



ÉRICA BENJAMIM DA SILVA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS
SILVESTRES COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO
DAS ENZIMAS LIPASE E TANASE
EXTRACELULARES**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ÉRICA BENJAMIM DA SILVA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS SILVESTRES
COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS
LIPASE E TANASE EXTRACELULARES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Érica Benjamim da Silva e orientada pela Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo

Assinatura da orientadora

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Si38i Silva, Érica Benjamim da, 1990-
Isolamento e seleção de fungos silvestres com potencial para produção das enzimas lipase e tanase extracelulares / Érica Benjamim da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Bioprospecção. 2. Lipase. 3. Tanase. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Screening newly microbial strains for tannase and lipase production

Palavras-chave em inglês:

Bioprospection

Lipase

Tannase

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Danielle Branta Lopes

Luciana Francisco Fleuri

Data de defesa: 30-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

**Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo
Orientadora- DCA/FEA/UNICAMP**

**Prof.^a Dr.^a Danielle Branta Lopes
Membro Titular- CNPEM**

**Prof.^a Dr.^a Luciana Francisco Fleuri
Membro Titular- IBB/UNESP**

**Prof.^a Dr.^a Eleonora Cano Carmona
Membro Suplente- IB/UNESP**

**Prof.^a Dr.^a Fabiana Fantinatti-Garboggini
Membro Suplente- CPQBA/UNICAMP**

Resumo

A bioprospecção de micro-organismos nativos capazes de produzir enzimas com diferentes propriedades catalíticas é essencial para o desenvolvimento do setor biotecnológico brasileiro. A lipase é uma enzima com vasta aplicação biotecnológica, utilizada na resolução de fármacos quirais, modificação de gorduras, produção de biocombustíveis, cosméticos, agroquímicos, oleoquímicos e realçadores de sabor. A tanase é outra enzima com grande potencial de aplicação industrial por ser capaz de catalisar a hidrólise de taninos hidrolisáveis e de ésteres de ácido gálico. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi isolar novas linhagens de micro-organismos capazes de produzir as enzimas tanase e lipase extracelulares e caracterizar, bioquimicamente, as enzimas selecionadas. Foram isoladas 131 linhagens de fungos filamentosos e 109 linhagens de leveduras da Região Amazônica e da região da Mata Atlântica. Tais linhagens fúngicas juntamente com outras linhagens da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioquímica FEA-UNICAMP (n=348) foram analisadas em meio sólido diferencial. Foram obtidas 26 linhagens positivas para lipase e 105 para tanase. As linhagens positivas foram testadas quanto à capacidade de produzir lipase e tanase por fermentação em estado sólido. A atividade enzimática da tanase foi quantificada por espectrofotometria e a da lipase por titulometria de neutralização. A lipase da linhagem de *Colletotrichum sp.* apresentou atividade enzimática específica igual a 25,97 U/mg; Km= 6,3 %; Vm= 19,5 U/mg; pH ótimo de atividade de 6,5 a 7,0 e temperatura ótima de atividade de 25 °C à 35 °C. A tanase da linhagem de *Aspergillus niger* apresentou atividade enzimática de 0,79 U/mL e a produzida pela linhagem de *Paecilomyces sp.* atingiu atividade específica de 2,14 U/mg, pH e temperatura ótima de atividade de 5,5 e 60°C, respectivamente.

Palavras chave: bioprospecção; lipase; tanase; *Colletotrichum sp.*; *Paecilomyces sp.*; *Aspergillus niger*.

Abstract

The bioprospection of native microorganisms capable of producing enzymes with diverse catalytic properties is essential to the development of the Brazilian biotechnological sector. Lipase is an enzyme with wide biotechnological application, it is used on chiral drugs resolution, fat modification and on the production of biofuels, cosmetics and flavor enhancers. Tannase is another enzyme with large potential to be applied at industries, it is capable of catalyze the hydrolysis of hydrolysable tannins and galic acid esters. Therefore, this work goal is to isolate novel microorganisms strains capable of producing extracellular lipase and tannase, and to characterize biochemically the selected strains. 131 filamentous fungal strains and 109 yeast strains were isolated from Amazon and Atlantic Rainforest regions. These fungal strains summed with others strains from the Microorganisms Collection of the Biochemistry Laboratory/ FEA-UNICAMP (n=348) by differential solid media. It was found 26 lipase producing strains and 105 tannase producing strains. The positive strains were evaluated regarding their capacity to produce lipase and tannase by solid state fermentation. Tannase's enzymatic activity was measured by spectrophotometry and lipases's enzymatic activity by neutralization titration. Lipase from *Colletotrichum* sp. strain showed specific activity of 25.97 U/mg; $K_m = 6.3$ %; $V_{max} = 19.5$ U/mg; pH optimum between 6.5 to 7.0 and temperature optimum from 25 °C to 35 °C. Tannase from *Aspergillus niger* strain presented enzymatic activity of 0.79 U/mL and tannase from *Paecilomyces* sp. strain reached 2.14 U/mg, pH and temperature optimum of 5.5 and 60 °C, respectively.

Keywords: bioprospection; lipase; tannase; *Colletotrichum* sp.; *Paecilomyces* sp.; *Aspergillus niger*.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1. Bioprospecção.....	4
1.2. Triagem de micro-organismos em meio sólido em placa de Petri.....	4
1.3. Fermentação em estado sólido (FES).....	7
1.4. Enzimas de interesse industrial.....	8
1.5. Tanases.....	11
1.5.1. Taninos	11
1.5.2. Características das tanases	12
1.5.3. Produção de tanases	14
1.5.4. Aplicação industrial de tanases	17
1.6. Lipases	19
1.6.1. Características das lipases	19
1.6.2. Produção de lipases	21
1.6.3. Aplicação industrial de lipases	22
2. METODOLOGIAS	26
2.1. Coleta de amostras e isolamento de micro-organismos.....	26
2.2. Conservação e depósito das linhagens de micro-organismos.....	27
2.3. Estudo morfológico macroscópico e microscópico das linhagens fúngicas	27
2.4. Pré-seleção em placa de Petri das linhagens fúngicas produtoras das enzimas	28
2.4.1. Pré-seleção das linhagens produtoras de tanase	28
2.4.2. Pré-seleção das linhagens produtoras de lipase	28
2.5. Seleção quantitativa das linhagens produtoras das enzimas em farelo de trigo	29
2.5.1. Seleção das linhagens produtoras de tanase	29
2.5.2. Seleção das linhagens produtoras de lipase	30
2.6. Determinação da concentração de proteína	31
2.7. Identificação das linhagens selecionadas	31
2.7.1 Análise morfológica	31
2.7.2 Análise genética	31
2.7.2.1. Extração do DNA	31

2.7.2.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS do operon ribossomal e de segmento do gene para calmodulina	33
2.7.2.3. Análise das sequências e filogênia	34
2.8. Caracterização bioquímica das tanases	34
2.8.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática	34
2.8.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	34
2.9. Caracterização bioquímica das lipases	35
2.9.1. Determinação do pH e temperatura ótima de atividade	35
2.9.2. Determinação das faixas de pH e temperatura de estabilidade	36
2.9.3. Determinação dos parâmetros cinéticos Km e V _{máx}	36
2.10. Estatística	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1. Linhagens isoladas	38
3.2. Pré-seleção qualitativa de linhagens produtoras de tanase ou lipase em placa de Petri	40
3.3. Estudo quantitativo da atividade enzimática	46
3.3.1. Estudo quantitativo da atividade enzimática da tanase	46
3.3.2. Estudo quantitativo da atividade enzimática da lipase	47
3.4. Identificação das linhagens selecionadas	51
3.4.1. Identificação das linhagens produtoras de tanase: Linhagem 255 e Linhagem 43	51
3.4.2. Identificação da linhagem 28a produtora de lipase	55
3.5. Caracterização bioquímica das enzimas selecionadas	57
3.5.1. Caracterização bioquímica da tanase de <i>Paecilomyces sp</i>	57
3.5.2. Caracterização bioquímica da lipase de <i>Colletotrichum sp</i>	60
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Dedico este trabalho aos meus pais
Ana e Osmar, ao meu irmão Caio e
aos meus amigos pelo carinho e apoio
em todas as etapas da minha vida.

Agradecimentos

À Deus por me dar saúde, força e sabedoria para superar as dificuldades.

Aos meus pais Ana e Osmar e ao meu irmão Caio pelo amor, carinho, paciência, apoio e por serem meus maiores incentivadores.

À Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo pela paciência, carinho e confiança depositada em mim, e por ser se tornado um exemplo para minha vida profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Branta Lopes, Prof.^a Dr.^a Luciana Francisco Fleuri, Prof.^a Dr.^a Eleonora Cano Carmona e Prof.^a Dr.^a Fabiana Fantinatti-Garboggini pelas valiosas sugestões e contribuições.

Aos meus amigos do laboratório: Bia, Bruna, Camilo, Dani, Débora, Elaine, Fabiano, Fabíola, Fernanda, Giba, Giulia, Haroldo, Isa, Jéssika, Joelise, Júlia, Leo, Lívia Dias, Lívia Rosas, Marcela, Paula, Paulinha, Ricardo, Val, Vivi e Zé não só pela ajuda com os experimentos, mas também pelos conselhos, conversas, risadas e festas.

Aos meus amigos da Biologia: Camila, Con, Di, Lia, Nat, Nat Moraes e Vicky e aos meus amigos de infância: Ju, Juliana, Juliano, Mariana, Rodrigo e Silvia por tornarem minha caminhada mais alegre.

Aos meus queridos amigos André, Cínthia e Ruann que tanto colaboraram para o desenvolvimento e enriquecimento desse trabalho, pela paciência, dedicação e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Prof.^a Dr.^a Derlene Attili de Angelis da Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria e ao André Ohara pela identificação das linhagens de fungos filamentosos.

Aos professores da FEA, especialmente à Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte e à Prof.^a Dr.^a Hélia Harumi Sato pelo carinho e apoio.

À todos os funcionários da FEA pelos auxílios prestados.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era.”

Martin Luther King

Lista de ilustrações

Figura 1. Meios de cultura com diferentes substratos utilizados para identificação de micro-organismos lipolíticos (a) Tween-20, (b) tributirina e (c) rodamina B (Gopinath et al.,2013)	6
Figura 2. Meios de cultura com diferentes substratos utilizados para identificação de micro-organismos produtores de tanase (a) ácido tânico e (b) tanino natural de tegumento de <i>Terminalia belerica</i> Roxb (Jana et al., 2012 a).....	6
Figura 3. Mercado mundial de enzima de 2008 a 2015 em milhões de dólares (SARROUH et al., 2012).....	9
Figura 4. Estrutura química do tanino condensado (BELMARES et al., 2004).....	11
Figura 5. Estrutura química de taninos hidrolisáveis: (a) galactaninos e (b) elagitaninos (BELMARES et al., 2004).....	12
Figura 6. Mecanismo de ação da tanase (AGUILAR et al., 2007).....	13
Figura 7. Hidrólise do ácido tânico (AGUILAR et al., 1999).....	13
Figura 8. Representação das diferentes reações catalisadas pelas lipases (adaptado de SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).....	19
Figura 9. Representação da molécula de lipase e das regiões de interação com o substrato (adaptado de GOPINATH et al., 2013).....	20
Figura 10. Mapa mostrando o número de linhagens de fungos filamentosos e leveduras isoladas em cada região estudada.....	38
Figura 11. Gráfico com o número de linhagens obtidas de cada amostra da Região Amazônica	39
Figura 12. Gráfico com o número de linhagens obtidas de cada amostra da região de Mata Atlântica.....	39
Figura 13. Tubos com meio inclinado de YMA ou PDA contendo alguns micro-organismos isolados	40
Figura 14. Halo opaco ao redor da colônia, formado pela deposição de cristais de cálcio, demonstrando a possível ação da lipase.....	41
Figura 15. Avaliação da produção de lipase em placa através do índice enzimático: número de linhagens que apresentaram índice enzimático nos determinados intervalos.....	41
Figura 16. Halo de hidrólise, ao redor da colônia, demonstrando a atividade da tanase.....	42
Figura 17. Avaliação da produção de tanase em placa através do índice enzimático: número de linhagens que apresentaram índice enzimático nos determinados intervalos.....	42
Figura 18. Gráficos mostrando a porcentagem de linhagens de fungos filamentosos positivas para lipase e tanase do total de linhagens (a) isoladas da Região Amazônica, (b)	

isoladas da região da Mata Atlântica e (c) provenientes da CMLB.....44

Figura 19. Correlação entre o índice enzimático obtido pelo ensaio em placa de Petri contendo Tween 80 e atividade enzimática medida por titulometria de neutralização50

Figura 20. a) Colônia em placa de Petri; b) Reverso da colônia; c) Conídios elipsoidais com 1 000X de aumento; d) Conidióforo com 400X de aumento mostrando as cadeias de conídios (I) e hifas septadas (II) das quais se ramificam filíades (III) indicados por setas vermelhas52

Figura 21. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 255 em relação a espécies do gênero *Paecilomyces*, adotando como grupo externo a espécie *Paecilomyces formosus*. Barra 0,02: número de substituições de nucleotídeos por posição.....52

Figura 22. a) Colônias em meio de cultivo PDA; b) Imagem com 400X de aumento da hifa (I) indicada na seta; c) Conidióforo com 400X de aumento mostrando a cabeça conidial (II) indicada na seta; d) Imagem com 1 000X de aumento onde se observa esporo com superfície rugosa (III) indicado na seta.....54

Figura 23. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 43 em relação às espécies do gênero *Aspergillus*, adotando como grupo externo a espécie *Aspergillus brasiliensis*. Barra 0,04: número de substituições de nucleotídeos por posição.....54

Figura 24. a) Colônia em placa de Petri; b) Conídio cilíndrico (I) (1 000X); c) e d) Hifas ramificadas (400X).....56

Figura 25. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 28a em relação às espécies do gênero *Colletotrichum*, adotando como grupo externo a espécie *Colletotrichum gloeosporioide*. Barra 0,002: número de substituições de nucleotídeos por posição.....56

Figura 26. Temperatura ótima de atividade (a) e temperatura de estabilidade (b) da tanase de *Paecilomyces variotii* e da linhagem 255.....58

Figura 27. pH ótimo de atividade (a) e pH de estabilidade (b) da tanase de *Paecilomyces variotii* e da linhagem 255.....59

Figura 28. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade enzimática da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp.; e superfície de resposta (c) e curva de contorno (d) para a atividade enzimática da lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* em função do pH e da temperatura.....64

Figura 29. pH (a) e temperatura de estabilidade (b) da lipase de *Rhizopus oryzae* e de *Colletotrichum* sp.....65

Figura 30. Determinação das constantes Km e V_{máx} da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. (a) e de *Rhizopus Oryzae* (b) de acordo com o modelo gráfico de Lineweaver-Burk (1934).....66

Lista de tabelas

Tabela 1. Aplicação industrial e fonte de algumas enzimas microbianas (adaptado de KOBLITZ, 2008)	10
Tabela 2. Produção de tanase por fungos filamentosos em diferentes resíduos agroindustriais	16
Tabela 3. Produção de lipases por fungos filamentosos cultivados por FES em diferentes resíduos industriais (adaptado de SALIHU et al., 2012)	22
Tabela 4. Variáveis independentes e níveis para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	35
Tabela 5. Variáveis independentes e níveis para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase da Linhagem 28a	35
Tabela 6. Atividade enzimática das linhagens produtoras de tanase por FES	46
Tabela 7. Atividade enzimática das linhagens produtoras de lipase por FES	48
Tabela 8. Matriz do DCCR 2 ² com os valores codificados, reais e resposta (atividade de lipase) para os ensaios de determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase de <i>Colletotrichum</i> sp	60
Tabela 9. Matriz do DCCR 2 ² com os valores codificados, reais e resposta (atividade de lipase) para os ensaios de determinação do pH e temperatura ótima da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	61
Tabela 10. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática da lipase de <i>Colletotrichum</i> sp	61
Tabela 11. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	62
Tabela 12. ANOVA do modelo para a atividade ótima da lipase de <i>Colletotrichum</i> sp.....	62
Tabela 13. ANOVA do modelo para a atividade ótima da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	63

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de Variância
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CMLB	Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioquímica/ FEA-UNICAMP
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DCA	Departamento de Ciência de Alimentos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
dNTP	Deoxynucleotide solution mix
dT	Diâmetro total
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
IE	Índice enzimático
PA	Estado do Pará
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SP	Estado de São Paulo
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNPE	<i>United Nations Environment Programme</i>
V _{máx}	Velocidade máxima
YMA	<i>Yeast Malt Agar</i>

INTRODUÇÃO

O uso de tecnologias de biotransformação e biocatálise aumentam com o passar dos anos devido à busca por produtos diversificados, de maior qualidade e maior valor agregado, obtidos por processos com menor consumo energético; e também, para o aprimoramento do uso de resíduos agroindustriais (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010). Com isso, é previsto um aumento significativo no consumo de enzimas industriais (POLITZER; BON, 2006).

A tanase (tanino acil hidrolase, E.C.3.1.1.20) catalisa a hidrólise de ligações ésteres presentes em taninos hidrolisáveis e em ésteres de ácido gálico (BELMARES et al., 2004). Apresenta papel importante em diversas reações de bioconversão envolvendo precipitação de proteínas, sendo considerada um dos biocatalisadores mais versáteis (CHÁVEZ- GONZÁLEZ et al., 2012). Apesar de apresentar uma série de aplicações potenciais, o uso da tanase ainda é restrito devido ao alto custo de produção e carência de conhecimento a respeito desta (LEKHA; LONSANE, 1997). Com isso, são necessários estudos acerca das propriedades químicas e da produção desta enzima (SCHONS et al., 2011).

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos livres. Ademais, as lipases catalisam a hidrólise, transesterificação e síntese de ésteres, além de possuírem propriedades enantioseletivas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). As lipases são aplicadas na área de síntese orgânica, hidrólise de óleos e gorduras, modificação de gorduras, melhoria de aroma e sabor no processamento de alimentos, resolução de misturas racêmicas e análises químicas (LOPES; DUARTE; MACEDO, 2011; KAHVECI; XU, 2011; SPERANZA; MACEDO, 2012; SIMPSON; RUI; KLOMKLAO, 2012; RIVERA et al., 2013; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). A demanda por novas fontes de lipase e por enzimas com diferentes

características catalíticas, estimula a busca de novas culturas como visto nos trabalhos de Macedo e Pastore (1997), Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) e Paques et al. (2008).

As enzimas de origem microbiana são as mais utilizadas, pois apresentam ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade à manipulação genética e baixo tempo de produção (ANBU et al., 2013). Embora o Brasil possua uma enorme biodiversidade com potencial para produção de biocatalisadores, a tecnologia enzimática ainda é retrógrada. Assim, a utilização de enzimas provenientes de micro-organismos nativos é essencial para o desenvolvimento do setor biotecnológico brasileiro (POLITZER; BON, 2006).

O objetivo desse trabalho foi isolar novas linhagens de micro-organismos silvestres com capacidade de produzir as enzimas de interesse industrial tanase e lipase extracelulares, e caracterizar bioquimicamente, as enzimas selecionadas.

