado sólido, foi confirmado que as espécies *P. sajor-caju* e *P. djamor* sob as condições estudadas neste trabalho não são capazes de produzir celulases. No entanto, níveis de AR foram encontrados em ambas as espécies, mas em baixas concentrações, com máxima liberação de 0,35 g/L no cultivo de *P. sajor-caju* após 5 dias (Figura 20). *P. djamor* consumiu 0,1 g/L de açúcar do terceiro ao quinto dia de cultivo, após os quais houve retorno aos níveis iniciais de AR (Figura 21).

Garzillo et al. (1994) também não detectaram atividade celulolítica quando avaliaram *Pleurotus ostreatus* cultivado em meio líquido contendo glicose ou extratos vegetais como substitutos da palha no meio de cultivo.

Em fungos saprófitos se observam variadas taxas de atividades para esta enzima: Sukumaran et al. (2005) obtiveram 14,98 U/mL de endoglucanases utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30. Enquanto Malik et al. (2010) obtiveram o máximo de produção 1,57 para *T. viride*, em fermentação submersa pelo período de incubação de 72 horas e ajustando-se o pH para 5,5, alcançou-se a máxima produção de 1,66 U/mL.

P. ostreatus foi cultivado em frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 500 ml de um meio de cultura composto por celulose microcristalina a 1%. A atividade de

celulase alcançou valor máximo de 3,19 U/mL, após 9 dias de cultivo (LIGUORI et al., 2015).

De forma a estabelecer uma correlação entre diferentes substratos e a expressão de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus eryngii*, Xie et al. (2016) avaliaram a expressão destas enzimas em 4 diferentes substratos utilizando uma abordagem proteômica quantitativa baseada em TMT (tandem mass tag) de alto rendimento. 74 enzimas celulolíticas foram quantificadas e a expressão e a atividade enzimática sugere que celulasas, hemicelulasas e ligninases têm uma correlação positiva com a eficiência biológica, que depende da natureza dos substratos lignocelulósicos.

Figura 19 - Cinética de produção de açúcares redutores por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono.

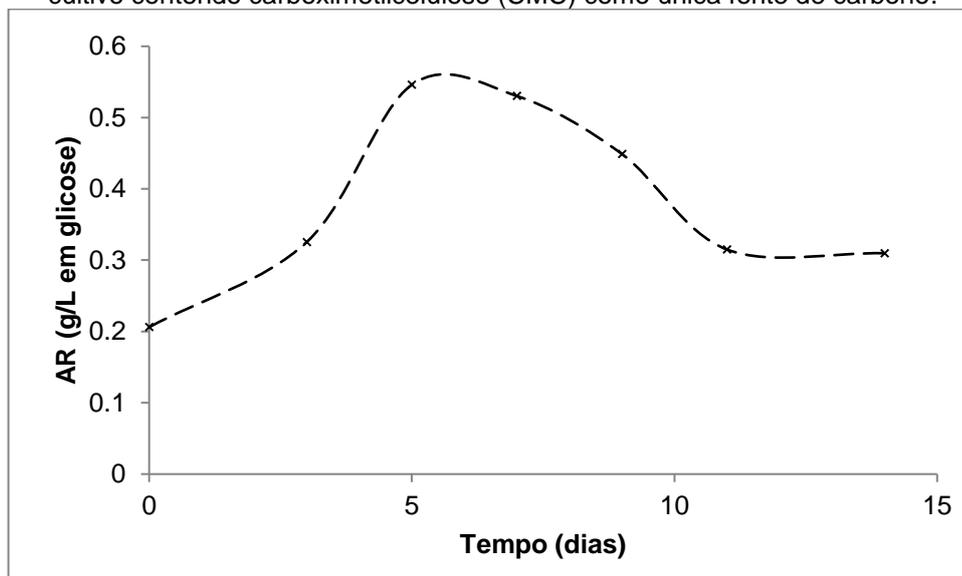
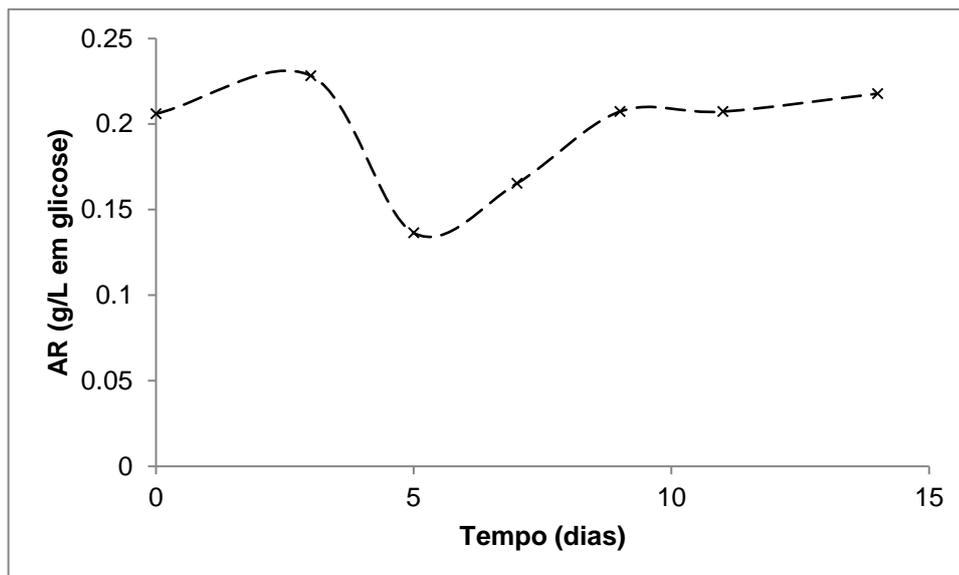


Figura 20 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono.



4.2.6 Atividade proteolítica

Diferente do resultado obtido através dos testes realizados em cultivo sólido, não foi possível quantificar as enzimas proteolíticas em cultivo líquido tanto para *P. djamor* quanto para *P. sajour-caju* em 14 dias de cultivo.

Palmieri et al. (2001) observaram a produção de enzimas proteases, em cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus*, comparando quatro diferentes substratos. O estudo teve duração de três dias e a leitura dos resultados foi feita por meio do método DNS. Azocoll e SucAAPFpNA(N-SUCCINYLA-ALA-ALA-PRO-PHE-p-nitroanilide) foram os dois substratos onde a enzima proteolítica apresentou atividade. Pode-se sugerir que o meio de cultivo não tenha sido apropriado para produzir proteases em quantidades adequadas pelo método utilizado para a detecção da enzima.

4.2.7 Atividade inulinolítica

Não foi possível detectar a síntese de inulinases por *P. sajour-caju*, embora tenha havido liberação de açúcares redutores (AR) medidos como frutose de 3,18

g/L (Figura 22). *P. djamor* produziu atividade máxima de 0,62 U/mL no 9º dia de cultivo, liberando 5,17 g/L de açúcares redutores para o meio de cultivo (Figura 23).

Figura 21 - Cinética de produção de açúcares redutores (AR) por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em cultivo contendo inulina como única fonte de carbono.