A primeira parte do trabalho visou o isolamento de linhagens de fungos filamentosos e leveduras a partir de amostras de folhas, frutos e sementes encontrados na serapilheira, e também de amostras de solo. As amostras foram coletadas na Região Amazônica (Belém-PA) e da região de Mata Atlântica (Ilhabela-SP). O grupo foi autorizado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a acessar e remeter componentes do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica (Processo: 010662/2013-8).

Devido à necessidade de estudar a biodiversidade do Estado de São Paulo e seu potencial, foi criado o Programa de Pesquisas em Conservação Sustentável da Biodiversidade, denominado “Projeto BIOTA/Fapesp”, que tem como objetivo inventariar e caracterizar a biodiversidade do Estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, seu potencial econômico e sua utilização sustentável. O presente trabalho vincula-se ao projeto temático coordenado pela Prof. Dr^a. Gabriela Alves Macedo, intitulado “Bioprospecção de fungos e leveduras silvestres de distintos biomas do Estado

de São Paulo visando a produção de enzimas, vitaminas de interesse industrial e compostos bioativos”, que faz parte do Projeto BIOTA/Fapesp.

Na segunda etapa, as linhagens de fungos filamentosos isoladas foram testadas qualitativamente em relação à capacidade de produzirem as enzimas tanase e lipase extracelulares, em meio sólido, com o uso de placa de Petri. Após essa pré-seleção, as linhagens positivas foram avaliadas quanto à atividade das enzimas produzidas por fermentação em estado sólido.

A terceira etapa consistiu na identificação das linhagens selecionadas com base em estudos morfológicos e genéticos. As análises genéticas foram realizadas no laboratório da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) em parceria com a Dr^a. Derlene Attili de Angelis pelo aluno André Ohara, membro do projeto temático do programa Biota. Na última etapa, as enzimas selecionadas foram caracterizadas bioquimicamente quanto ao pH e temperaturas de atividade ótima e de estabilidade, e em relação aos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Bioprospecção

O conceito de bioprospecção foi originalmente definido na MP 2186-16/2001 como uma atividade exploratória que visa identificar componentes do patrimônio genético e informações sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial (BRASIL, 2001).

A avaliação da diversidade de espécies de fungos é extremamente complexa. Os dados acerca do número de espécies atualmente conhecidas são conflitantes. Kirk e colaboradores (2008) estimaram que 98 128 espécies foram descritas até a data, enquanto Mora e colaboradores (2011) apresentaram valores mais conservadores (43 271 espécies). Apesar dessas divergências, é válido destacar que o número de espécies conhecidas é pequeno se comparado às estimativas da diversidade total de fungos, que variam de 1,5 milhões de espécies (HAWSWORTH, 2004) a 5,1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011).

O estudo da biodiversidade e a bioprospecção de novos micro-organismos com potencial econômico é de extrema importância na busca de novos compostos bioativos e biocatalisadores. Apesar do aperfeiçoamento das técnicas de engenharia genética e de síntese química, os compostos naturais ainda constituem a principal fonte de biomoléculas com novas propriedades e características (HARVEY et al., 2010). Desse modo, as novas técnicas de identificação de micro-organismos, de estruturas químicas e de atividades biológicas permitirão que os compostos naturais continuem sendo os principais recursos para a biotecnologia (BULL et al, 2000).

1.2. Triagem de micro-organismos em meio sólido em placa de Petri

Hanking e Agnostis (1975) foram um dos primeiros autores a propor a triagem em

meio sólido como método para a rápida seleção de variantes genéticas com presença ou ausência de produção de enzimas.

Apesar da existência de diferentes estratégias de triagem para determinação da produção de lipases, os testes em placas contendo meio sólido são altamente recomendados, uma vez que são métodos rápidos e de baixo custo (GOPINATH et al., 2013).

Os principais métodos para triagem qualitativa de bactérias lipolíticas são técnicas em placa que permitem a visualização de zonas claras em meios de cultura opacos ou que utilizam corantes para aumentar o contraste entre as áreas de lipólise e o meio de cultura (JARVIS; THIELE, 1997). Tais métodos também podem ser utilizados para a triagem de fungos filamentosos e leveduras.

Sierra (1957) desenvolveu um método simples para a detecção de micro-organismos produtores de lipase. Nesse método é utilizado Tween como surfactante e a atividade da lipase é verificada pela precipitação de cristais de sais de cálcio provenientes do ácido láurico liberado pela lipólise, ou pela formação de um halo claro devido à degradação completa dos sais de ácido graxo (Figura 1a).

Outro método para a triagem de micro-organismos em placas de ágar utiliza tributirina como substrato. Nessa técnica, a produção da enzima é avaliada pela formação de zonas claras ao redor da colônia (CARDENAS et al., 2001) (Figura 1b).

Substratos cromogênicos também podem ser usados para avaliar o potencial de produção de lipase. Kouker e Jaeger (1987) avaliaram meio de cultura contendo o corante fluorescente rodamina B e trioleil-glicerol. Nesse método, a hidrólise do substrato leva à formação de halos fluorescentes visíveis quando expostos à luz ultravioleta (Figura 1c).

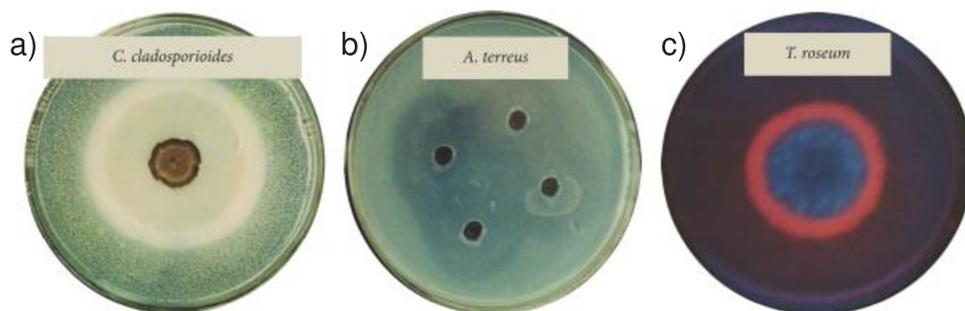


Figura 1. Meios de cultura com diferentes substratos utilizados para identificação de micro-organismos lipolíticos (a) Tween-20, (b) tributirina e (c) rodamina B (Gopinath et al.,2013).

No caso da triagem de micro-organismos produtores de tanase, o método de Bradoo, Gupta e Saxena (1996) é um dos mais utilizados. Nesse método, o meio de cultura é composto por ácido tânico e diversos sais, e a presença da tanase pode ser verificada pela formação de halos claros ao redor das colônias (Figura 2a).

Jana e colaboradores (2012 a) mostraram que o uso de taninos naturais para a triagem de micro-organismos produtores de tanase é bastante promissor. A aplicação de taninos isolados de *Terminalia bellerica* Roxb. (Bahera) para a seleção de micro-organismos produtores de tanase (Figura 2b) mostrou-se um método mais sensível, rápido, barato, reprodutível e confiável que os métodos tradicionais.

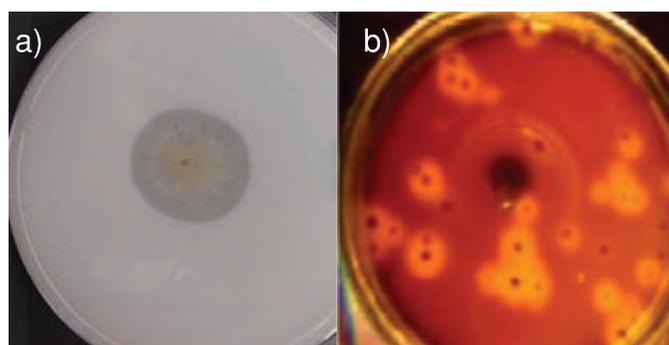


Figura 2. Meios de cultura com diferentes substratos utilizados para identificação de micro-organismos produtores de tanase (a) ácido tânico e (b) tanino natural de tegumento de *Terminalia bellerica* Roxb (Jana et al., 2012 a).

1.3. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES é definida como a fermentação na ausência (ou quase ausência) de água livre, na qual o substrato deve possuir umidade suficiente para propiciar o crescimento do micro-organismo (PANDEY, 2003).

A FES é um fator chave para o desenvolvimento de bioprocessos e de produtos de uso industrial. Nos últimos anos, os avanços na produção de enzimas industriais, biopolímeros, pigmentos e metabólitos secundários mostraram resultados promissores que corroboram a viabilidade técnica e econômica da produção desses compostos por essa técnica em larga escala (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Essa técnica simula o habitat natural de grande parte dos micro-organismos sendo, portanto, um bom método para promover o crescimento microbiano e para produzir produtos de alto valor agregado. Além disso, devido à utilização de resíduos agroindustriais de baixo custo, pode aumentar a viabilidade econômica do processo e minimizar os problemas relacionados à contaminação do ambiente (SINGHANIA et al., 2009).

A FES apresenta inúmeras vantagens em relação à fermentação submersa (FSm) como uma menor necessidade de investimento de capital, menor consumo energético, menor produção de resíduos e maior facilidade de recuperação do produto (FLEURI et al., 2013). Entretanto, ela apresenta algumas limitações como o acúmulo de calor, contaminação bacteriana, problemas com o aumento de escala e com a estimativa do crescimento microbiano, e dificuldade de controle da umidade do substrato (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

A partir de 1940, a FES foi quase completamente ignorada nos países ocidentais devido ao desenvolvimento da tecnologia de FSm. Nos últimos anos, essa tecnologia tem evoluído, entretanto esforços contínuos são necessários para que ela se estabeleça como uma tecnologia viável para a geração de produtos microbianos em escala comercial e em

quantidades equivalentes à tecnologia de FSm (KUMAR; KANWAR, 2012).

Segundo o relatório de 2009 da UNPE (*United Nations Environment Programme*), o setor agrícola mundial gera em torno de 140 bilhões de toneladas de biomassa anualmente. A biomassa dos resíduos agrícolas pode ser aproveitada para a produção de diversos compostos por FES, dentre eles: ácidos orgânicos, enzimas, combustíveis, compostos bioativos e biomassa fúngicas (TORRADO et al., 2011; CHAPLA et al., 2010; BALAT, 2011; MARTINS et al., 2011; AGGELOPOULOS et al., 2014). Além de serem substratos alternativos e baratos, o uso de resíduos agroindustriais também é importante do ponto de vista ambiental, por reduzir o problema da deposição desses resíduos no ambiente.

1.4. Enzimas de interesse industrial

Cerca de 500 produtos comerciais são obtidos utilizando-se enzimas (SANCHEZ; DEMAIN, 2010). A aplicação de enzimas na indústria apresentou grande crescimento nos últimos anos. Seu uso oferece diversas vantagens, como o aumento da qualidade dos produtos, melhora de seu processo de obtenção, redução de custos, e produção de compostos indisponíveis ou pouco disponíveis (TRAN; BALKUS JR, 2011). Além disso, as enzimas apresentam ação rápida e eficiente em baixas concentrações, alta especificidade ao substrato, baixa toxicidade e são capazes de atuar em condições moderadas de pH e temperatura (SANCHEZ; DEMAIN, 2010).

A demanda pelo desenvolvimento de produtos novos e com desempenho superior, bem como os rápidos avanços tecnológicos e o crescimento dos setores farmacêuticos e de biocombustíveis faz os fabricantes de enzimas observarem no mercado atual grande potencial de lucratividade (SARROUH et al., 2012) (Figura 3).

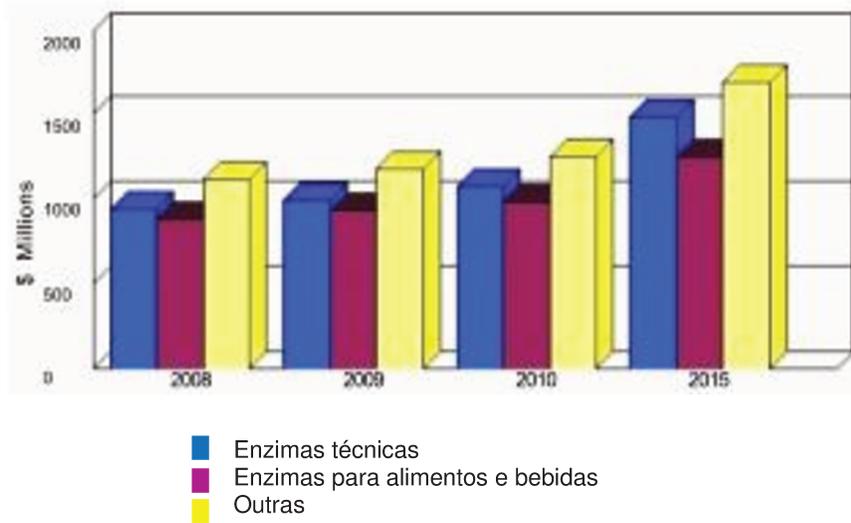


Figura 3. Mercado mundial de enzima de 2008 a 2015 em milhões de dólares (SARROUH et al., 2012).

Das mais de 100 enzimas utilizadas na indústria, mais da metade é proveniente de fungos filamentosos e leveduras, mais de um terço é produzida por bactérias, 8% é de origem animal e 4 % de fontes vegetais (SANCHEZ; DEMAIN, 2010).

Apesar delas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes, devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética como também, por apresentarem menor tempo de produção (ANBU et al., 2013).

Dentre as enzimas mais utilizadas nas indústrias e, conseqüentemente, com maior porcentagem de venda, encontram-se: proteases de *Bacillus* (30 % a 35 %); amilase de *Bacillus* (10 % a 12 %); renina bovina (10 % a 12 %); glicoamilase (8 % a 10 %); glicoisomerase (5 % a 7 %); renina microbiana (2 % a 4 %); pectinase (4 % a 5 %); pancreatina (2 % a 4 %); proteases vegetais (papaína e bromelina) (4 % a 6 %); lipase (2 % a 3 %); outras enzimas (5 % a 10 %) (LIMA et al., 2001). A tabela 1 apresenta a aplicação industrial de diversas enzimas microbianas.

Tabela 1. Aplicação industrial e fonte de algumas enzimas microbianas (adaptado de KOBLITZ, 2008).

Classe	Enzima	Origem biológica	Aplicações
Oxidorrredutases	Catalase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Micrococcus lysodeictius</i>	Remoção de glicose da clara do ovo e do ovo inteiro
	Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	
Liasas	Pectina-liase	<i>Aspergillus niger</i>	Extração e clarificação de sucos, óleos e gorduras vegetais; vinhos
Isomerases	Xilose-isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> ; <i>Arthrobacter</i> sp.; <i>Bacillus coagulans</i> ; <i>Streptomyces albus</i> ; <i>S. olivaceus</i> ; <i>S. olivovhromogenes</i> ; <i>S. rubiginosus</i>	Obtenção de xarope de frutose
Hidrolases	Lipase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Candida lipolytica</i> ; <i>Mucor javanicus</i> ; <i>Rhizopus miehei</i> ; <i>R. arrhizus</i> ; <i>R. niveus</i>	Panificação; obtenção de lipídios estruturados e substituintes de gordura; produção de surfactantes; produção de aromas. Maturação de queijos. Produção de margarina livre de gordura trans
		<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Rhizopus delemar</i> ; <i>R. oryzae</i>	
	α -amilase	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. megatherium</i> ; <i>B. subtilis</i>	Modificação do amido; obtenção de xaropes de glicose e maltose; panificação; produção de bebidas alcoólicas
	B-amilase	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> ; <i>Klebsiella aerogenes</i>	
	Pululanase	<i>Sreptomyces</i> sp.; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Sporotrichum dimorphosporum</i>	
	Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Rhizopus delemar</i> ; <i>R. oryzae</i> ; <i>Sporotrichum dimorphophorum</i> ; <i>Thielavia terrestres</i> ; <i>Trichoderma reesei</i>	Extração e clarificação de sucos, óleos e gorduras vegetais; remoção de polpa de cacau e café; vinhos
	Tanase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i>	Remoção de adstringência em produtos vegetais (vinhos e sucos)
	α -glicosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i>	Síntese de açúcares não convencionais; desglicosilação de flavonóides
	B-glicosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Trichoderma reesei</i>	

1.5. Tanases

1.5.1. Taninos

Taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário de plantas superiores e podem ser classificados como taninos hidrolisáveis ou taninos condensados (HERNES; HEDGES, 2004).

Taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros formados por unidades de flavano-3-ol e a condensação se dá pela ligação do carbono quatro de uma subunidade com o carbono 6 ou carbono 8 da próxima subunidade (BRAVO, 1998) (Figura 4).

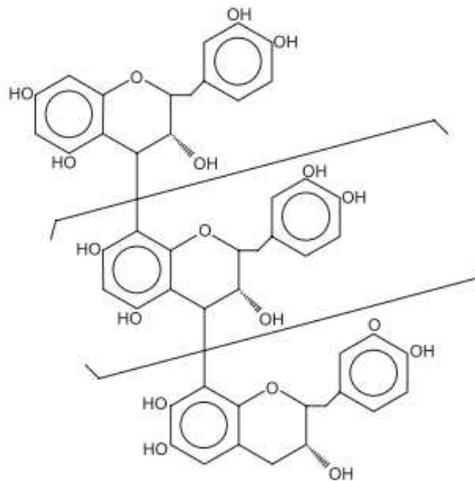


Figura 4. Estrutura química do tanino condensado (BELMARES et al., 2004).

Taninos hidrolisáveis são moléculas formadas pelo éster galoil e seus derivados. Os galactaninos possuem unidades de galoil ou seus derivados ligados às unidades poliol, catequina ou terpenóide (Figura 5a). Os elagitaninos são os taninos hidrolisáveis nos quais pelo menos duas unidades galoil fazem ligação C-C entre si, e que não contém unidades de catequina glicosidicamente ligadas (Figura 5b). Já nos taninos complexos, a

unidade de catequina está glicosidicamente ligada a uma unidade de galotanino ou elagitanino (KHANBABAEE; REE, 2001).

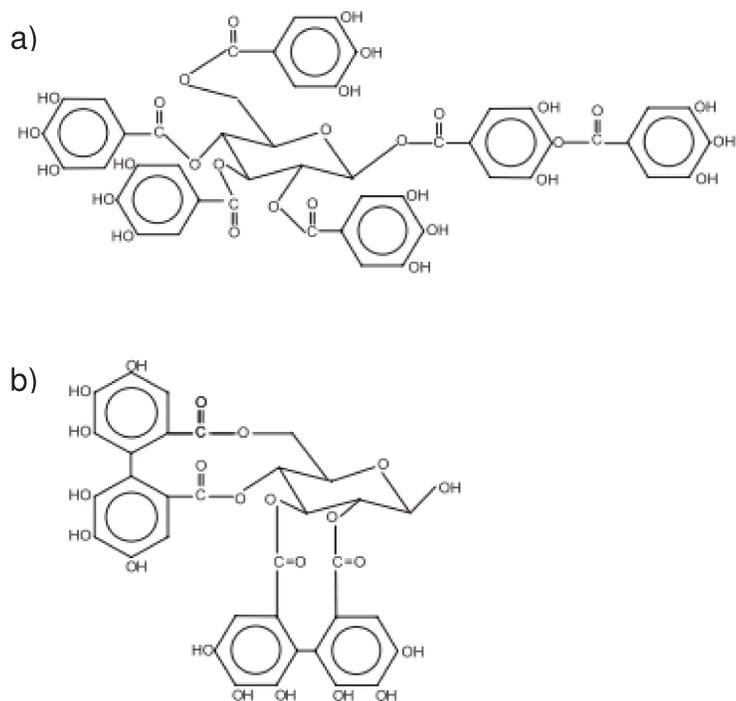


Figura 5. Estrutura química de taninos hidrolisáveis: (a) galactaninos e (b) elagitaninos (BELMARES et al., 2004).