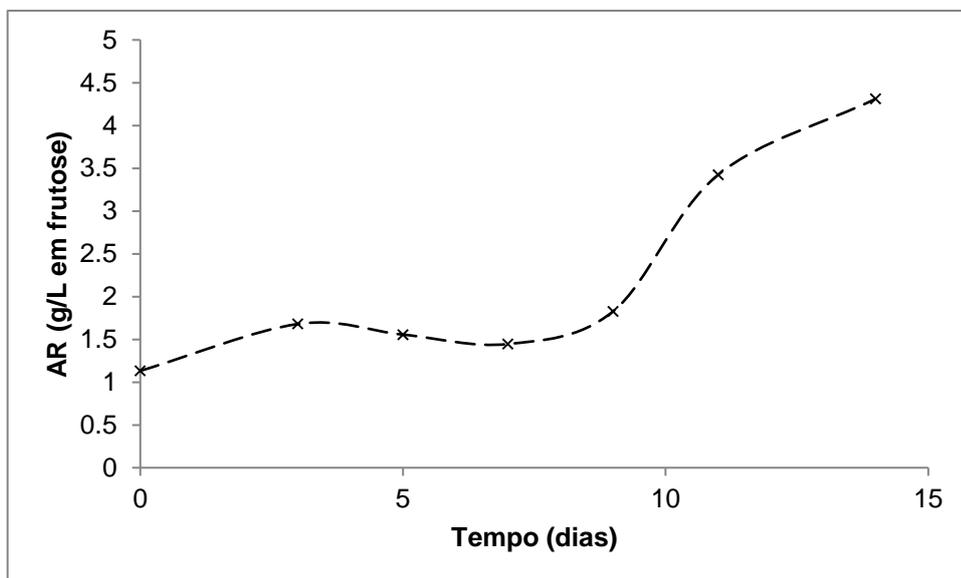
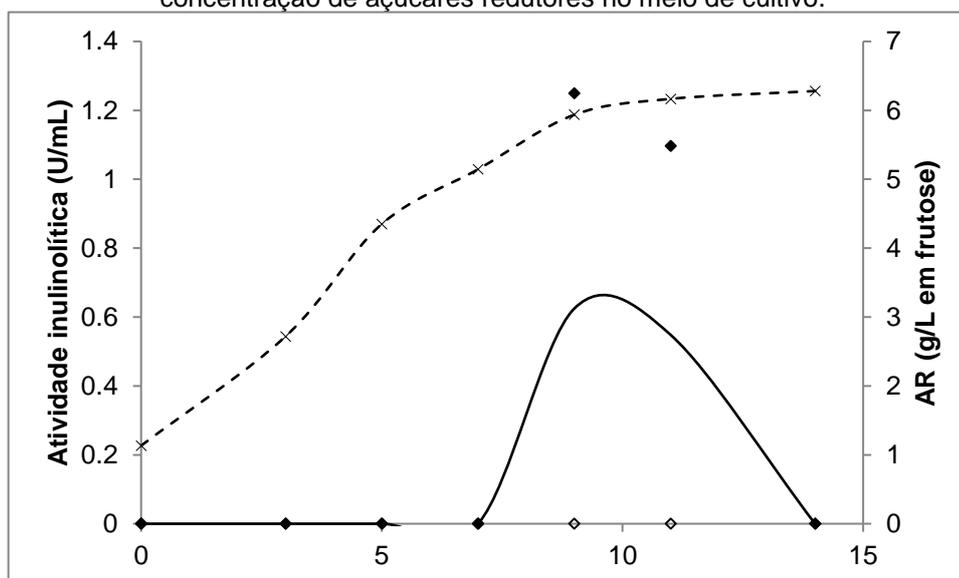


Figura 22 - Cinética de produção de inulinase pelo fungo *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001. Os símbolos \diamond e \blacklozenge representam as duplicatas da atividade inulinolítica. A linha cheia (—) representa a curva de atividade inulinolítica ajustada aos pontos. A linha tracejada (-----) representa a curva de concentração de açúcares redutores no meio de cultivo.



A atividade inulinolítica encontrada neste trabalho apresentou valor bem abaixo dos reportados por outros fungos. Pessoni et al. (2004) avaliaram a produção das enzimas inulinásicas por *Penicillium janczewskii* utilizando inulina de *V. herbacea*

como fonte de carbono indutora durante 12 dias. Após este período, os autores encontraram atividade enzimática de 1.380 U/L. Kochhar et al. (1999) reportaram atividade máxima de 3.176 U/L para inulinases produzidas em *P. funiculosum* durante o mesmo tempo de cultivo.

Alguns autores também avaliaram a produção dessas enzimas por espécies do gênero *Aspergillus* sp: Kochhar et al. (1999) encontraram atividades inulinásicas de 9.046 U/L (*Aspergillus candidus*), 98 U/L (*Aspergillus terreus*), 95 U/L (*Aspergillus oryzae*) e 31 U/L (*Aspergillus chevalieri*). Cruz et al. (1998) testaram 350 linhagens de *Aspergillus niger* e selecionaram *A. niger-245*, cuja atividade inulinásica foi 2,92 U/mL após 60 horas de cultivo, como sendo o melhor micro-organismo para utilização industrial.

Outro micro-organismo bastante utilizado para produção de inulinases em escala industrial é *Kluyveromyces marxianus*. Mendes (2006) encontrou atividade inulinásica de 974 U/mL após 135 horas de cultivo utilizando a linhagem *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meio composto por melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho.

Estudos envolvendo o gênero *Pleurotus* sp. na produção de enzimas inulinásicas precisam ser considerados, visto que a espécie *P. djamor* sintetizou uma pequena quantidade destas enzimas em condições não otimizadas.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos testes qualitativo e quantitativo realizados neste trabalho para detecção das enzimas produzidas pelas duas linhagens fúngicas.

Tabela 1 – Síntese dos resultados qualitativos e quantitativos de atividade enzimática verificada para *P. sajor-caju* CCB 019 e *P. Djamor* UNIVILLE 001 neste trabalho.

<i>P. sajor-caju</i>	<i>P. djamor</i>
----------------------	------------------

Enzima	Presença da enzima (teste qualitativo)	Atividade enzimática (U/mL)	Presença da enzima (teste qualitativo)	Atividade enzimática (U/mL)
Lipase	+	—	+	—
Lacase	+	0,04±0,01	+	0,14±0,09
Amilase	+	0,35±0,07	+	0,45±0,08
Pectinase	+	0,29±0,29	+	—
Celulase	—	—	—	—
Protease	+	—	+	—
Inulinase	—	—	—	0,62±0,62

*Desvio médio

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve por principal objetivo avaliar o potencial biotecnológico de duas linhagens de *Pleurotus*, *Pleurotus sajor-caju* CCB 019, cedida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, isolada no Campus Joinville da UNIVILLE (Joinville, SC), ambas armazenadas no Laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE, por meio da avaliação da síntese de enzimas de interesse comercial.

Na etapa inicial, os ensaios qualitativos mostraram crescimento micelial de ambos os fungos em todos os meios de cultivo, indicando a capacidade destes em utilizar a fonte de carbono presente no meio, sugerindo a excreção das enzimas específicas para a degradação do substrato. A presença das enzimas amilase, pectinase e protease foi confirmada pela formação de um halo de degradação do substrato ao redor da colônia fúngica, para ambos os fungos. A presença de lacase foi confirmada pela formação de coloração marrom sob e ao redor da colônia fúngica, para ambos os fungos, indicando a oxidação do guaiacol presente no meio. As enzimas celulase e inulinase não foram detectadas em nenhum dos cultivos.

O crescimento fúngico e/ou a presença das enzimas testadas determinou a próxima etapa do trabalho, no qual a produção das enzimas foi avaliada quantitativamente ao longo do cultivo. As atividades máximas de lacase encontradas foram de 0,037 U/mL para *P. sajor-caju* e 0,144 U/mL para *P. djamor*, no 3º e 9º dias de cultivo, respectivamente. As atividades máximas de amilase encontradas foram de 0,35 U/mL para *P. sajor-caju* e 0,45 U/mL para *P. djamor*, no 11º e 7º dias de cultivo, respectivamente. A enzima pectinase só foi detectada no cultivo de *P. sajor-caju*, alcançando atividade máxima de 0,29 U/mL, no 11º dia de cultivo. Inulinase só foi detectada no cultivo de *P. djamor*, alcançando atividade máxima de 0,62 U/mL, no 9º dia de cultivo. Celulases e proteases não foram detectadas pelo método utilizado neste trabalho, em ambos os cultivos fúngicos.

Embora os valores de atividade enzimática encontrados neste trabalho tenham sido inferiores aos reportados na literatura, cabe lembrar que estes foram obtidos em meio de cultivo básico, sem suplementação, e cujo único indutor da enzima, com exceção para a lacase, foi a própria fonte de carbono. Este método de avaliação foi selecionado porque o objetivo deste trabalho foi somente verificar a capacidade de expressão das enzimas pelos fungos avaliados, sem nenhuma otimização do meio ou das condições de cultivo para isto. Importante também

ressaltar que *Pleurotus djamor* é um isolado, sobre o qual nenhum teste havia sido realizado no sentido de produção de enzimas. Desta forma, estudos de otimização destes parâmetros são bastante relevantes para dar continuidade às pesquisas envolvendo os dados deste trabalho. Os resultados obtidos sugerem que ambos os fungos apresentam potencial biotecnológico para a produção de enzimas de interesse comercial.

6 REFERÊNCIAS

ABO-STATE, M. A. M.; KHATAB, O.; NASAR, A.A.; MAHMOUD, B. Factors affecting laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. **World Applied Sciences Journal**, v. 14, p. 1607-1619, 2011.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*(Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

ALLAIS, J. J.; HOYOS-LOPES, G.; BARATTI, J. Characterization and properties of an inulinase from a thermophilic bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, p. 277–290. 1987.

ALMEIDA, M. N. R. Produção enzimática de biodiesel a partir de resíduos agroindustriais usando a lipase imobilizada de origem microbiana. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Biológica) – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2016.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* sp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.

ALVES, F. Modelagem e simulação de biorreator operando em fungos *Trametes Versicolor* para produção de enzima lacase. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.

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**, v. 8, n. 1, 2012.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BETTIN, F.; ROSA, L. O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 758-764, 2011.

BRASIL, Medida provisória nº 2.186-16 de 23 de agosto de 2001, Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF 23 de agosto de 2001.