1.5.2. Características das tanases

A enzima tanino acil hidrolase (E.C: 3.1.1.20), também conhecida como tanase, é uma enzima induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, leveduras e bactérias (AGUILAR et al., 1999). Enzimas induzíveis são aquelas produzidas em resposta à presença de indutores que podem ser seu próprio substrato ou compostos relacionados (EI-MANSI et al., 2006).

A tanase catalisa a hidrólise de ligações ésteres presentes em taninos

hidrolisáveis e em ésteres de ácido gálico (BELMARES et al., 2004) (Figura 6).

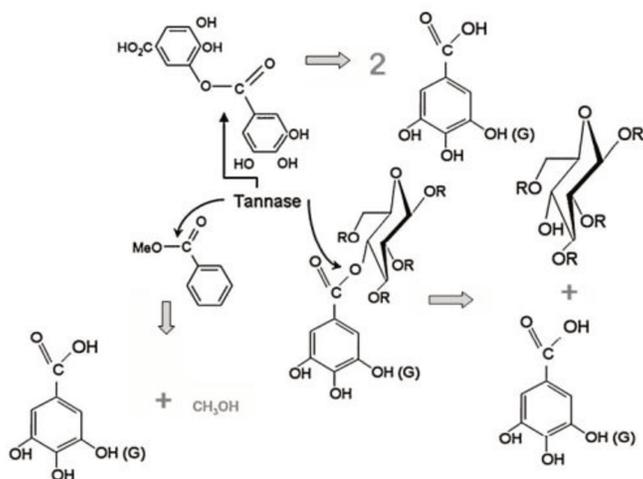


Figura 6. Mecanismo de ação da tanase (AGUILAR et al., 2007).

O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável que é hidrolisado em glicose e ácido gálico (BANERJEE; MUKHERJEE; PATRA, 2005) (Figura 7).

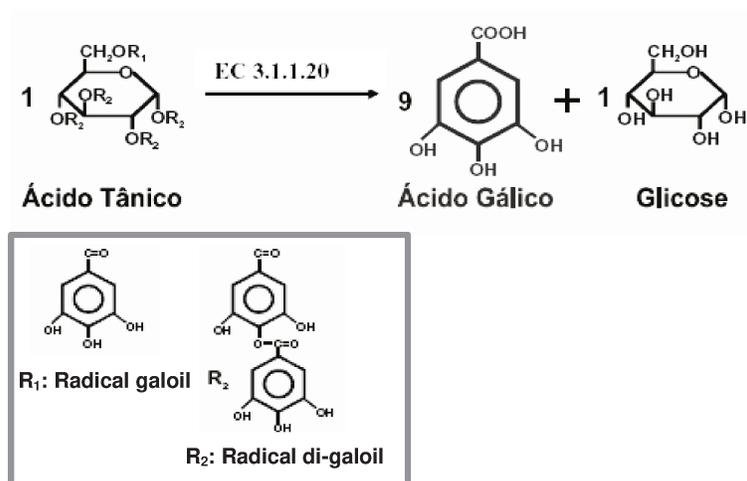


Figura 7. Hidrólise do ácido tânico (AGUILAR et al., 1999).

As tanases possuem alto peso molecular, variando de 186 a 300 kDa, dependendo da fonte e do tipo de micro-organismo produtor. A tanase de *A. niger* MTCC 2425 possui peso molecular de 185 kDa, sendo constituída de duas cadeias polipeptídicas de peso molecular de 102 e 83 kDa. O mesmo acontece com a tanase comercial (Kikkoman, Japão) que possui duas cadeias polipeptídicas de pesos moleculares diferentes (87 e 56 kDa) (PRASAD, 2012).

As tanases apresentam pH ótimo entre 5,5 a 6,0 e temperatura ótima na faixa de 30 °C a 40 °C, com pH de estabilidade na faixa de 3,5 a 8,0 e temperatura de estabilidade entre 30 °C e 60 °C. Seu ponto isoelétrico se apresenta entre 4,0 e 4,5. Elas podem ser inibidas por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} e inativadas pela ação de o-fenantrolina, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfatos e cloretos de magnésio e cálcio. Essas propriedades são variáveis e dependentes das condições de cultivo e do micro-organismo utilizado para produzir a enzima (AGUILAR et al., 2001).

1.5.3. Produção de tanases

Por muitos anos a produção em escala industrial de tanase se deu exclusivamente por FSm. Entretanto, os benefícios da produção de tanase por FES vêm sendo amplamente estudados. Algumas vantagens da produção de tanase por FES são: a natureza extracelular da enzima, maior produtividade, e maior estabilidade à variação de temperatura e pH (LEKHA; LONSANE, 1994).

Renovato e colaboradores (2011) observaram que a tanase de *Aspergillus niger* produzida por FES tinha atividade específica 5,5 vezes maior que a produzida por FSm. Além disso, constaram que a tanase produzida por FES apresentou maior especificidade por metil galato, enquanto a produzida por FSm por ácido tânico. Também foram encontradas diferenças acerca da estrutura e estabilidade de tais enzimas.

Em 2006, Purohit e colaboradores publicaram o primeiro artigo sobre mutação de uma linhagem de fungo filamentoso para a superprodução de tanase. A mutação da co-

cultura de *Aspergillus foetidus* e *Rhizopus oryzae* propiciou aumento da produção de tanase e redução do tempo de produção (PUROHIT et al., 2006).

Diversos micro-organismos produtores de tanase vêm sendo largamente estudados, como por exemplo, fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces*, e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (PINTO et al., 2001; MOHAPATRA; MONDAL; PATI, 2007; BATTESTIN; MACEDO, 2007; IWAMOTO et al., 2008; SELWAL et al., 2011). A tabela 2 apresenta a produção de tanase por diferentes fungos filamentosos a partir de vários resíduos agrícolas.

Na FES, a maior parte da tanase produzida é extracelular e a recuperação da enzima é facilmente obtida pela adição de água destilada ou tampão, mistura e prensagem. Já a concentração da tanase pode ser feita por diferentes métodos, como por precipitação com sais ou solventes, ou por ultrafiltração (AGUILAR et al., 2007).

Tabela 2. Produção de tanase por fungos filamentosos em diferentes resíduos agroindustriais.

Fungo filamentoso	Substrato	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	resíduo de chá pó de casa de romã, caqui, folha de eucalipto folhas de figueira caules de chá <i>gallnut</i> farelo de trigo casca de arroz	Sharma et al. (2014) Aboubakr; El-Sahn; El-Banna (2013) Hamdy; Fawzy. (2012) Wang et al. (2012) Wu et al. (2011) El-Fouly et al. (2010) Paranthaman et al. (2009)
<i>Aspergillus oryzae</i>	casca e farelo de arroz, palha de milho e casca de amendoim	Paranthaman et al. (2009)
<i>A. foetidus</i> , <i>R. oryzae</i> e co-cultura (<i>A. foetidus</i> + <i>R.oryzae</i>)	pó de semente de tamarindo	Perinbam et al. (2009)
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	fruta de bahera serragem de jacarandá	Prasad et al. (2011) Beniwal et al. (2012)
<i>Aspergillus awamori</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	chá verde comercial	Sherie; El-Tanash; Nour (2011)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	vagens de acácia, casca de sorgo e resíduo de pó de chá semente de tamarindo, entre outros	Reddy; Rathod (2012) Jana et al. (2012 b)
<i>Penicillium notatum</i>	mistura de resíduo de calêndula e farelo de trigo	Gayen e Ghosh (2012)
<i>Penicillium atramentosum</i>	folhas de jambolão, entre outros	Selwal et al. (2011)
<i>Trichoderma harzianum</i>	casca de romã, casca de jambolão, entre outros	Iqbal; Kapoor (2012)
Co-cultura de <i>P. chrysogenum</i> e <i>T. virid</i>	casca de uva	Paranthaman et al. (2009)
<i>Paecilomyces variotii</i>	bagaço de laranja farelo de trigo e casca de café torta de mamona	Madeira; Macedo; Macedo (2012) Battestin; Macedo (2007) Madeira; Macedo; Macedo (2011)
Fungos lignolíticos (<i>L. elegans</i> , <i>S.commune</i> , <i>G.applanatum</i> e <i>P. sanguineus</i>)	pó de partes aéreas de <i>Fabiana densa</i>	Ordoñez et al. (2011)

1.5.4. Aplicação industrial de tanases

As tanases apresenta grande potencial de aplicação na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos, mas seu uso generalizado tem sido limitado principalmente pelos altos custos de produção, purificação e recuperação. Nos últimos 20 anos, progressos significativos têm sido feitos para melhorar os processos de produção de tanases, entre eles destacam-se: o isolamento de novas linhagens de micro-organismos produtores dessas enzimas, o uso de diferentes sistemas de fermentação e de novos métodos de purificação economicamente viáveis (CHÁVEZ-GONZÁLEZ, 2012).

Na produção de bebidas, os taninos presentes em grandes quantidades nas folhas utilizadas para o preparo de chás são capazes de interagir com cafeína, levando ao aumento da turbidez, conforme o extrato do chá é resfriado. Tal precipitado formado, chamado de creme do chá, é constituído principalmente por tearubiginas e cafeína, pequenas quantidades de outros flavonóides, compostos não-cafeínicos, clorofila e compostos inorgânicos. Alguns métodos para a retirada do creme do chá geralmente causam efeitos maléficos na cor, aroma e sabor do produto. Desse modo, a utilização de tanase é recomendada para a diminuição da turbidez, uma vez que pode reduzir a perda de *flavor* (BOADI; NEUFELD, 2001).

Na produção de suco de frutas, a tanase também tem o potencial de reduzir a turbidez. Couri e colaboradores (2005) estudaram o tratamento de polpa do caju com tanase visando a redução da turbidez e do teor de taninos. Os autores observaram taxas de redução nas concentrações de taninos totais, nos taninos hidrolisáveis e na turbidez de 46 %, 88 % e 88 %, respectivamente.

Outra fruta que apresenta alto teor desses compostos é a uva, que contém antocianinas e outros flavonóides, como taninos condensados e catequinas, que são modificados durante a produção do vinho e provocam profundas alterações em sua qualidade sensorial. A oxidação dos taninos que leva à turbidez indesejada do vinho pode

ser amenizada pela aplicação de tanase durante a produção (SINGLETON, 1992). Selwal e colaboradores (2011) estudaram a tanase produzida por *Penicillium atramentosum* empregando FES com o uso de diferentes resíduos agroindustriais. Observaram que a aplicação da enzima foi capaz de reduzir em 38,05 % o conteúdo de ácido tânico em vinho de jamum, em 43,59 % o conteúdo de ácido tânico em vinho de uva e em 74 % em extratos de chá.

Os taninos, compostos fenólicos formados por açúcares e ácidos gálico ou elágico, são capazes de se complexarem com proteínas precipitando-as e inibindo-as (KUMAR; SINGH, 1984). Diversos resíduos vegetais ricos em taninos poderiam ser utilizados para alimentação animal caso houvesse redução significativa desses compostos anti-nutricionais, a qual pode ser alcançada pela adição de tanase durante o preparo da ração (GRAMINHA et al., 2008). Em estudo realizado em 2011, Madeira, Macedo e Macedo descreveram um processo que demonstra a possibilidade de produção de ração animal a partir da torta de mamona detoxificada. Neste estudo, a detoxificação foi alcançada através de fermentação utilizando o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*, produtor de tanase.

A tanase também tem potencial para ser aplicada na produção de ácido gálico. O ácido gálico é um composto fenólico utilizado na indústria de produção de corantes, de couro e farmacêutica, onde ele é usado para a obtenção do agente antibacteriano trimetoprim (KAWAKUBO et al., 1991). Kar e Banerjee (2000) estudaram a bioconversão do ácido tânico presente na casca da vagem de *Caesalpinia digyna* por *Rhizopus oryzae*, empregando FES em biorreator, e obtiveram uma taxa de conversão de ácido tânico em ácido gálico de 90,9 %.

As tanases também tem potencial para serem aplicadas na área de tratamento de efluentes. Os agentes curtentes, empregados no processo de curtimento do couro, são extraídos de troncos, folhas e raízes. Tais extratos vegetais possuem em torno de 50 a 75

% de taninos e são responsáveis pela estabilização das fibras de colágeno no processamento do couro. Durante o curtimento deste, os agentes curtentes são utilizados excessivamente para garantir a completa reação dos taninos com o colágeno, entretanto, eles não são totalmente absorvidos pelo couro. Com isso, grandes quantidades de taninos são liberadas nas águas residuais (QIANG et al., 2008). Assim, o uso de tanase para catalisar a hidrólise dos taninos presentes nos efluentes da indústria de couro é um campo promissor.

1.6. Lipases

1.6.1. Características das lipases

No presente trabalho também foram estudadas as lipases (triacilglicerol acil hidrolases E.C.3.1.1.3) que são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis na interface água-óleo (SARDA; DESNUELLES, 1958).

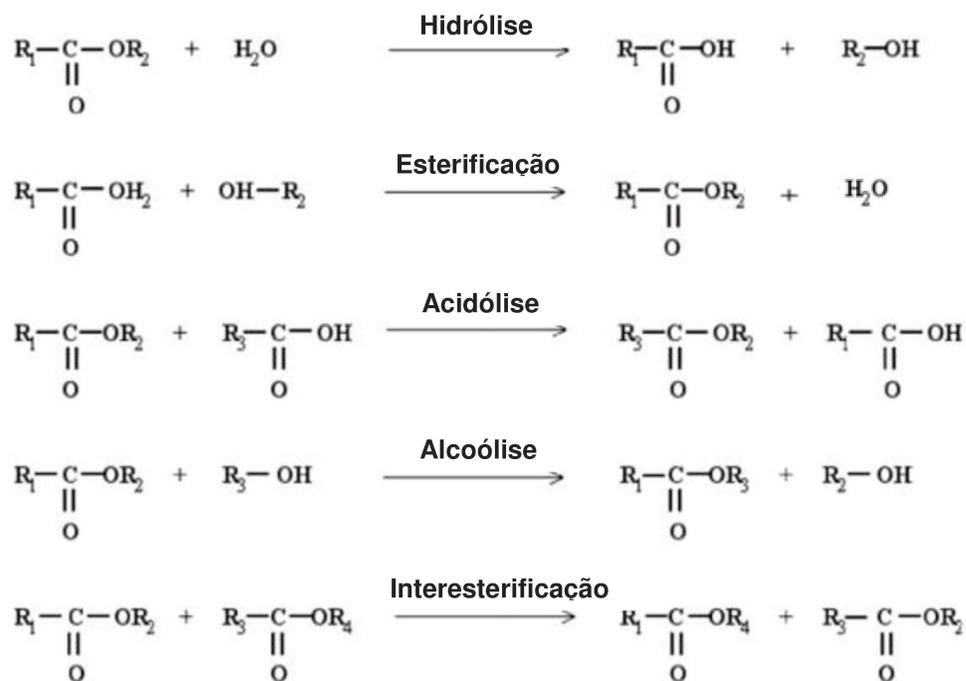


Figura 8. Representação das diferentes reações catalisadas pelas lipases (adaptado de SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

As lipases também são capazes de atuar na transesterificação de triacilgliceróis e na resolução de misturas racêmicas (KIRCHNER; SCOLLAR; KLIBANOV, 1985). Em meio não aquoso, podem catalisar a reação inversa, ou seja, a síntese de ligações ésteres e formação de acilgliceróis a partir de ácido graxo e glicerol (MACRAE; HAMMOND, 1985) (Figura 8).

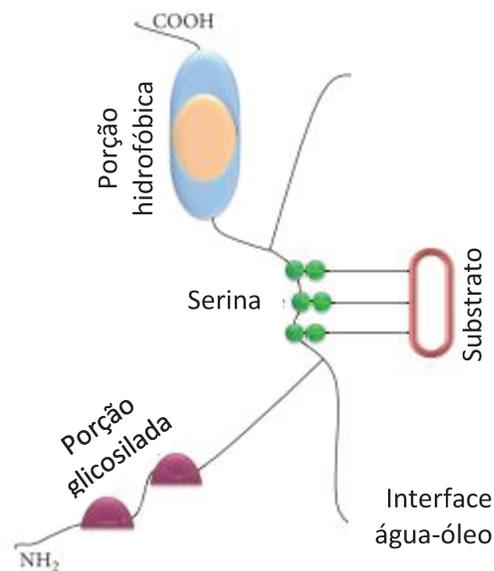


Figura 9. Representação da molécula de lipase e das regiões de interação com o substrato (adaptado de GOPINATH et al., 2013).

Lipases são carboxiesterases que atuam em acilgliceróis de cadeias longas. A molécula de lipase (Figura 9) possui uma tríade catalítica composta de serina, histidina e aspartato ou glutamato. Durante a catálise mediada por lipase, primeiramente, a serina é ativada por desprotonação propiciada pela histidina e aspartato. Com isso, aumenta-se a nucleoficidade do resíduo hidroxil da serina, o qual ataca o grupo carbonil do substrato, formando um intermediário acil-enzima. A presença da cavidade oxiânion contribui para a estabilização da distribuição de cargas e redução da energia do estado fundamental do

intermediário tetraédrico. A deaciliação é controlada pela eletronegatividade das moléculas presente na interface. Nesse processo um nucleófilo, como a água, ataca a enzima acilada levando à liberação do produto e à regeneração do sítio catalítico (REIS et al., 2009).

1.6.2. Produção de lipases

A produção de lipases por FES pode ser afetada por uma série de fatores como tamanho das partículas do substrato, umidade, temperatura, condutividade térmica das partículas do substrato, perfil lipídico do substrato ou presença de lipídios indutores, e adição de fontes de nitrogênio e de surfactantes (KUMAR; KANWAR, 2012).

Segundo Singh e Mukhopadhyay (2012), muitos pesquisadores trabalham na triagem de novos micro-organismos produtores de lipases e na otimização da composição de meios de cultura. Tais autores afirmam também que a seleção de micro-organismos produtores de lipases fúngicas vem apresentando resultados satisfatórios e que o uso de resíduos agroindustriais, como substratos para a produção de lipases, reduz o custo de produção.

A tabela 3 apresenta diferentes fungos filamentosos produtores de lipases, bem como a gama de substratos que podem ser utilizados para a produção dessas enzimas. Além dos trabalhos citados na tabela 3, pode-se destacar o trabalho de Macedo e colaboradores (2004) que visou a otimização da reação de esterificação de álcool isoamílico e ácido butírico catalisada por lipases de *Geotrichum* sp. e *Rhizopus* sp. produzidas em farelo de trigo.

Assim, os principais micro-organismos utilizados na produção de lipases industriais são: *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R.delemar*, *R.japonicus*, *R. niveus* e *R.oryzae* (TREICHEL et al., 2010).