BOCCHESI, C. A. C.; MARTINELLI, J. A.; MATSUMURA, A. T. S.; FEDERIZZI, L. C.; PRESTES, A. M. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, n. 28, p. 11-16, 2003.

BUENO, C. J.; FISHER, I. H.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.

CABANA, H.; JIWAN, J. H.; ROZENBERG, R.; ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; AGATHOS, S. N.; JONES, J. P. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, v. 67, p. 770-778, 2007.

CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. **Bioquímica**. 5ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S.; MARQUES, L. M. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 35-40. 2010.

CARDOSO, W. S. Obtenção e caracterização de celulases de fungos da podridão branca em fermentação no estado sólido e sacarificação da palha de sorgo visando a produção de etanol. 2012. 127 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

CARISSIMI, M.; STOPIGLIA, C. D. O.; SOUZA, T. F.; CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L. Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine B and tween 80, **Tecno-lógica**, v. 11, n. 1 e 2, p. 33-36, 2007.

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

CARVALHO, L. C. T. Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CASTANON, F. S. Isolamento de fungos filamentosos produtores de inulinases. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E. S.; SANTOS, J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 3, p. 608-613, maio/jun., 2004.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JR., N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.151-158, 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 181-188, 2010.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, 146-156, 2004.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1541-1550, 2006.

COGUETTO, C. C. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em suporte inorgânico. 2011. 70 f. Tese Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

CRUZ, V. D.; BELOTE, J. G.; BELLINE, M. Z.; CRUZ, R. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: Hydrolysis of inulin from several sources. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 301-306, 1998.

D'AGOSTINI, E. C. MANTOVANI, T. R. D. A.; VALLE, J. S.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from "*Pleurotus sajor-caju*" fruiting bodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n.8, p.2265-2274, 2010.

DAS, G.; PRASAD, M. P. Isolation, purification e mass production of protease enzyme from bacillus subtilis. **International Research Journals of microbiology**, v. 1, n. 2, p. 026-031, April 2010.

DELABONA, P. S. Bioprospecção de fungos produtores de celulasas da região amazônica para aplicação na produção de etanol celulósico. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DELATORRE, A. B. Produção de celulasas pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2010.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MARTINS, R. C.; ROCHA, W. L.; DIAS, A. P. Activity and stability of a *Rzizomucor miehei* lipase in hydrophonic media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.26, p.111-116, 1997.

DESAI, S. S.; TENNALI, G. B.; CHANNUR, N.; ANUP A. C.; DESHPANDE, G.; MURTUZA, B. P. A. Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**. 1(4):543-549, 2011.

DEVASIA, S.; NAIR, J. Screening of potent laccase producing organisms based on the oxidation pattern of different phenolic substrates. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 127-137, 2016.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DÍAZ-GODÍNEZ, G.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; OBREGÓN-BARBOSA, V.; ACOSTA-URDAPILLETA, M. L.; VILLEGAS, E. Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4186–4200, 2016.

DINI, C. M. Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, 2010.

EGGERT, C.; TEMP, U; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by lacase. **Febs Letters**, v. 391, p.144-148, 1996.

ELIAS, A. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa phytopathol**, v. 41, n. 4, p. 315-317, Dec. 2015.

FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M. M.; SILVEIRA, M. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72-77, 2014.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV (1), p. 43-51, 2007.

FLORENCIO, C. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

FIRMINO, A. C.; FURTADO, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.

FONTES, G. C. Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FREIXO, M. DO R.; KARMALI, A.; ARTEIRO, J. M. Production and chromatographic behaviour of polygalacturonase from *Pleurotus ostreatus* on immobilized metal chelates. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 531–539, 2008.

FURLAN, S. A.; VIRMOND, L. J; MIERS, D. A.; BONATTI, M.; GERN, R. M. M.; JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 689–692, 1987.

FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. Possibilities of "*Pleurotus*" applications in food, health and environmental technologies. In: KOUTINAS, A.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Current topics on Bioprocesses in Food Industry. Nova Delhi: Asiatech, p. 482-495, 2008.

GARZILLO, A.; DI PAOLO, S.; RUZZI, M.; BUONOCORE, V. Hydrolitic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 476-481, 1994.

GERN, R. M. M. et al.; SANTOS, V. M. C. S.; CASSOU, R.; MENDONÇA, M. M.; FURLAN, S. A. Estudo da fração do inóculo e da suplementação da palha de bananeira para produção de *Pleurotus sajor-caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 1, n.1, 2000.

GHANDI, N. N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, n. 6, 621-634, 1997.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, No. 2, p. 257-268, 1987.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 1, 1999.

GONÇALVES, A. Z. L. Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas. 2006. 90 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, São Paulo.

GUIRAUD, J. P.; GALZY, P. Inulin conversion by yeasts, p. 255-296. In: VERACHTERT, H. & DE MOT, R. **Yeast, Biotechnology and Biocatalysis**, v. 5. Catholic University of Leuven, Belgium, 1989, 521 p.

GUIZELINI, C. S.; PINHEIRO, C. A. N.; QUEIROZ, J. S.; ANDRADE, J. H. F.; HARTKOPF, J. B. S.; PEREIRA, R. M. G.; FRANCELIN, M. F.; SILVA, B. P. Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* em óleo vegetal residual de uma indústria alimentícia de Maringá-PR. **V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. 5-7 ago/2015.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. P. 1 jan. 2003.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S.; DEVI, G. N.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 647-657, 2016.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos

filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**. 13:13-22, 2015.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, v.23, n. 1, 105-118, 2002.

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

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.A higher level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–47, 2007.

HUERTA, E. M.; CHILADO, M. M. C.; GODÍNEZ, G. D. Pectinase activity of *Pleurotus ostreatus* grown in solid-state fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 100, 2014.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering and Science**, v.3, p.1-19, 2004.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAÚJO, C. A. V.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Production of enzymes and biotransformation of orange waste by Oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 1–8, 2015.

KANGO, N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 473–478, 2008.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J. P.; CHO, Y. J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. **Letters in Applied Microbiology**. v. 34, p. 56-61, 2002.

KING, B.C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p.1033– 1044, 2009.

KITAMURA, R. S. A.; MACIEL, G. M.; MATEI, J. C. Bioprospecção do potencial biotecnológico de *Pleurotus pulmonarius* para a aplicação na produção enzimática, antimicrobiana e na tolerância à pesticidas. II Congresso Paranaense de Microbiologia. 2016.

KOCHHAR, A.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 549-554, 1999.

KOSHY, J. Studies on extracellular enzyme production during growth of *Pleurotus* sp. on lignocellulosic agriwaste and the utilization of spent mushroom substrate. 202 f. 2012. Tese (Doctor of Philosophy in Biotechnology) - Cochin University of Science and Technology, Kerala, India.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

KUDANGA, T.; ROES-HILL, M. L. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 6525–6542, 2014.

KUMAR, G. P.; KUNAMNENI, A.; PRABHAKAR, T.; ELLAIAH, P. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1359–1361, 2005.

LEONOWICZ, A.; CHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic microbiology**, v. 41, p. 185-227, 2001.

LI, A. X.; GUO, L. Z.; FU, Q.; LU, W. Q. A simple and rapid plate assay for screening of inulin degrading microorganisms using Lugol's iodine solution. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9518-9521, 2011.

LIBARDI JR., N.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; SCHLOSSER, D. Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting

chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1144-56, 2012.

LIGUORI, R. IONATA, E.; MARCOLONGO, L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; LA CARA, F.; FARACO, V. Optimization of *Arundo donax* saccharification by (hemi)cellulolytic enzymes from *Pleurotus ostreatus*. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 951871, 14 pages.

LINKE, D.; ZORN, H.; GERKEN, B.; PARLAR, H.; BERGER, R. G. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). **Lipids**, v. 40, n. 3, p.323-327, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. **American Society for Microbiology**, n. 3, v. 66, p. 506-577. 2002.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.

MAGALHÃES, V. G.; MESSIAS, M. P.; LEITE, W. B. Bioprospecção dos recursos genéticos no Brasil: Autorização ou licença Administrativa?. In: 13º Congresso Brasileiro de Direito Ambiental: Mudanças Climáticas, Biodiversidade e Uso Sustentável de Energia, 2007, São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, v. 2, p. 763-774, 2007.

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**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MALAYIL, S.; CHANAKYA, H. N. Fungal enzyme cocktail treatment of biomass for higher biogas production from leaf litter. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 826–832, 2016.

MALIK, S. K.; MUKHTAR, H.; FAROOQI, A. A.; HAQ, I. Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.42, n.6, p.4243-4251, 2010.

MARCO-URREA, E.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; VICENT, T.; CAMINAL, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 74, p. 765–772, 2009.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.