Tabela 3. Produção de lipases por fungos filamentosos cultivados por FES em diferentes resíduos industriais (adaptado de SALIHU et al., 2012).

Organismos	Substratos	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Farinha de soja e casca de arroz	COLLA et al. (2010)
	Farelo de trigo	CONTENSINI et al. (2009)
	Torta de gergelim	MAHADIK et al. (2002)
<i>Penicillium. Simplicissimum</i>	Torta de gergelim	KAMINI et al. (1998)
	Resíduo de mamona	GODOY et al. (2011)
<i>P. brevicompactum</i>	Torta de babaçu	GUTARRA et al. (2009)
<i>P. verrucosum</i>	Torta de babaçu	SILVA et al. (2011)
<i>P. restrictum</i>	Farelo de soja	KEMPKA et al. (2008)
	Resíduo de óleo de babaçu	PALMA et al. (2000)
<i>P. citrinum</i>	Resíduo de óleo vegetal	GOMBERT et al. (1999)
<i>Penicillium sp.</i>	MIRANDA et al. (1999)	MIRANDA et al. (1999)
	Farelo de soja	RIGO et al. (2009)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farinha de soja	VARDANEGA et al. (2010)
	Farelo de soja	GARLAPATI; BANERJEE (2010)
<i>R. chinensis</i>	Farelo e farinha de trigo	SUN; XU (2008)
<i>R. homothallicus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	MATEOS DIAZ et al. (2006)
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Torta de azeite e bagaço de cana-de-açúcar	CORDOVA et al. (1998)
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Casca de arroz	COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS (2006)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Castanha triturada	DOMÍNGUEZ et al. (2003)
	Farelo de cevada	IMANDI; KARANAM; GARAPATI(2010)
	Torta de "niger seed"	IMANDI; KARANAM; GARAPATI(2010)
<i>Candida cylindracea</i>	Resíduo de indústria de azeite	D'ANNIBALE et al. (2006)
	Efluente de indústria de óleo de palma	BROZZOLI et al. (2009)
<i>C. rugosa</i>	Soro de queijo	SALIHU et al. (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	Torta de amendoim	TOMMASO et al. (2011)
<i>Bacillus sp.</i>	Resíduo de indústria de azeite	CHATURVEDI et al. (2010)
<i>Bacillus coagulans</i>	Resíduo de indústria de azeite	ERTUĞRUL; DÖNMEZ; TAKAÇ (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resíduo de melão	ALKAN et al. (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Torta de semente de Jatropha	MAHANTA; GUPTA; KHARE (2008)

1.6.3. Aplicação industrial de lipases

Devido à suas propriedades químico, régio e enantiosseletivas, a lipase tem sido

aplicada em uma variedade de áreas da biotecnologia, como na resolução de fármacos quirais, modificação de gorduras, síntese de substituintes da manteiga de cacau, produção de biocombustíveis, cosméticos, agroquímicos, oleoquímicos e realçadores de sabor (CONTESINI et al., 2010). Ademais, as lipases são as enzimas mais utilizadas na área de química orgânica, para síntese de diferentes ésteres a partir de ácidos orgânicos e alcóois, em solventes orgânicos com baixo conteúdo de água (PAQUES; MACEDO, 2006).

A aplicação industrial mais importante das lipases hidrolíticas fúngicas é como aditivo em detergentes para limpeza industrial ou doméstica. Seu uso pode reduzir a deposição de componentes do detergente no ambiente e também levar à economia de energia, uma vez que detergentes adicionados de lipases não necessitam de altas temperaturas para atuarem (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

A produção de biodiesel via catálise enzimática mediada por lipase vem sendo largamente estudada devido às vantagens desse método em comparação aos processos de catálise química ou não catalíticos. Algumas das vantagens do uso de lipases são: menor consumo de energia; menor degradação térmica tanto dos substratos quanto dos produtos; aumento da gama de matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção do biodiesel, como o uso de óleo ácido; facilidade no processo de purificação, principalmente se a catálise for realizada pelo uso de enzimas imobilizadas ou de células inteiras (RIBEIRO et al., 2011).

A aplicação de lipases no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras é um campo promissor. O emprego de misturas enzimáticas microbianas, obtidas por FES, pode ser aplicado no pré-tratamento de efluentes da indústria leiteira e de matadouros ricos em gorduras (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Na indústria farmacêutica, a biocatálise apresenta muitas vantagens em relação à síntese química como a enantio e regioseletividade das lipases; condições amenas de

processo que evitam reações de isomerização, racemização, epimerização e rearranjo; além da reutilização das enzimas imobilizadas. A habilidade da lipase em resolver misturas racêmicas pela síntese de um único enantiômero é atualmente utilizada para a produção de medicamentos, uma vez que, em geral, apenas um dos enantiômeros é responsável pelo efeito terapêutico do composto, e que a presença de ambos os enantiômeros pode estar associada ao aumento de efeitos colaterais (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Na indústria oleoquímica, gorduras de menor valor comercial podem ser convertidas em outras de maior valor agregado por transesterificação, catalisadas por lipases na presença de solventes orgânicos. Alguns exemplos são: a produção de manteiga de cacau a partir da fração média da palma, produção do substituto da gordura do leite humano “Betapol”, de ácidos graxos poli-insaturados ricos em lipídios de baixas calorias, e a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Sabendo-se da capacidade da lipase de catalisar reações de síntese de ésteres e de transesterificação em sistemas contendo solventes orgânicos, sua aplicação na síntese de poliésteres biodegradáveis vem sendo estudada. Linko e colaboradores (1998) demonstrou a viabilidade da produção de uma ampla gama de ésteres e poliésteres biodegradáveis utilizando-se lipase como catalisador. O autor concluiu que bons resultados dependem da escolha correta das condições do processo e da lipase aplicada. Na esterificação de ácido oleico com 1-butanol altas taxas de oleato de butila foram obtidos com extrato bruto de lipase de *C. rugosa*, *C. viscosum*, *R. miehei* e *P. fluorescen*. Em estudo mais recente, Yao e colaboradores (2011) descreveram a produção de poliéster biodegradável contendo unidades de ácido l-málico, através de esterificação mediada por lipase em meio orgânico utilizando Novozym 435 como biocatalisador.

Na indústria de alimentos, a tecnologia enzimática é uma opção viável para a

produção de aromas naturais, pois além de propiciar maior estereoseletividade, o produto pode ser considerado como uma substância natural. Através de esterificação e transesterificação para a produção de ésteres, a partir de matérias-primas de baixo valor, é possível produzir compostos de aroma com aplicação na indústria de alimentos. Lipases de diversos micro-organismos são capazes de produzir ésteres, como a lipase de *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor miehei*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus arrhizus* e *Candida rugosa* (LONGO; SANROMÁN, 2006). Em trabalho mais recente, Lopes (2013) descreveu processos para a obtenção de lactonas, ésteres cíclicos aplicados como compostos de aroma, por biotransformação microbiana e biocatálise enzimática dos óleos de mamona e de linhaça.

2. METODOLOGIAS

2.1. Coleta de amostras e isolamento de micro-organismos

O grupo foi autorizado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a acessar e remeter componentes do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica (Processo: 010662/2013-8).

As coletas foram realizadas na cidade de Belém-PA, localizada na Região Amazônica, e na cidade de Ilhabela-SP em área de Mata Atlântica próxima à Praia de Castelhanos. Foram coletadas ao acaso amostras de flores, frutos e sementes encontrados na serrapilheira; e também amostras de solo, coletadas da superfície até no máximo cinco centímetros de profundidade. As amostras foram coletadas utilizando-se espátulas estéreis e foram depositadas, separadamente, em sacos estéreis de polietileno.

As amostras foram mantidas nos sacos esterilizados e transportadas ao laboratório. Uma porção de 1 g de cada amostra foi diluída em 10 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas foram plaqueadas através da técnica de semeadura em superfície (estrias simples), em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA) para o crescimento de fungos filamentosos e em meio *Yeast Malt Agar* (YMA), para o crescimento de leveduras. Ambos os meios de cultura foram suplementados com clorafenicol (50 ppm) para inibição de crescimento bacteriano.

Para o isolamento dos micro-organismos, as placas de Petri com o inóculo foram mantidas em estufa (Fanem) a 30 °C de 24 a 72 h. A cada 24 h foram retiradas colônias puras, as quais foram repicadas em tubos inclinados do mesmo meio de cultivo. Os tubos por sua vez, foram incubados a 30 °C em estufa (Fanem) até crescimento favorável da linhagem.

2.2. Conservação e depósito das linhagens de micro-organismos

As linhagens de fungos filamentosos foram conservadas em tubos contendo meio inclinado de PDA e as leveduras em meio YMA. Nos tubos contendo os micro-organismos isolados foi adicionada vaselina estéril para aumentar o tempo de conservação das linhagens, as quais foram mantidas sob refrigeração (aproximadamente 8 °C) para testes posteriores.

O número de colônias puras obtidas foi contado e cada uma recebeu um número sequencial indicando o número da linhagem, de qual amostra a linhagem foi isolada, e a região de origem da amostra. Todas as linhagens foram incorporadas à Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, FEA- UNICAMP (CMLB). Algumas linhagens com grande potencial de produção de tanase e lipase foram depositadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no CPQBA/UNICAMP.

As análises foram realizadas somente com as linhagens de fungos filamentosos. As leveduras isoladas foram armazenadas para posterior utilização em futuros projetos do nosso grupo de pesquisa.

2.3. Estudo morfológico macroscópico das linhagens fúngicas

As linhagens foram estudadas quanto à morfologia das colônias e para tal foram analisadas a presença de filamentos, a textura da colônia, a cor e a produção de pigmentos difundidos no meio.

2.4. Pré-seleção em placa de Petri das linhagens fúngicas produtoras das enzimas

2.4.1. Pré-seleção das linhagens produtoras de tanase

Os micro-organismos isolados foram inoculados em placas de Petri, contendo meio sólido diferencial, para a verificação da síntese e estimativa da produção de tanase, segundo método descrito por Bradoo, Gupta e Saxena (1996). O meio foi composto por ágar bacteriológico 30,0 g/L; ácido tânico (Tanal B - Prozyn) 10,0 g/L; NaNO_3 , 3,0 g/L; KH_2PO_4 , 1,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; KCl 0,5 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L, em pH 4,5.

Após 48 h de incubação na temperatura de 30 °C, a atividade da tanase foi detectada pela presença de halos claros ao redor das colônias, formado pela hidrólise do ácido tânico. A atividade enzimática foi estimada semi-quantitativamente através do índice enzimático (IE). O IE foi determinado pela relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.4.2. Pré-seleção das linhagens produtoras de lipase

Os micro-organismos isolados foram inoculados em meio sólido diferencial para a verificação da síntese de lipase e para a estimativa de sua produção. O meio diferencial utilizado para a seleção de linhagens lipolíticas foi composto por ágar- ágar 15,0 g/L; peptona 10,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L e 10 mL de Tween 80 (SIERRA, 1957).

Os micro-organismos foram incubados no meio descrito acima por 48 h a 30 °C. Em seguida, as placas foram colocadas sob refrigeração por 48 h. Após esse período, seguiu-se com a determinação do IE.

2.5. Seleção quantitativa das linhagens produtoras das enzimas em farelo de trigo

2.5.1. Seleção das linhagens produtoras de tanase

O meio de cultura para produção da tanase foi composto por farelo de trigo (Natu's), enriquecido com 10% de ácido tânico (Tanal B-Prozyn), e água, na proporção 1:1 (m/m). Frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g de meio de cultura esterilizado por 20 min a 121 °C foram inoculados com 1,0 mL de suspensão homogênea de esporos (aproximadamente 5×10^7 esporos/mL). A suspensão de esporos foi preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura com 96 h de crescimento em meio inclinado de PDA.

Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C em estufa (Fanem) por 120 h. Após a fermentação, foram adicionados 40 mL de solução tampão acetato de sódio pH 5,0 0,02 M, e os frascos foram agitados a 200 rpm por 60 min em *em agitador orbital New Brunswick G-25*. Em seguida, a solução foi filtrada em gaze e o filtrado foi centrifugado a 10 000 rpm por 30 min a 4°C em centrífuga Hitachi Himac CRGII. A atividade enzimática foi medida no sobrenadante.

Já a atividade da tanase foi medida de acordo com o método de Sharma, Bhat e Dawra (2000), com modificações. A mistura reacional foi composta por 0,25 mL de ácido tânico (Tanal B- Prozyn) e 0,50 mL de extrato enzimático; o controle continha 0,25 mL de tampão acetato de sódio 0,02 M pH 5,0 e 0,50 mL de extrato enzimático; e o branco, 0,25 mL de ácido tânico e 0,50 mL do mesmo tampão.

A reação ocorreu a 50°C por cinco min. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de rodanina alcoólica (0,665 %) (Acros Organics) e os tubos foram incubados por mais cinco min. Após este período, os tubos foram incubados por cinco min com 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio 0,5 M. Por fim, foram adicionados 4,0 mL de água destilada e,

após 10 min, a absorbância foi medida a 520 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU-640).

A quantificação foi feita por meio de uma curva padrão de ácido gálico. Uma unidade de tanase foi definida como a quantidade de micromoles de ácido gálico liberados por minuto, nas condições descritas. A atividade enzimática foi definida em unidades por mililitro de enzima (U/mL).

Foi empregado como produtor padrão a linhagem de *Paecilomyces variotii*, micro-organismo mais utilizado por nosso grupo de pesquisa para estudos com tanase, como modo de avaliar se as enzimas das novas linhagens estudadas apresentavam maior ou menor atividade quando comparadas à produzida por ele.

2.5.2. Seleção das linhagens produtoras de lipase

O meio de cultura para produção da lipase foi composto de farelo de trigo (Natu's) e água, na proporção de 1:1 (m/m). Frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g de meio de cultura esterilizados por 20 min a 121 °C foram inoculados com 1,0 mL de suspensão homogênea de esporos (aproximadamente 5×10^7 esporos/mL). A suspensão de esporos foi preparada com água destilada esterilizada e com esporos de cultura com 96 h de crescimento em meio inclinado de PDA.

Os frascos foram incubados a 30 °C por 96 h e após a incubação foram adicionados 50 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e permaneceram por 2 h com agitação ocasional e, em seguida, foram filtrados em gaze. Com o filtrado foram realizados os ensaios posteriores.

A atividade lipolítica foi medida em um sistema composto por 5 mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7 %, na proporção de 25 % de óleo para 75 % de goma; 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e 1,0 mL de solução enzimática.

O sistema foi incubado a 37 °C por 30 min em banho-maria com agitação de 150 opm (DUBNOFF). A reação foi paralisada com a adição de 10 mL de solução de acetona e etanol (1:1), e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05 M.

A quantificação foi feita por meio de uma curva padrão de ácido oleico (VETEC). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de micromoles de ácido graxo liberados por minuto, nas condições descritas.

Foi empregado como produtor padrão a linhagem de *Rhizopus oryzae*, micro-organismo mais utilizado por nosso grupo em ensaios sobre lipase, como modo de avaliar se as enzimas das novas linhagens estudadas apresentavam maior ou menor atividade quando comparadas à produzida por ele.

2.6. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976) com curva padrão de BSA.

2.7. Identificação das linhagens selecionadas

2.7.1 Análise morfológica

A fim de analisar microscopicamente as linhagens foi utilizado o corante azul de lactofenol-algodão e foram obtidas fotos com 400 vezes e 1 000 vezes de aumento.

2.7.2 Análise genética

2.7.2.1. Extração do DNA

De acordo com a metodologia de Raeder e Broda (1984), as culturas foram cultivadas em 10 mL de meio *Sabourad dextrose caldo* por 72 h a 28 °C. Após o crescimento, os micélios foram transferidos para tubos de Eppendorf de 1,5 mL. A

suspensão micelial foi lavada três vezes com água ultrapura autoclavada e centrifugada a 3 000 rpm por 30 s e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 50 μ L do tampão de extração (1 % de SDS, 25 mM de EDTA, 250 mM de NaCl e 200 mM de Tris-HCl pH 8,0).

A suspensão fúngica foi triturada com bastão de plástico e foram adicionados mais 950 μ L do tampão de extração. A suspensão fúngica permaneceu incubada a 65 °C por 20 min e em seguida, foi centrifugada a 14 000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, 800 μ L do sobrenadante foram adicionados de um volume de fenol ácido e foi realizada a homogeneização e centrifugação a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C. Foi adicionado ao sobrenadante mais 800 μ L de fenol/clorofórmio (1:1), e novamente foi realizada a centrifugação a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C. Em seguida, 800 μ L de clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante, o qual foi homogeneizado e centrifugado a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C. Posteriormente, foi adicionado 600 μ L de isopropanol ao sobrenadante, e então seguiu-se a homogeneização e incubação por 5 min em temperatura ambiente.

Por fim, foi realizada uma última centrifugação a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com 50 μ L de etanol 70 %. O *pellet* foi submetido à secagem a 37 °C e ressuspenso com 50 μ L de água ultrapura autoclavada. Foi realizada a incubação por 1 hora a 37 °C com 1 μ L de RNase 10 mg/mL.

Os testes de quantificação do DNA foram realizados em gel de agarose 1 %, adicionado do corante SYBR® Green. Alíquotas de 2 μ L de cada amostra foram misturadas com 2 μ L de tampão (0,25 % de azul de bromofenol e 40 % de sacarose). O DNA foi quantificado no gel por comparação com um padrão de DNA de concentração conhecida λ -DNA (50 ng/ μ L). Após corrida eletroforética, o gel foi observado sob luz ultravioleta e, a intensidade de fluorescência das amostras de DNA, comparada com a do padrão.

2.7.2.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS do operon ribossomal e de segmento do gene para calmodulina

Para a identificação das linhagens 255 e 28a, foi realizada reação de PCR para amplificação da região ITS do operon ribossomal, utilizando os *primers* ITS1 5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3' e ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' em termociclador GeneAmp PCR System 9 700. Já para a linhagem 43 foi amplificado segmento do gene para calmodulina e os *primers* utilizados foram 5'-ATG GC(G/C) GAC TC(C/T) CT(G/T) AC(C/T) GAA G-3' e 5'-TTA (C/T)TT (C/T)TG CAT CAT (A/G)AG (C/T)TG G-3'.

Para a reação, 1 µL do DNA obtido foi adicionado a uma mistura contendo: 2,5 µL do tampão de reação 10x (Promega), 0,2 µL de dNTP's (50 mM cada), 0,75 µL de MgCl₂ (Promega), 0,5 µL do *primer* ITS1 (5mM) ou do *sense primer* para calmodulina, 0,5 µL do *primer* ITS4 ou *antisense primer* para calmodulina (5mM), 0,4 µL da enzima Taq DNA polimerase (Promega) e 15,5 µL de água deionizada. A amplificação da região ITS foi realizada através de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min e 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 30 s e alongamento a 72 °C por 35 s; seguido pela a incubação final a 72 °C por 10 min. Já para a amplificação do segmento do gene para calmodulina, foi feita desnaturação inicial a 94 °C por 150 s e 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 50 °C por 30 s e alongamento a 72 °C por 30 s, seguido pela a incubação final a 72° C por 15 min.

Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1 % adicionado do corante SYBR® Green, sendo o gel observado sob luz ultravioleta para verificação da reação de amplificação (MENEZES et al., 2010).