MARTINS, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 2006. 108f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campos de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MELO, D. B.; JARDIM, A.; BARCELLOS, F. G.; RODRIGUES, E. Isolamento e ensaio enzimático para lacase de microrganismos associados à planta medicinal *Baccaris trimera* (carqueja). II Congresso Paranaense de Microbiologia. ISSN: 2525-6831, v.1, 2016.

MELO, M. P. Uso de resíduos agroindustriais para produção de enzimas oxidativas por rota biotecnológica. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias. **Química Nova**, v. 28, n. 2, 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENDES, G. L. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MINUSSI, R. C. Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fúngica. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MONTANARI, Q.; DILLON, A. J. P.; BETTIN, F. Efeito da concentração de substrato sobre a cinética de crescimento e a produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator de tanque agitado. In: XXI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2009, Porto Alegre.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. V. 3, n. 5. **Revista Processos Químicos**. Jun-Jul, 2009.

MORAIS, M.S.; OLIVEIRA, N. T.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. **Summa phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 249-253, 2016.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 38–42, 2009.

MUKESH, K. D. J.; SARANYA, G. M.; SURESH, K.; ANDAL, P. D.; RAJAKUMAR, R.; KALAICHELVAN, P. T. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 19, n. 4, p. 355-361, 1998.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Compatibilidade de proteases com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NAKAYAMA, M. Effect of some substances on the formation of inulin fructotransferase in *Arthrobacter ureafaciens*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 2761–2766, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier. 2002.

NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotusem* resíduos vegetais da Amazônia. 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiological Research**, v.159, n. 3, p. 305-3014, 2004.

OKINO, S.; INUI, M.; YUKAWA, H. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 475-478, 2005.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**,v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PACHECO, S.; SOARES, C. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 209-214, 2014.

PALMIERI, G.; BIANCO, C.; CENNAMO, G.; GIARDINA, P.; MARINO, G.; MONTI, M.; SANNIA, G. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 67, n. 6, p. 2754-2759, 2001.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAM, R. Advances in microbial amylases – Review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, 135–152, 2000.

PATEIS, V. O.; LIMA, J. B.; HELM, C. V.; LIMA, E. A.; COSTA, M. A. F.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioprospecção de fungos filamentosos produtores de lacases. ENZITEC 2012 – Xth Brazilian Seminar on Enzyme Technology – 7th - 10th of October, 2012, Blumenau, SC, Brazil.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

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

PESSONI, R. A. B.; OLMEDO, P. M. O.; CLEMENTE Filha, A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Produção de concentrados de frutose por inulinasas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2004.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

POPPE, J. Agricultural wastes as substrates for oyster mushroom. In: Mushroom Growers' Handbook 1. Oyster Mushrooms Cultivation. Part II: Oyster Mushrooms. Chapter 5, MushWorld, Korea, 2004.

PURNOMO, A. S.; MORI, T.; KAMEI, I.; NISHII, T.; KONDO, R. Application of mushroom waste medium from "*Pleurotus ostreatus*" for bioremediation of DDT-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 5, p. 397-402, 2010.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. EDUNISC, Santa Cruz do Sul, 1998.

QUEVEDO-HIDALGO, B.; NARVÁEZ-RINCÓN, P. C.; PEDROZA-RODÍGUEZ, A. M.; VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Saentiarum**, v. 20, n. 1, p. 117-127, 2015.

RAMPINELLI, J. R. Utilização de casca de banana para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. 2016. 132p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L.; WISBECK, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição** (UNESP – Marília), v. 21, p. 195-200, 2010.

RAYMOND, P.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. K. Enzyme profiles of *Pleurotus* HK-37 during mycelia vegetative growth and fruiting on solid sisal waste fractions

supplemented with cow manure. **Advances in Biochemistry**, v. 3, n. 5, p. 57–65, 2015.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**. Article ID 615803, 16 pages. 2011.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, C.; GONÇALVES, R. F.; KELLER, R. P.; ANTUNES, P. W.; CASSINI, S. T. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 21, n. 3, 507-518, 2016.

RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI Neto, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROTHSCHILD, N.; NEVOTNY, C.; SASEK, V.; DOSORETZ, C. G. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 627-633, 2002.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUIZ, L. M.; ANDRADE, R. H.; SÁNCHEZ, J. E. Proceedings of the 8th International Conference on mushroom biology and mushroom products (ICMBMP8). **Biotechnological potential of ten *Pleurotus djamor* strains**, p. 262-270, 2014.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e Pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SANTIAGO, A. M. C.; SOUZA-MOTTA, C. M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase, **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, N. 3, p. 641-647, 2006.