Após a confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram purificados com auxílio do kit Illustra GFX PCR DNA e *Gel Band Purification* (GE®), sendo os produtos

submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1 %, para verificação da purificação. Assim os produtos da purificação foram submetidos à reação de sequenciamento que foi realizada com o kit BigDye (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante e os produtos foram sequenciados no sequenciador Genetic Analyzer 3500 XL (Applied Biosystems).

2.7.2.3. Análise das sequências e filogênia

As sequências da região ITS do operon ribossomal foram montadas com o programa DNA Baser - Sequence Assembler. As sequências de DNA foram analisadas através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no website do National Center for Biotechnology Information (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). A árvore filogenética foi elaborada com o Phylogeny.fr disponível no site (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi) (DEREEPER, et al., 2008).

2.8. Caracterização bioquímica das tanases

2.8.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O pH ótimo de atividade foi determinado avaliando-se a atividade enzimática em uma faixa de pH de 3,5 à 9,0. Para tal, foram preparadas as seguintes soluções tampão 0,2 M: acetato de sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5); citrato de sódio (pH 6,0); fosfato de sódio (pH 6,5 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). A reação enzimática e a medida de atividade foram realizadas conforme descrito no item 2.5.1.

Para determinar a faixa de pH de estabilidade, o extrato enzimático foi tratado com as diferentes soluções tampão descritas acima a 0,02 M por 24 h sob refrigeração.

2.8.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

Para determinar a temperatura de atividade ótima da tanase, a reação enzimática foi realizada em temperaturas variando de 20 °C a 90 °C, em intervalos regulares de 10 °C. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 2.5.1.

Para determinar a temperatura de estabilidade, a solução de enzima bruta foi submetida a tratamento térmico nas mesmas temperaturas descritas acima, por 30 min. Em seguida, foi determinada a atividade enzimática residual.

2.9. Caracterização bioquímica das lipases

2.9.1. Determinação do pH e temperatura ótima de atividade

A determinação da temperatura e pH de atividade ótima foi feita utilizando-se um delineamento composto central rotacional com três replicatas no ponto central e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes e os níveis utilizados estão descritos nas tabelas 4 e 5.

Foram utilizadas as seguintes soluções tampão a 0,1 M: citrato-fosfato (pH 3,2 e 4,0); fosfato de sódio (pH 6,0, 6,6 e 8,0); tris-HCl (pH 8,8); borax-NaOH (pH 9,4 e 10,0).

Tabela 4. Variáveis independentes e níveis para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Variáveis independentes	Níveis				
	- α^*	-1	0	+1	α^*
pH	3,2	4,0	6,0	8,0	8,8
Temperatura (°C)	29,9	33,0	41,5	50,0	53,3

* $\alpha = 1,41$

Tabela 5. Variáveis independentes e níveis para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase da Linhagem 28a.

Variáveis independentes	Níveis				
	- α^*	-1	0	+1	α^*
pH	6,0	6,6	8,0	9,4	10,0
Temperatura (°C)	23,9	30,0	45,0	60,0	66,1

* $\alpha = 1,41$

2.9.2. Determinação das faixas de pH e temperatura de estabilidade

Para determinar a faixa de temperatura de estabilidade das lipases, a solução de enzima bruta foi submetida a tratamento térmico em temperaturas variando de 20 °C a 70 °C, em intervalos regulares de 10 °C, durante uma hora.

Para determinar a faixa de pH de estabilidade o extrato enzimático foi tratado com soluções tampão a 0,1 M por 24 h (sob refrigeração): citrato-fosfato (pH 3,5 e 4,5); fosfato de sódio (pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0); borax (pH 9,0).

A atividade remanescente foi determinada de acordo com o item 2.5.2.

2.9.3. Determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmáx

Para determinação dos parâmetros cinéticos, a reação foi realizada utilizando-se diferentes concentrações de substrato. Nesse caso, variou-se a porcentagem de azeite de oliva na emulsão formada com a goma arábica. As concentrações de substrato avaliadas foram (%): 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50. Os ensaios foram realizados como descrito no item 2.5.2. A constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima (Vmáx) foram determinadas de acordo com o método de linearização de Lineweaver-Burk (1934).

2.10. Estatística

Quando necessária a comparação entre diferentes grupos, foi aplicado o teste de Tukey (as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$). Já o coeficiente de correlação de Pearson foi usado para medir o grau de dependência entre duas respostas, nesse teste o coeficiente de correlação varia de -1 a 1, sendo que quando obtido valor igual a 1, os dados correlacionam-se perfeitamente e positivamente, enquanto que quando o valor é igual a -1 essa relação é perfeita e negativa e, valor igual a 0 implica na inexistência de correlação (a correlação foi considerada significativa quando $p < 0,05$). Para o teste de Tukey e para a obtenção do coeficiente de Pearson foi utilizado o software Minitab® 16.1.1. Os dados obtidos com o desenho experimental foram

analisados utilizando-se o software Statistica® 8.0.

A árvore filogenética foi construída a partir das distâncias evolutivas calculadas pelo método de agrupamento por similaridade (*neighbor joining*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Linhagens isoladas

Foram obtidas amostras de folhas, frutos e sementes encontrados na serrapilheira, e também amostras de solo de duas regiões brasileiras (Apêndices 1, 2, 3 e 4). Da Região Amazônica, foram obtidas 9 amostras e da região da Mata Atlântica 37 amostras. Das amostras da Região Amazônica foram isoladas 90 linhagens, já da região da Mata Atlântica foram isoladas 150 linhagens (Figura 10).



Figura 10. Mapa mostrando o número de linhagens de fungos filamentosos e leveduras isoladas em cada região estudada.

O número de linhagens obtido de cada amostra foi variável, como pode ser observado nas figuras 11 e 12.

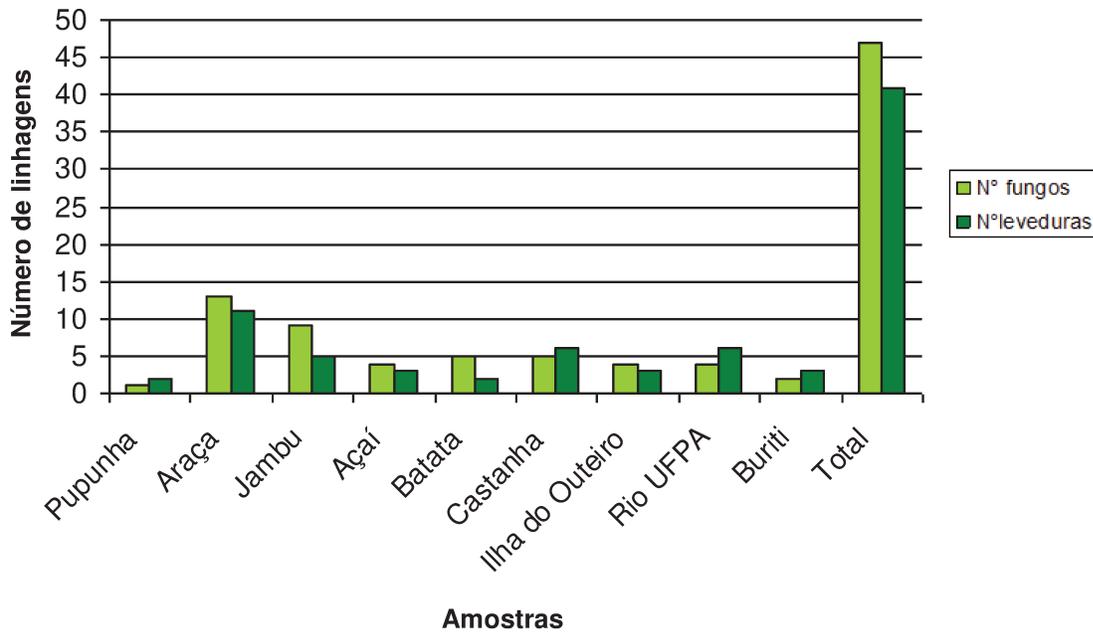


Figura 11. Gráfico com o número de linhagens obtidas de cada amostra da Região Amazônica.

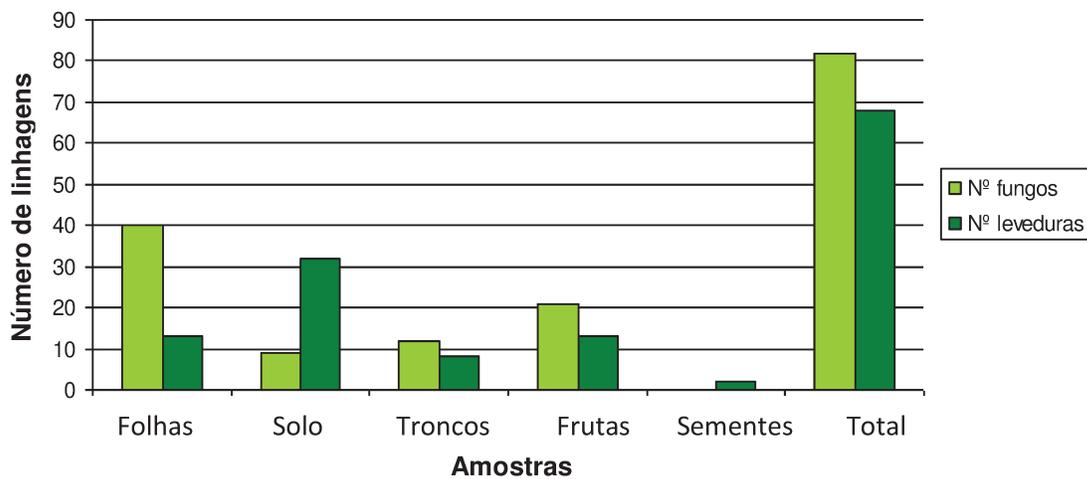


Figura 12. Gráfico com o número de linhagens obtidas de cada amostra da região de Mata Atlântica.

As 240 novas linhagens isoladas foram repicadas em tubos contendo meio de cultura sólido e passaram a integrar a CMLB (Figura 13) (Apêndices 1, 2, 3 e 4).



Figura 13. Tubos com meio inclinado de YMA ou PDA contendo alguns micro-organismos isolados.

As colônias de fungos filamentosos foram analisadas quanto às suas características morfológicas macroscópicas (Apêndices 5 e 6). Além das linhagens isoladas neste trabalho, foram testadas outras 217 amostras pertencentes à CMLB, totalizando 348 linhagens de fungos analisadas.

3.2. Pré-seleção qualitativa de linhagens produtoras de tanase ou lipase em placa de Petri

Dentre as linhagens testadas para produção de lipase, 26 linhagens (7,5 %) apresentaram formação de halo de cristais de cálcio ao redor da colônia (Figura 14), indicando a possível produção de lipase pelo fungo.

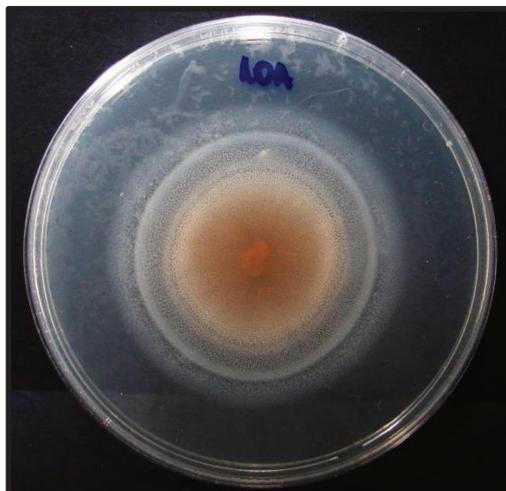


Figura 14. Halo opaco ao redor da colônia, formado pela deposição de cristais de cálcio, demonstrando a possível ação da lipase.

Das linhagens positivas, nove linhagens foram obtidas da região da Mata Atlântica. Dentre estas, uma linhagem foi obtida de uma amostra de tronco, três linhagens obtidas de folhas e quatro de frutos, sendo que duas foram isoladas de jaca. As outras 17 linhagens positivas foram provenientes da CMLB.

O diâmetro dos halos e das colônias foi medido para a posterior determinação do IE (Apêndices 7), que variou de 1,2 a 2,9 (Figura 15).

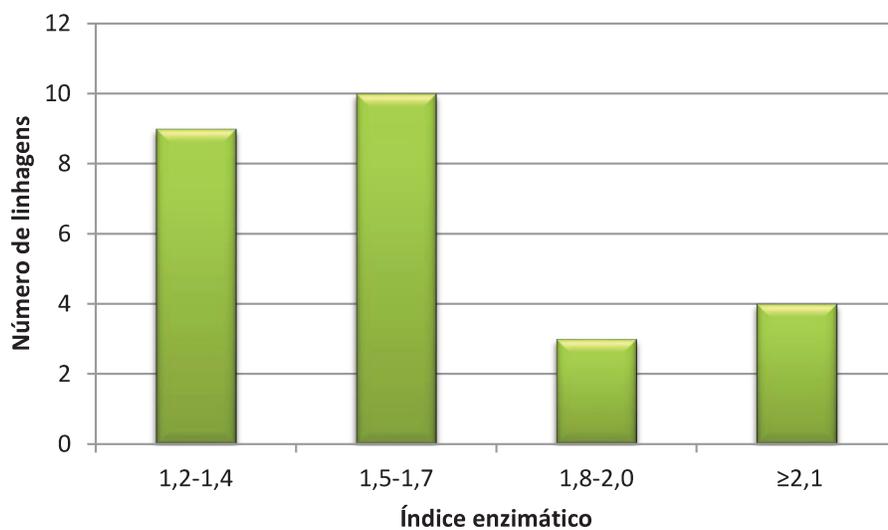


Figura 15. Avaliação da produção de lipase em placa através do índice enzimático: número de linhagens que apresentaram índice enzimático nos determinados intervalos.

Entre as linhagens testadas para a produção de tanase, 105 linhagens (30,2 %) apresentaram formação de halo de hidrólise ao redor da colônia (Figura 16), indicando a ação da tanase.

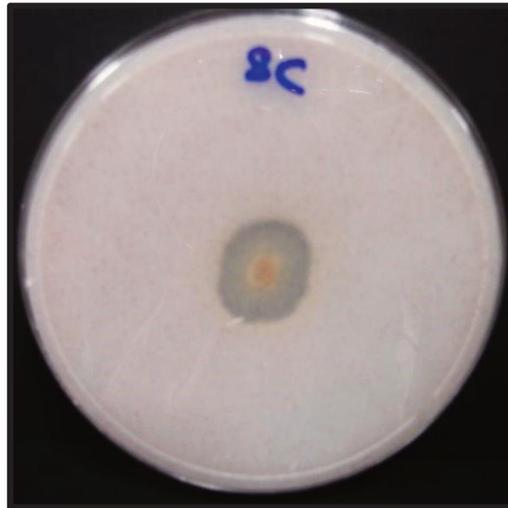


Figura 16. Halo de hidrólise, ao redor da colônia, demonstrando a atividade da tanase.

A partir da relação entre o diâmetro do halo e da colônia foram obtidos os valores de IE (Apêndices 8), que variaram de 1,5 a 9,0 (Figura 17).

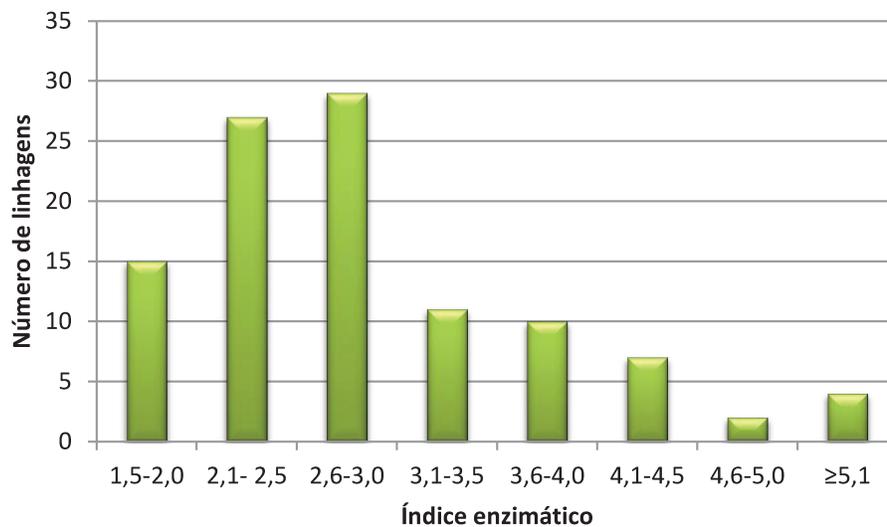


Figura 17. Avaliação da produção de tanase em placa através do índice enzimático: número de linhagens que apresentaram índice enzimático nos determinados intervalos.

Entre as linhagens positivas, 22 foram isoladas da região da Mata Atlântica e cinco foram isoladas de amostras da Região Amazônica. Dentre as linhagens isoladas da região da Mata Atlântica, três foram obtidas de amostras de tronco, quatro de solo, seis de frutos e nove de folhas. Já dentre as linhagens amazônicas, duas foram obtidas de amostras de solo da Ilha do Outeiro, uma de batata, uma de jambu e uma de solo próximo a um pé-de-buriti.

A jaca (*Artocarpus heterophyllus*) mostrou-se um bom ambiente para o desenvolvimento de fungos produtores dessas enzimas, já que 2 linhagens isoladas desta fruta foram pré- selecionadas como potenciais produtoras de lipase (linhagens 38D e 38E) e 1 de tanase (linhagem 38D). A produção de lipase e tanase nesse fruto pode decorrer do fato de a semente de jaca apresentar cerca de 1,1 % de taninos e 6,1 % de ácidos graxos (BELLO, 2010). Foram realizados poucos estudos utilizando esta fruta como fonte para o isolamento de micro-organismos com potencial biotecnológico. Em um estudo realizado por Chiappini e Leite (2004) foram isoladas leveduras silvestres de amostras de jacas degradadas no solo de florestas, e concluiu-se que ela é uma boa fonte natural para o isolamento de leveduras com potencial para produção de aroma de fruta.

Em estudo publicado em 2007, Murugan, Sarawanababu e Arunachalam isolaram 10 linhagens de fungos em efluentes de curtumes e as testaram em meio diferencial para tanase. Nesta pesquisa, 50 % das linhagens avaliadas apresentaram potencial para a produção de tanase. Na figura 18, é possível observar que 35,9 % das linhagens da CMLB, 10,2 % das linhagens provenientes da Região Amazônica e 26,8 % das linhagens obtidas da região da Mata Atlântica mostraram potencial para a produção da tanase. Tais porcentagens foram menores do que a encontrada por Murugan, Sarawanababu e Arunachalam possivelmente devido ao fato de que o ambiente estudado por eles era mais favorável à presença de micro- organismos taninolíticos, devido a grande quantidade de taninos presentes em efluentes de curtumes.

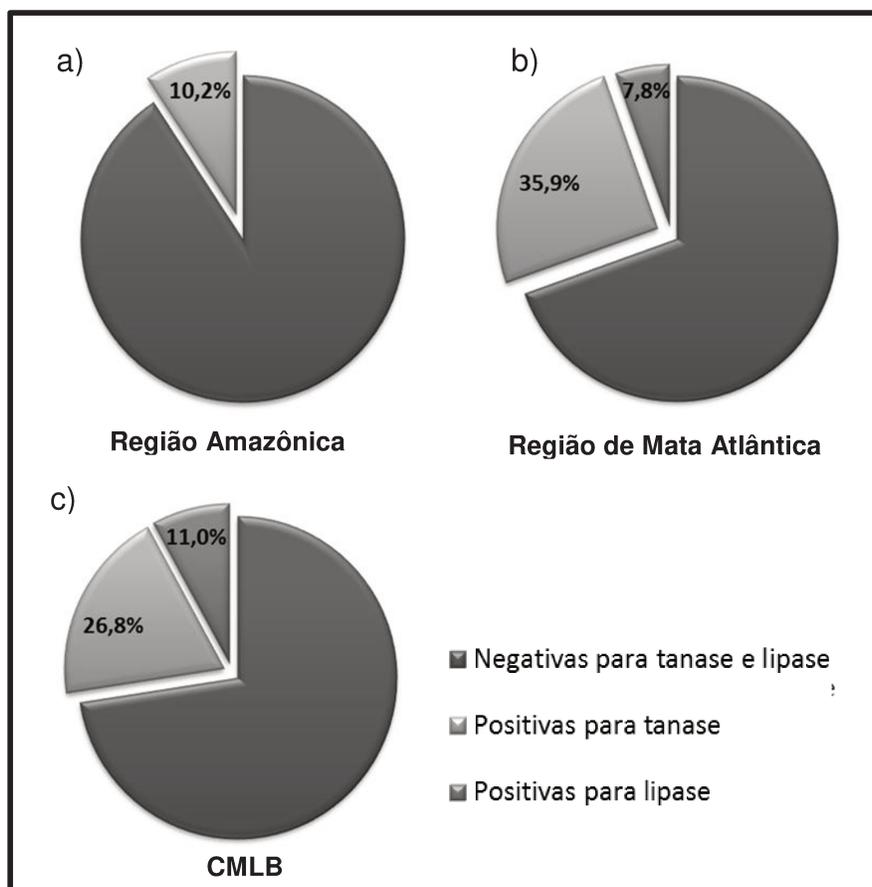


Figura 18. Gráficos mostrando a porcentagem de linhagens de fungos filamentosos positivas para lipase e tanase do total de linhagens (a) isoladas da Região Amazônica, (b) isoladas da região da Mata Atlântica e (c) provenientes da CMLB.

Cardenas e colaboradores (2001) triaram 960 micro-organismos em placa contendo meio de cultivo com azeite de oliva como substrato para identificar potenciais produtores de lipase. Os autores encontraram que 9,6 % das linhagens possuíam potencial para a produção da enzima. No presente trabalho, observou-se que 7,8 % das linhagens da CMLB apresentam potencial para a produção de lipase, já entre as linhagens da região da Mata Atlântica, esse número aumenta para 11,0 %, enquanto que nas linhagens amazônicas não foi encontrada nenhuma linhagem com tal potencial (Figura 18).

Foi possível isolar, de amostras obtidas em florestas tropicais, inúmeras linhagens com potencial para a produção de enzimas extracelulares com aplicação biotecnológica. Vários autores defendem que mesmo com os avanços nos estudos de genética e fisiologia microbiana, os programas tradicionais de triagem para a seleção de micro-organismos naturais continuam sendo um importante campo da biotecnologia (STEELE; STOWERS, 1991; BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992; BUZZIN; MARTINI, 2002). O uso da técnica tradicional de triagem em placa permitiu isolar diversas linhagens com potencial para produção das enzimas lipase e tanase. Além disso, levou à economia de tempo e de reagentes, uma vez que os estudos posteriores de produção das enzimas por FES só foram realizados com as linhagens positivas em placa e não com todas as que foram isoladas.

A triagem de micro-organismos de florestas tropicais para a produção de enzimas industriais tem sido grande nos últimos anos. Buzzini e Martini (2002) avaliaram o potencial biotecnológico de diversas linhagens isoladas de mais de 120 amostras de água, solo, insetos e plantas, coletadas em três florestas tropicais brasileiras (Tijuca, Serra Capivari e Pau de Fome). Os autores revelaram o potencial que as linhagens isoladas de ambientes tropicais apresentam para produção de enzimas extracelulares, em particular nesse estudo, esterases, proteases e lipases.

Lumyong e colaboradores (2002) estudaram fungos endofíticos da floresta tropical do parque nacional *Doi Suthep-Pui* na Tailândia e isolaram linhagens produtoras de celulase, mananase, proteinase e xilanase.

Machado, Matheus e Bononi (2005) estudaram fungos da Mata Atlântica na região da Baixada Santista em São Paulo e isolaram linhagens de fungos com potencial lignolítico. Também em 2005, Tauk-Tornisielo e colaboradores estudaram micro-organismos da Mata Atlântica na Estação Ecologia Juréia-Itatins em São Paulo e isolaram 1 211 linhagens, sendo que 67 eram celulolíticas. Outro estudo, realizado por Willerding e

colaboradores (2011), mostrou o isolamento de 75 linhagens de bactérias lipolíticas da Floresta Amazônica.

3.3. Estudo quantitativo da atividade enzimática

3.3.1. Estudo quantitativo da atividade enzimática da tanase

Dentre as 105 linhagens pré-selecionadas, foram testadas quanto à capacidade de produzir tanase por fermentação em estado sólido todas as linhagens amazônicas positivas (n=5), todas as linhagens da região de Mata Atlântica (n=22) e oito linhagens da CMLB, utilizando como critério para seleção o IE maior que 3,0.

No total, foram testadas 35 linhagens e foram confirmadas 18 linhagens produtoras da enzima tanase extracelular por FES (51,43 %): duas linhagens isoladas da Região Amazônica, 10 linhagens isoladas da região de Mata Atlântica e seis linhagens da CMLB (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade enzimática das linhagens produtoras de tanase por FES.

Linhagem	Atividade enzimática (U/mL)*
255	1,35 ± 0,03 a
31c	0,93 ± 0,05 b
<i>P. variotii</i>	0,83 ± 0,23 b
34a	0,79 ± 0,24 b,c
43	0,79 ± 0,07 b,c
27a	0,72 ± 0,12 b,c,d
13a	0,70 ± 0,02 b,c,d
148	0,69 ± 0,21 b,c,d
14a	0,67 ± 0,10 b,c,d
33a	0,68 ± 0,04 b,c,d
08b	0,43 ± 0,29 c,d,e
1049	0,40 ± 0,05 d,e,f
31a	0,28 ± 0,06 e,f,g
263	0,19 ± 0,04 e,f,g
188	0,12 ± 0,01 e,f,g
64	0,10 ± 0,05 e,f,g
38d	0,04 ± 0,04 f,g
25a	0,02 ± 0,02 g
1817	0,01 ± 0,02 g

* Média da atividade enzimática ± desvio padrão. Letras diferentes representam médias com diferença significativa com p<0,05.

Pode-se observar na tabela 6 que a enzima produzida pela linhagem 255, proveniente da CMLB, apresentou maior atividade enzimática (1,35 U/mL) que a tanase da linhagem de *Paecilomyces variotii* (0,83 U/mL). Já a tanase produzida pela linhagem 31c (0,93 U/mL), isolada da região de Mata Atlântica, possui atividade enzimática estatisticamente igual à atividade enzimática da tanase da linhagem de *Paecilomyces variotii*.

Foi realizada a comparação entre a atividade específica da tanase da linhagem 255 e de *Paecilomyces variotii*. A tanase da linhagem 255 apresentou atividade específica igual a $2,14 \pm 0,04$ U/mg, valor este 34 % maior que a atividade da tanase da linhagem de *Paecilomyces variotii* ($1,41 \pm 0,32$ U/mg). A atividade específica da tanase da linhagem 255 assemelha-se em ordem de grandeza à atividade da tanase de *A. niger* ($3,37 \pm 0,17$ U/mg) produzida também em farelo de trigo no estudo de El-Fouly e colaboradores (2010).

Devido à alta atividade enzimática da tanase produzida pela linhagem 255 decidiu-se seguir com a identificação da linhagem e com a caracterização bioquímica da enzima.

3.3.2. Estudo quantitativo da atividade enzimática da lipase

Todas as 26 linhagens pré-selecionadas foram testadas quanto à capacidade de produzir lipase por fermentação em estado sólido. Dentre as linhagens testadas foram obtidas nove linhagens produtoras da enzima lipase extracelular (34,6 %): duas linhagens isoladas da região de Mata Atlântica e sete linhagens da CMLB (Tabela 7).

Tabela 7. Atividade enzimática das linhagens produtoras de lipase por FES.

Linhagem	Atividade enzimática (U/mL)*
<i>Rhizopus oryzae</i>	30,5 ± 0,5 a
316	18,7 ± 2,9 b
28a	13,0 ± 3,3 b,c
38d	7,3 ± 4,8 c,d
307	4,9 ± 2,4 c,d
406	3,2 ± 0,0 d
374	1,5 ± 2,3 d
264	1,5 ± 0,5 d
458	0,6 ± 0,9 d
143	0,5 ± 0,0 d

* Média da atividade enzimática ± desvio padrão. Letras diferentes representam médias com diferença significativa com $p < 0,05$.

Uma das prováveis explicações para o fato de que nem todas as linhagens pré-selecionadas em placas terem sido capazes de produzir lipase por FES é que o uso de Tween como substrato para lipase em placa pode resultar em falso positivo, uma vez que este pode ser hidrolisado por esterases. Assim, o Tween é utilizado para selecionar linhagens produtoras de lipase, mas não para diferenciá-las. Apesar dessa aplicação do Tween ser criticada, seu uso se faz presente devido à sua capacidade de incorporar-se rapidamente no meio de cultivo e promover ótimo contato entre as células e/ou enzimas e o substrato (SHELLEY; DEETH; MACRAE, 1987). No presente trabalho, o uso de meio sólido com Tween mostrou-se um importante método de pré-seleção, uma vez que 34,6 % das linhagens classificadas como produtoras de lipase em placa também foram capazes de produzir a enzima por fermentação em estado sólido, possibilitando a economia de tempo de reagentes.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Colen, Junqueira e Moraes- Santos (2006) onde 59 linhagens de fungos foram isoladas de solo do cerrado brasileiro. Dessas linhagens, 21 delas foram pré-selecionadas por triagem em placa de

Petri e 11 (52,4 %) foram consideradas boas produtoras de lipase por fermentação submersa e por fermentação em estado sólido.

Pode-se observar na tabela 7 que as enzimas produzidas pela linhagem 316 (18,7 U/mL), proveniente da CMLB, e pela a linhagem 28a (13,0 U/mL), isolada da região de Mata Atlântica, apresentaram alta atividade enzimática.

Griebeler e colaboradores (2011) realizaram a seleção de fungos produtores de lipase por FES de farelo de soja, e as linhagens consideradas boas produtoras tiveram atividade enzimática variando de 10,4 U/mL até 21,9 U/mL. Contensini e colaboradores (2009) otimizaram a produção da lipase de *Aspergillus niger*, através da análise de superfícies de resposta, e alcançaram atividade enzimática de 28,9 U/mL. Rivera-Munoz e colaboradores (1991) estudaram diversos fungos quanto à sua capacidade de produzir lipase, como o *Aspergillus niger* (2,9 U/mL), *Geotrichum candidum* (1,1 e 1,4 U/mL) e diferentes espécies do gênero *Penicillium* (1,7 até 36,5 U/mL). Tais dados da literatura assemelham-se, em ordem de grandeza, aos dados obtidos nesse trabalho.

Em relação à atividade específica, a lipase de *Rhizopus oryzae* apresentou atividade de 68,7 U/mg e a atividade específica da lipase da linhagem 28a foi de 26,0 U/mg. Em estudo realizado em 2006, Mateos Diaz e colaboradores obtiveram lipase de *R. homothallicus* produzida por fermentação em estado sólido com atividade específica de 139,0 (U/mg).

Apesar da atividade enzimática da lipase da linhagem 28a ter sido menor que a atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*, ela foi maior que aquela alcançada por muitos micro-organismos descritos na literatura. Além disso, a lipase da linhagem 28a poderia ter características bioquímicas diferentes que elevariam seu potencial industrial. Com isso, decidiu-se identificar, posteriormente, a linhagem 28a e caracterizar bioquimicamente a lipase produzida por ela.

No presente estudo, o coeficiente de Pearson indicou uma forte e positiva

correlação (Coeficiente de Pearson= 0,96; p=0,000) entre o IE avaliado em placa e a atividade da lipase produzida por fermentação em farelo de trigo, considerando-se as linhagens que apresentaram atividade enzimática maior que 1,0 U/mL (Figura 19).

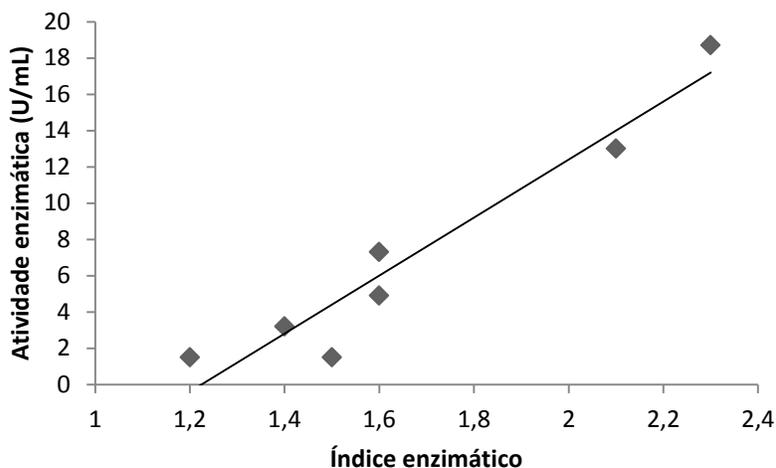


Figura 19. Correlação entre o índice enzimático obtido pelo ensaio em placa de Petri contendo Tween 80 e atividade enzimática medida por titulometria de neutralização.

Resultados conflitantes foram observados no trabalho de Griebeler e colaboradores (2011) no qual foram comparados o IE e a atividade enzimática da lipase obtida por fermentação em farelo de soja. As análises indicaram que a lipase da linhagem RMF2C4 apesar de apresentar a maior atividade hidrolítica utilizando farelo de soja como substrato (21,89 U/mL), apresentou o menor halo de hidrólise (1,17 mm) no meio sólido contendo tributirina. Entretanto as linhagens F0F1, F0F2, CLF1C3, T1F3 e T1F3C2 foram consideradas boas produtoras de lipase em ambos os testes.

Kouker e Jaeger (1987) estudaram bactérias produtoras de lipase em meio de cultivo contendo trioleilglicerol e o corante rodamina B e observaram que a medida do halo de hidrólise correlacionava-se linearmente ($R^2=0,99$) com o logaritmo da atividade de lipase medida por titulometria de neutralização.

Pereira-Meirelles, Rocha-Leão e Sant'Anna (1997) mostraram que os dados

obtidos por método de difusão correlacionou-se bem com os observados pelo método espectrofotométrico utilizando-se p-nitrofenil laurato ($R^2 = 0,946$). Entretanto, autores como Shelley, Deeth e Macrae (1987) argumentam que a difusão de uma proteína em gel ocorre em função da sua concentração e não de sua atividade enzimática, portanto esse método deve ser utilizado apenas para avaliar qualitativamente e não para quantificar a atividade lipolítica.

3.4. Identificação das linhagens selecionadas

3.4.1. Identificação das linhagens produtoras de tanase: linhagem 255 e linhagem 43

A linhagem 255 foi selecionada para identificação por apresentar a mais alta atividade enzimática dentre as linhagens isoladas. Suas características morfológicas permitiram identificá-la como potencialmente pertencente ao gênero *Paecilomyces*. Entre essas características estão a coloração marrom-amarelada, aspecto filamentososo e hifas septadas; a presença de conidióforos, que são ramificações verticais que formam filíades, as quais são grossas em suas bases e gradualmente formam um pescoço longo e delgado; formação de conídios elipsoidais com parede lisa (LACAZ et al.; 1998) (Figura 20).

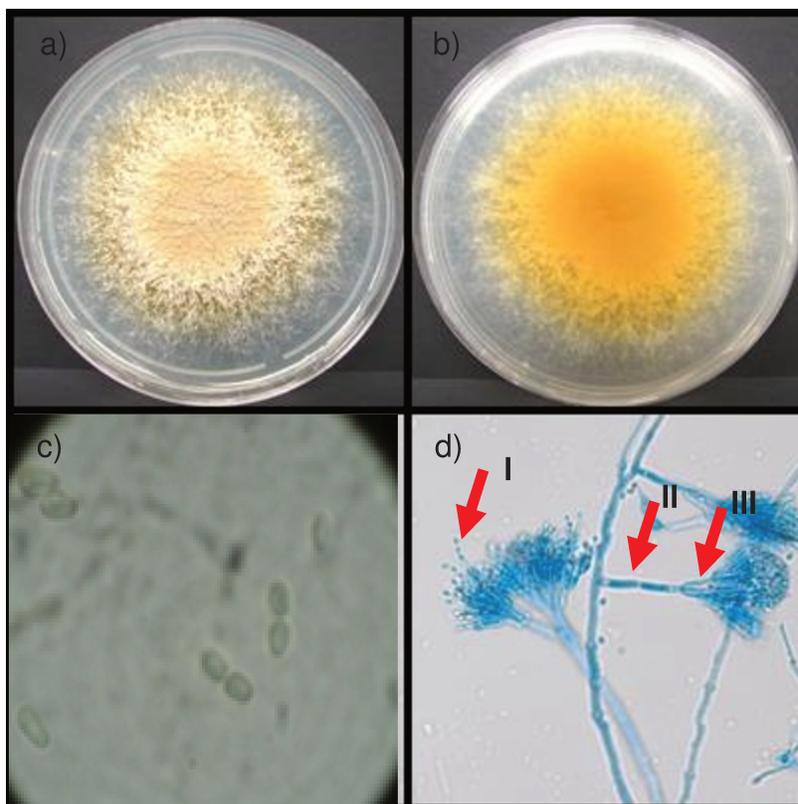


Figura 20. a) Colônia em placa de Petri; b) Reverso da colônia; c) Conídios elipsoidais com 1 000X de aumento; d) Conidióforo com 400X de aumento mostrando as cadeias de conídios (I) e hifas septadas (II) das quais se ramificam filíades (III) indicados por setas vermelhas.

Para confirmar se a linhagem 255 pertencia ao gênero *Paecilomyces* foi realizada análise da sequência da região ITS que permitiu identificar a linhagem 255 como uma linhagem de *Paecilomyces* sp. (Figura 21).