SANTOS, I. S. Estudo do potencial de biodegradação de 17 α -etinilestradiol, carbamazepina, e ibuprofeno por fungos ligninolíticos e bactérias. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Campinas, São Paulo.

SANTOS, L. G. B.; GASPARIN, F. G. M.; REZENDE, M. I.; RIBEIRO, M. L. L. Produção e Caracterização de Lacase de *Pleurotus ostreatus* cultivado em casca de arroz, p. 397. In: **Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia – VSIMBBTEC**. São Paulo: Blucher, 2015.

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SARATALE, D. G.; OH S. E. Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardia* sp. **Biodegradation**, v. 22, n. 5, p. 905-919, 2011.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100-108, 2008.

SHIN, H. H.; CHOI, H. S. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1416-1418, 1998.

SHRADDHA, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2011, Article ID 217861, 11 p.

SILVA, J. J.; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H.; SOUZA, S. G. H.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; DO VALLE, J. S. Produção de lacases de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6679-6681, 2009.

SINGH, P.; GILL, P. K. Production of inulinases: recent advances. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 151–162, 2006.

SINGH, R. S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 1703–1707, 2006.

SILVA, L. S. C.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S. T. Influência do pH na produção de protease por *Pleurotus ostreatoroseus*. In: **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos – XX SINAFERM – XI SHEB**, ISSN: 2447-2816, v. 1, Fortaleza, 2015.

SOUZA, U. S.; NUNES, P. M. B.; AMARAL, P. F. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Avaliação da produção de inulinase por *Yarrowia Lipolytica*. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp – Campinas – SP. 19 a 22 Jul/2015.

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**. ISSN: 0101-2061. Campinas, 28 (Supl.): 116-124, 2008.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; LIMA FILHO, J. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 343- 350, 2005.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-production, applications and challenges. **Journal of Science Industrial and Research**, New Delhi, v.64, n.11, p.832–844, 2005.

TAKAHASHI, N.; MIZUNO, F.; TAKAMORI, K. Purification and preliminary characterization of exo-beta-D-fructosidase in *Streptococcus salivarius* KTA-19. **Infection and Immunity**, v. 47, p. 271–276, 1985.

TANAKA, K.; UCHIYAMA T., ITO, A. Formation of di-D-fructofuranose 1,2':2,3'-dianhydride form by an extracellular inulase of *Arthrobacter ureafaciens*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 284, p. 248–256, 1972.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rument. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. J.; MONTIEL-GONZÁLEZ, A. M.; SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 675–679, 2008.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TREICHEL, H. Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados. 2004. 111f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

TRINCONE, A. Uncommon glycosidases for the enzymatic preparation of glycosides. **Biomolecules**, v. 5, p. 2160-2183, 2015.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; KAMBOUROVA, M.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A.; TONKOVA, A. Production and properties of a bacterial thermostable exo-inulinase. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56, p.1022–1028. 2001.

UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; TONKOVA, A. Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 863–866, 2002.

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D.G. Fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p. 139-176, 1983.

VERMA, V.; VERMA, A.; KUSHWAHA, A. Isolation e production of cellulase enzyme from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi. Pelagia Research Library. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 171-174, 2012.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YAMINI, D.; AMBIKA, V.; SNOWDAMINI, N. S. Trends in inulinase production – a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 67-77, 2009.

WENDISCH, V. F.; BOTT, M.; EIKMANN, B. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 268-274, 2006.

WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por "*Pleurotus ostreatus*" DSM 1833. **Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE)**, v. 6, p. 19-22, 2005.

XIAO, Z. R.; LIN, H. H.; YIN, L. J. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. **Journal of Marine, Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 466-471, 2010.

XIE, C.; YAN, L.; GONG, W.; ZHU, Z.; TAN, S.; CHEN, D.; HU, Z.; PENG, Y. Effects of different substrates on lignocellulosic enzyme expression, enzyme activity, substrate utilization and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 1479-1494, 2016.

ZHEREBTSOV, N. A.; SHELAMOVA, S. A.; ABRAMOVA, S. N. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria. **Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya**, v. 38, p. 634-638, 2002.

ZORN, H.; BREITHAUPT, D. E.; TAKENBERG, M.; SCHWACK, W.; BERGER, R. G. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 623-628, 2003.

ZUCCA, P.; RESCIGNO, A.; OLIANAS, A.; MACCIONI, S.; SOLLAI, F. A.; SANJUST, E. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 216-222, 2011.