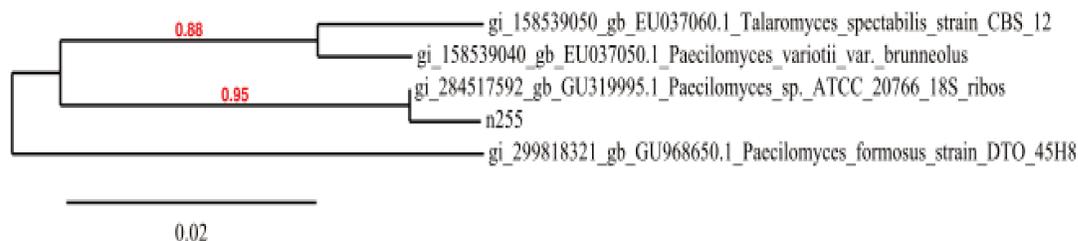


Figura 21. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 255 em relação a espécies do gênero *Paecilomyces*, adotando como grupo externo a espécie *Paecilomyces formosus*. Barra 0,02: número de substituições de nucleotídeos por posição.

A produção de tanase por *Paecilomyces* sp. foi descrita por diversos grupos (MAHENDRAN; RAMAN; KIM, 2006; BATTESTIN; MACEDO, 2007; RAAMAN et al., 2010).

A tanase da linhagem 255 apresentou atividade enzimática de 1,35 U/mL. Battestin e Macedo (2007) reportaram atividade enzimática de 1,5 U/mL para tanase produzida por *Paecilomyces variotii* utilizando resíduo de café e farelo de trigo como substrato. Mahendran, Raman e Kim (2006) produziram tanase de *Paecilomyces variotii* por FES e atingiram atividade enzimática específica de 49,3 U/mL após purificação por precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de troca iônica e de gel filtração.

A linhagem 43 foi escolhida para ser identificada por possuir características morfológicas macroscópicas bastante diferentes da linhagem 255 e das demais linhagens isoladas capazes de produzir tanase, além de apresentar alta atividade enzimática em comparação com os demais micro-organismos produtores.

A linhagem 43 foi considerada potencial representante do gênero *Aspergillus* pois apresentou formação de colônias pretas e filamentosas; hifas regulares, septadas, com bifurcações em ângulo agudo; estrutura de esporulação caracterizada por conidióforos com extremidade dilatada formando a vesícula, de onde se originam as filíades que dão origem aos conídios (LACAZ et al., 1998) (Figura 22).

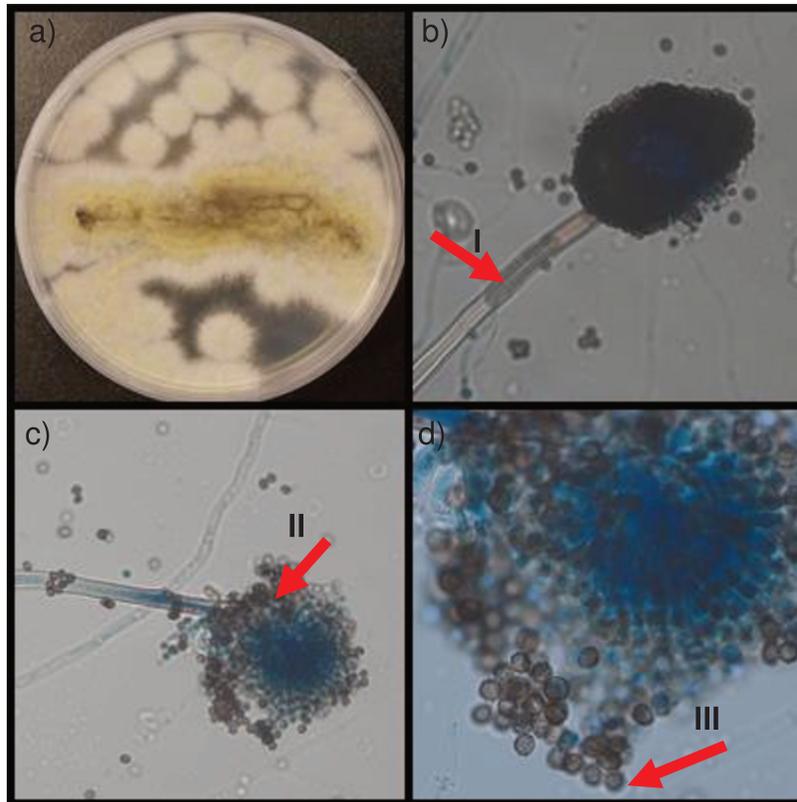


Figura 22. a) Colônias em meio de cultivo PDA; b) Imagem com 400X de aumento da hifa (I) indicada na seta; c) Conidióforo com 400X de aumento mostrando a cabeça conidial (II) indicada na seta; d) Imagem com 1 000X de aumento onde se observa esporo com superfície rugosa (III) indicado na seta.

O estudo do segmento do gene para calmodulina permitiu concluir que a linhagem 43 é uma linhagem de *Aspergillus niger* (Figura 23).

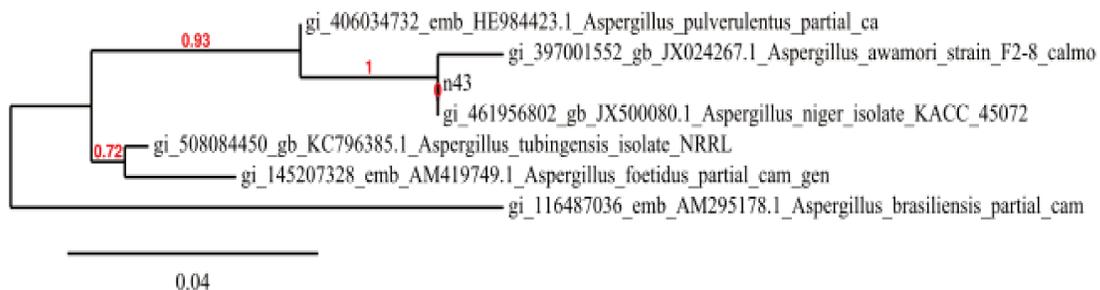


Figura 23. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 43 em relação às espécies do gênero *Aspergillus*, adotando como grupo externo a espécie *Aspergillus brasiliensis*. Barra 0,04: número de substituições de nucleotídeos por posição.

A produção de tanase por micro-organismos do gênero *Aspergillus* foi estudada por diversos autores desde o início do século XX. Estudos atuais mostram o grande potencial de produção de tanase por *Aspergillus* sp. utilizando as mais variadas fontes de cultivo e alcançando altos valores de atividade enzimática.

No estudo de Gonçalves e colaboradores (2013), a produção de tanase por *A. ochraceus* por fermentação de folhas de *Eucalyptus* sp. alcançou atividade enzimática de 0,48 U/mg de substrato. Outro exemplo é o trabalho de Chhokar e colaboradores (2010), no qual após otimização e purificação da tanase de *A. awamori* produzida por FSm, foi alcançada atividade enzimática específica de 9,55 U/mg.

No estudo de Batra e Saxena (2005), a tanase produzida por *Aspergillus niger* através de FSm alcançou atividade enzimática de 1,65 U/mL. Sharma, Bhat e Dawra (1999) analisaram a tanase produzida por *Aspergillus niger* van Tieghem por FSm e a atividade enzimática do extrato enzimático bruto foi de 0,7 U/mg de proteína. Em nosso trabalho, a linhagem de *Aspergillus niger* produziu tanase com atividade enzimática de 0,79 U/mL.

3.4.2. Identificação da linhagem 28a produtora de lipase

A linhagem 28a formou colônias brancas de micélio aéreo. Microscopicamente, observaram-se hifas com alto grau de ramificação e conídios cilíndricos (Figura 24).

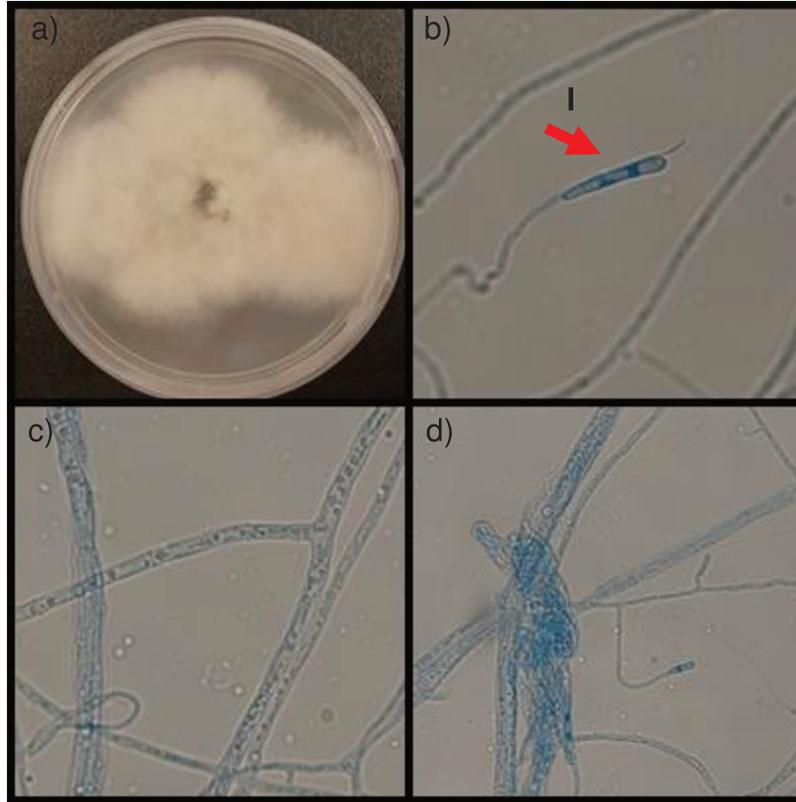


Figura 24. a) Colônia em placa de Petri; b) Conídio cilíndrico (I) (1 000X); c) e d) Hifas ramificadas (400X).

Através da análise da região ITS foi possível identificar a linhagem 28a como pertencente ao gênero *Colletotrichum* (Figura 25). Ademais, as características morfológicas como cor branca, micélio aéreo e conídios cilíndricos corroboram com essa conclusão (CANO; GUARRO; GENÉ, 2004).

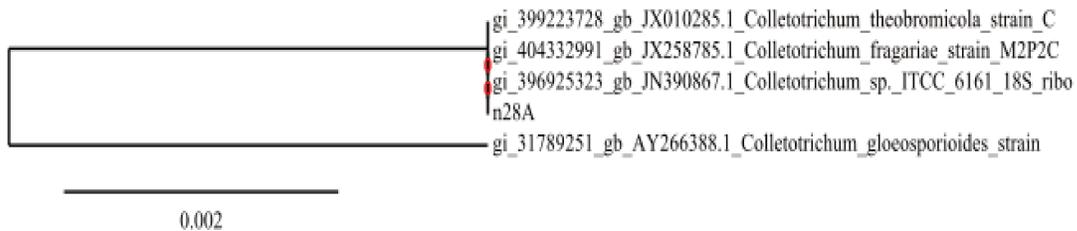


Figura 25. Árvore filogenética gerada por *neighbor joining* comparando a posição da linhagem 28a em relação às espécies do gênero *Colletotrichum*, adotando como grupo externo a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Barra 0,002: número de substituições de nucleotídeos por posição.

São raros os estudos com lipase de *Colletotrichum* sp. Balaji e Ebenezer (2008) otimizaram a produção de lipase por *Colletotrichum gloeosporioides* por FES, utilizando torta de pongamia e alcançaram 2560 U/g de matéria seca. Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) identificaram o *Colletotrichum gloeosporioides* como o maior produtor de lipase alcalina por FES dentre 59 linhagens isoladas de solo do cerrado brasileiro, otimizaram a produção da enzima para 27,7 U/mL e observaram sua capacidade de hidrolisar uma ampla gama de substratos como gordura de porco, óleos naturais e tributirina.

Em nosso trabalho a linhagem de *Colletotrichum* sp. alcançou atividade enzimática igual à 13,0 U/mL. Na figura 25 observa-se que a linhagem 28a, possivelmente, não possui alta similaridade com *Colletotrichum gloeosporioides* (grupo externo). Tal fato é bastante interessante, uma vez que quase todos os estudos com lipase de *Colletotrichum* sp. envolvem a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Entretanto análises morfológicas comparativas seriam necessárias para confirmar tal fato.

Em contraste com os trabalhos de Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) e Balaji e Ebenezer (2008), Amirita e colaboradores (2012) avaliaram a produção de lipase em placa de Petri contendo meio de cultivo preparado conforme proposto por Sierra (1957) e não encontraram atividade lipolítica nos fungos endofíticos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum carssipes*, mas sim em *Colletotrichum falctum*. Os autores propuseram que essa ausência decorreu, provavelmente, do fato de que em alguns fungos endofíticos as enzimas estão inativas para impedir danos ao hospedeiro.

3.5. Caracterização bioquímica das enzimas selecionadas

3.5.1. Caracterização bioquímica da tanase de *Paecilomyces* sp.

A tanase produzida pela linhagem de *Paecilomyces* sp. (linhagem 255) foi

comparada com a tanase da linhagem de *Paecilomyces variotii* já estudada por nosso grupo de pesquisa.

Ambas as enzimas apresentaram comportamento semelhante em relação à temperatura ótima e de estabilidade. A temperatura ótima de atividade foi 60 °C, sendo que a 70°C as enzimas também apresentaram boa atividade enzimática (aproximadamente 85 %) (Figura 26a). No intervalo de temperatura de 20 °C até 60 °C ambas as enzimas mantiveram atividade enzimática acima de 70 % após 30 min (Figura 26b). Na temperatura ótima de atuação das tanases (60 °C), a tanase da linhagem 255 mantém aproximadamente 70 % da atividade inicial.

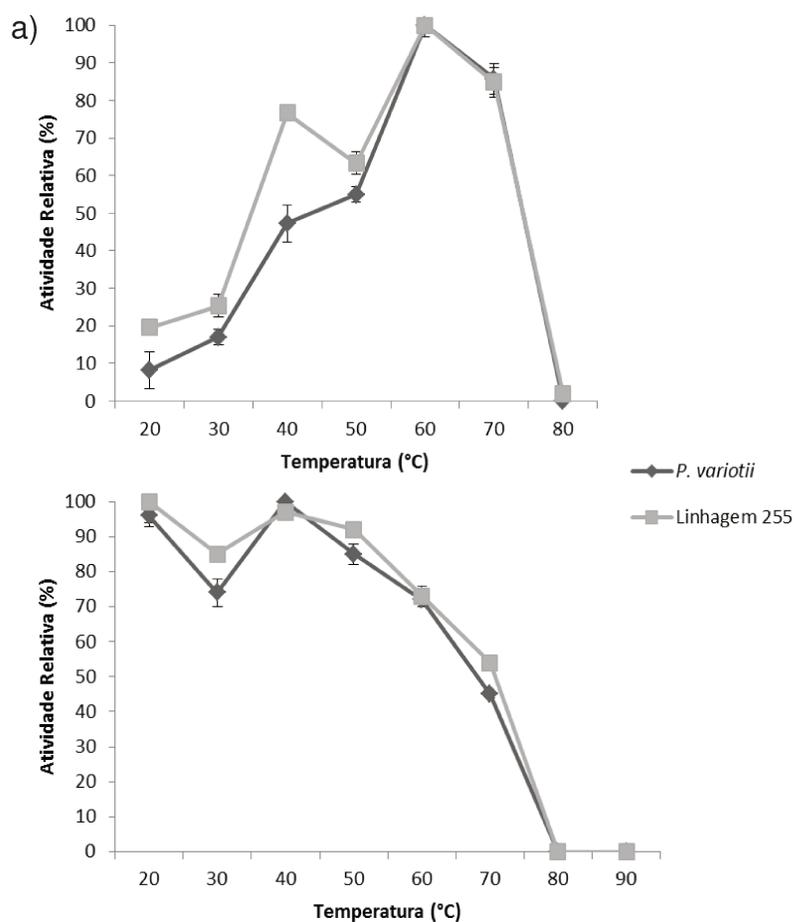


Figura 26. Temperatura ótima de atividade (a) e temperatura de estabilidade (b) da tanase de *Paecilomyces variotii* e da linhagem 255.

Pode-se observar na figura 27a que a tanase da linhagem de *Paecilomyces variotii* possui atividade ótima em pH 5,0 e que a tanase da linhagem 255 possui alta atividade enzimática no intervalo de pH entre 5,0 e 6,0, com atividade máxima em pH 5,5.

As tanases de ambos os micro-organismos mantiveram cerca de 50 % de sua atividade inicial em pH 5,0 e 60 % em pH 5,5, após 24 h de incubação sob refrigeração (Figura 27b).

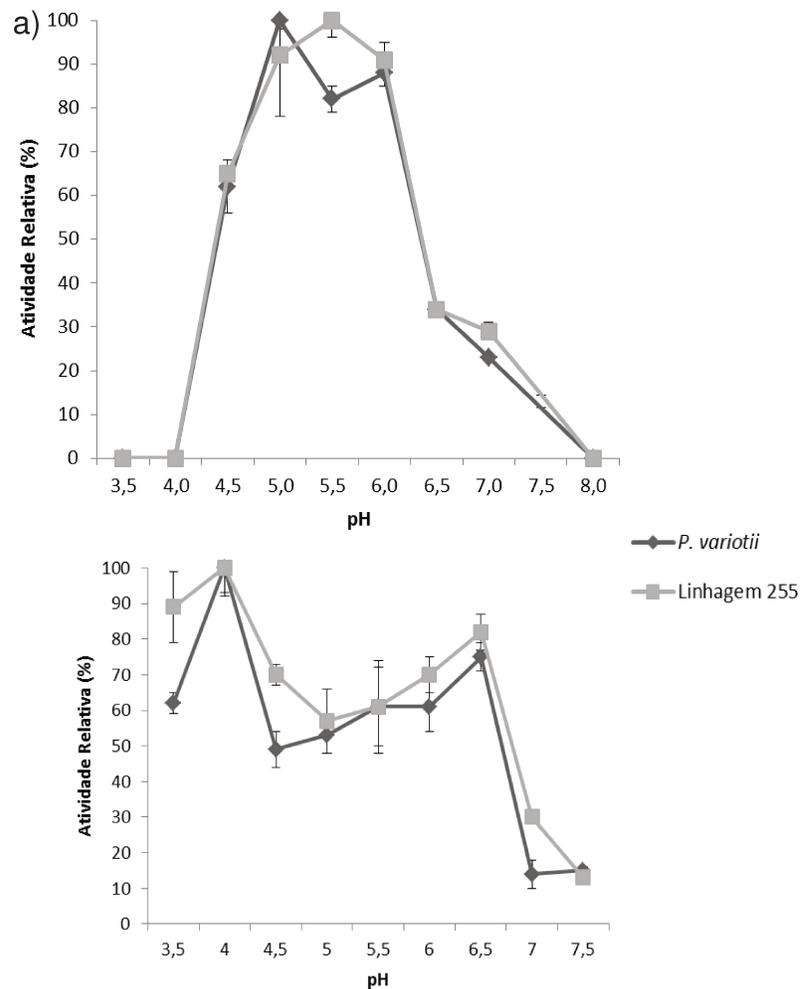


Figura 27. pH ótimo de atividade (a) e pH de estabilidade (b) da tanase de *Paecilomyces variotii* e da linhagem 255.

3.5.2. Caracterização bioquímica da lipase de *Colletotrichum* sp.

As tabelas 8 e 9 mostram o desenho experimental realizado para a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. e de *Rhizopus oryzae*. A lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* apresentou atividade máxima (111,9 U/mL) no ensaio 8 e a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. (27,2 U/mL) no ensaio 1 e nos pontos centrais (ensaios 9 e 10).

Tabela 8. Matriz do DCCR 2² com os valores codificados, reais e resposta (atividade de lipase) para os ensaios de determinação do pH e temperatura ótima de atividade da lipase de *Colletotrichum* sp.

Ensaio	x1	x2	pH	Temperatura (°C)	Atividade de lipase (U/mL)
1	-1	-1	6,6	30,0	27,2 a
2	-1	1	6,6	60,0	10,7 d
3	1	-1	9,4	30,0	11,6 d
4	1	1	9,4	60,0	18,9 b
5	-1,41	0	6,0	45,0	18,0 b,c
6	1,41	0	10,0	45,0	7,9 d
7	0	-1,41	8,0	23,9	23,5 a,b
8	0	1,41	8,0	66,1	12,5 c,d
9	0	0	8,0	45,0	27,2 a
10	0	0	8,0	45,0	27,2 a
11	0	0	8,0	45,0	25,3 a

* Média da atividade enzimática \pm desvio padrão. Letras diferentes representam médias com diferença significativa com $p < 0,05$.

Tabela 9. Matriz do DCCR 2² com os valores codificados, reais e resposta (atividade de lipase) para os ensaios de determinação do pH e temperatura ótima da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Ensaio	x1	x2	pH	Temperatura (°C)	Atividade de lipase (U/mL)
1	-1	-1	4,0	33,0	76,6
2	-1	1	4,0	50,0	85,7
3	1	-1	8,0	33,0	24,4
4	1	1	8,0	50,0	79,3
5	-1,41	0	3,2	41,5	68,4
6	1,41	0	8,8	41,5	64,7
7	0	-1,41	6,0	29,5	75,3
8	0	1,41	6,0	53,5	111,9
9	0	0	6,0	41,5	106,4
10	0	0	6,0	41,5	110,1
11	0	0	6,0	41,5	90,0

Na tabela 10 observa-se que os termos lineares, quadráticos e a interação das variáveis foram significativos para a atividade enzimática da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. Em relação à atividade enzimática da lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* somente o termo quadrático do pH e o termo linear da temperatura apresentaram efeito significativo (Tabela 11).

Tabela 10. Coeficientes de regressão do DCCR 2² para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática da lipase de *Colletotrichum* sp.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	Tcalc	p-valor
Média	26,54	1,12	23,62	<0,0001
pH(L)	-2,70	0,69	-3,91	0,01
pH(Q)	-6,41	0,82	-7,79	0,00
Temperatura (L)	-3,09	0,69	-4,48	0,01
Temperatura (Q)	-3,87	0,82	-4,71	0,01
pH x Temperatura	5,95	0,97	6,11	0,00

*Parâmetros destacados são significativos a 90 % de confiança.

Tabela 11. Coeficientes de regressão do DCCR 2^o para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	Tcalc	p-valor
Média	102,22	8,01	12,77	<0,0001
pH(L)	-7,98	4,91	-1,63	0,16
pH(Q)	-21,34	5,86	-3,64	0,01
Temperatura (L)	14,49	4,91	2,95	0,03
Temperatura (Q)	-7,71	5,86	-1,32	0,25
pH x Temperatura	11,45	6,93	1,65	0,16

*Parâmetros destacados são significativos a 90 % de confiança.

A tabela 12 ilustra a análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo quadrático codificado aos pontos reais. A ANOVA indica que a regressão foi significativa, visto que o F calculado foi maior que o valor tabelado. O coeficiente de múltipla correlação (R^2) indicou que o modelo foi capaz de explicar 97,0 % da variação dos dados experimentais, podendo assim ser utilizado para prever as respostas para atividade ótima de lipase da linhagem 28a nas condições de ensaio avaliadas.

A tabela 13 mostra que o modelo obtido para predição da atividade ótima da lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae*, apresentou coeficiente de múltipla correlação igual a 0,71 e F calculado maior que o valor tabelado. Isso indica que o modelo foi capaz de explicar 71 % da variação e que a regressão foi significativa.

Tabela 12. ANOVA do modelo para a atividade ótima da lipase de *Colletotrichum sp.*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	530,4	5	106,1	28,0	0,001
Resíduos	18,9515	5	3,8		
Total	549,3952	10			

F0,1:5;5=3,45 $R^2=0,97$ $p<0,1$

Tabela 13. ANOVA do modelo para a atividade ótima da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	4417,6	3	1472,5	5,7	0,03
Resíduos	1817,290	7	259,6		
Total	6234,887	10			

F_{0,1:3;7}=3,07 R²=0,71 p<0,1

A equação 1 descreve a atividade enzimática prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas para a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp., e a equação 2 para a de *Rhizopus oryzae*. Onde: x_1 corresponde ao pH e x_2 à temperatura para ambas as equações.

$$(1) \text{ Atividade enzimática (U/mL)} = 26,54 - 2,70x_1 - 6,41x_1^2 - 3,09x_2 - 3,87x_2^2 + 5,95x_1 \cdot x_2$$

$$(2) \text{ Atividade enzimática (U/mL)} = 95,01 - 7,99x_1 - 19,08x_1^2 + 14,51x_2$$

Através da curva de contorno gerada pelo modelo (Figura 28b) pode-se verificar que a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. foi mais ativa na faixa de pH de 6,5 a 7,5 e em temperaturas entre 25 °C e 35 °C. Características semelhantes foram descritas para a lipase purificada de uma linhagem de *Mucor* sp. isolada de fruto da palma, que apresentou pH ótimo igual a 7,0 e temperatura ótima igual a 35 °C.

Já a lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* foi mais ativa na faixa de pH de 5,0 a 6,0 e na faixa de temperatura de 50°C a 55 °C (Figura 28d).

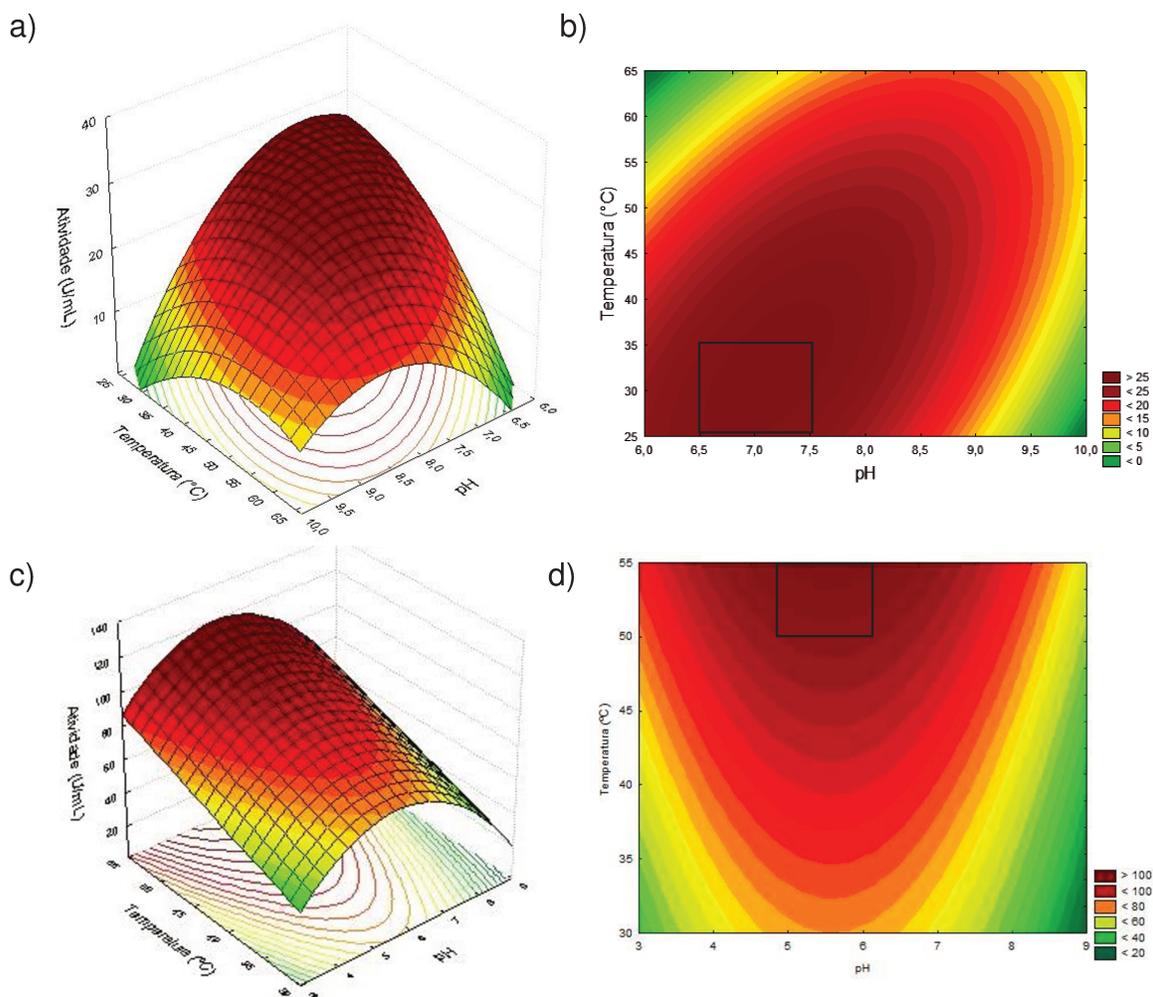


Figura 28. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade enzimática da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp.; e superfície de resposta (c) e curva de contorno (d) para a atividade enzimática da lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* em função do pH e da temperatura.

Não foram encontrados trabalhos acerca das características bioquímicas da lipase de *Colletotrichum* sp. Entretanto, no trabalho de Maccheroni, Araújo e Azevedo (2004) foi comparado, em meio sólido, o efeito do pH do ambiente na secreção de enzimas, entre elas a lipase, por isolados endofíticos, fitopatogênico e entomopatogênicos pertencentes a diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*. Os autores concluíram que no geral, a

lipase estaria ausente em pH ácido e era secretada em pH neutro e alcalino. Tal dado corrobora com os encontrados no presente trabalho, no qual os valores de pH de atividade ótima foram de 6,5 a 7,5.

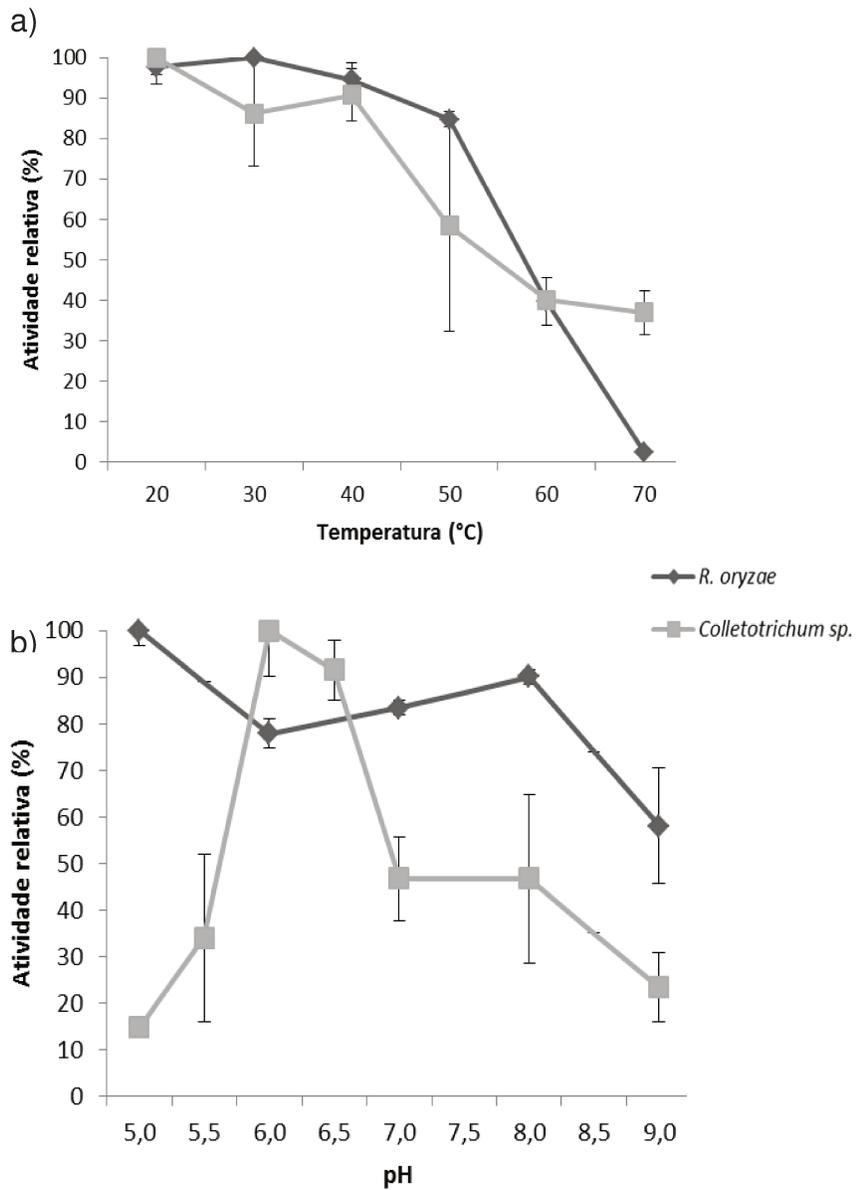


Figura 29. pH (a) e temperatura de estabilidade (b) da lipase de *Rhizopus oryzae* e de *Colletotrichum sp.*

A lipase produzida pela linhagem de *Colletotrichum* sp. manteve mais de 85 % de atividade até a temperatura de 40 °C, enquanto a lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae*, manteve essa taxa até 50 °C (Figura 29a).

Após 24 h de incubação, a lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* apresentou alta estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 8,0. Entretanto, a lipase produzida pela linhagem de *Colletotrichum* sp. apresentou alta estabilidade somente na faixa de pH de 6,0 a 6,5 (Figura 29b).

Na faixa de temperatura que a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. apresenta maior atividade, ela é capaz de manter mais que 85 % de sua atividade. Em relação a faixa de pH ótimo (6,5-7,5), a enzima mantém 95 % de atividade em pH 6,5, mas não apresenta-se estável em valores de pH mais altos.

Foi realizado o estudo dos parâmetros cinéticos (constante de Michaelis- Menten e velocidade máxima) para as lipases produzidas pela linhagem de *Colletotrichum* sp. e pelo modelo *Rhizopus oryzae*.

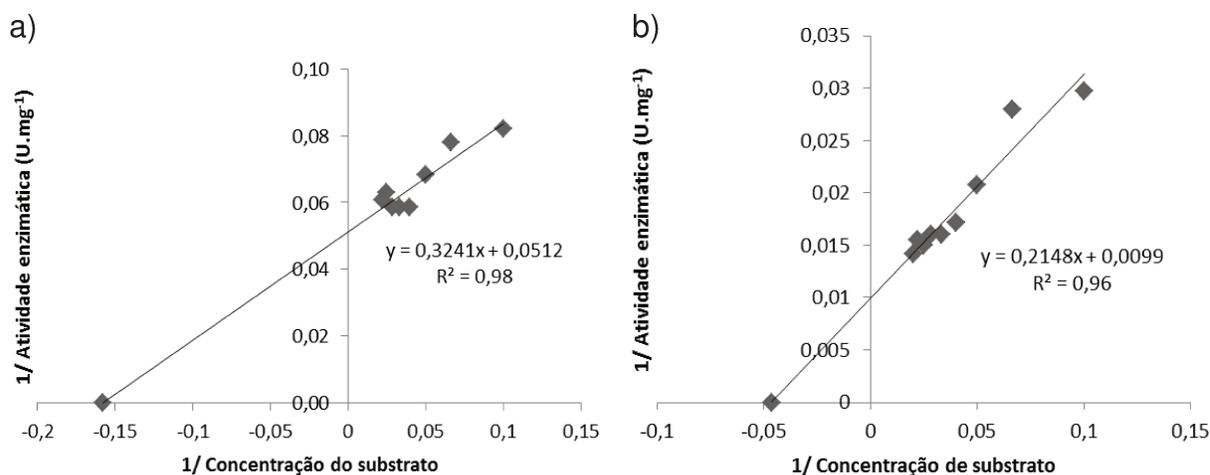


Figura 30. Determinação das constantes Km e Vmáx da lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. (a) e de *Rhizopus Oryzae* (b) de acordo com o modelo gráfico de Lineweaver-Burk (1934).

Através do método de linearização de Lineweaver-Burk (1934), foram obtidos valores estimados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 6,3 % e 19,5 U/mg, respectivamente, para a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. (Figura 30a), e de 21,7 % e 101,0 U/mg para a lipase da linhagem de *Rhizopus oryzae* (Figura 30b). Portanto, é possível concluir que a lipase da linhagem de *Colletotrichum* sp. apresenta maior afinidade pelo substrato (azeite de oliva) quando comparada à lipase de *Rhizopus oryzae*.

4. CONCLUSÕES

- O trabalho propiciou o isolamento de 131 linhagens de fungos filamentosos e 109 linhagens de leveduras, que foram depositadas na CMLB e podem ser utilizadas em uma série de novos estudos.
- Foram isoladas 9 linhagens com potencial para produção de lipase e 18 linhagens com potencial para produzir tanase por FES.
- Altas atividades enzimáticas foram encontradas. Tanases produzidas pelas linhagens 255 e 31c apresentaram atividade enzimática de 1,35 U/mL e 0,93 U/mL, respectivamente. Em relação à produção de lipases, as enzimas produzidas pelas linhagens 316 (18,7 U/mL) e 28a (13,0 U/mL) alcançaram as maiores atividades enzimáticas.
- A linhagem 43, produtora de tanase, foi identificada como pertencente à espécie *Aspergillus niger*. A linhagem 255, também produtora de tanase, foi classificada como representante do gênero *Paecilomyces* sp. Esta enzima teve atividade específica igual a 2,14 U/mg; pH e temperatura ótima de atividade de 5,5 e 60 °C, respectivamente; pH de estabilidade de 3,5 a 4,0 e temperatura de estabilidade de 20 °C até 60 °C .
- A linhagem de *Colletotrichum* sp. isolada da região de Mata Atlântica apresentou atividade específica de 25,97 U/mg; Km= 6,3 %; Vm= 19,5 U/mg; pH ótimo de atividade de 6,5 a 7,0 e temperatura ótima de atividade de 25 °C a 35 °C; pH de estabilidade de 6,0 a 6,5 e temperatura de estabilidade de 20 °C a 40 °C.
- As linhagens de *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Colletotrichum* sp. foram depositadas na CBMAI onde poderão ser acessadas para estudos de otimização de produção, de determinação do mecanismo de ação e de aplicação.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a identificação dos demais fungos filamentosos que também apresentaram potencial para a produção de tanase e lipase.
- Avaliar o potencial dos micro-organismos isolados para produção de outras enzimas industriais e de compostos bioativos.
- Aprofundar os estudos de caracterização bioquímica avaliando, por exemplo, possíveis inibidores ou ativadores das enzimas.
- Realizar a otimização da produção e purificação das enzimas.
- Avaliar a aplicação das enzimas selecionadas em processos de interesse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. et al. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 968-975, 2002.

ABOUBAKR, H.A.; EL-SAHN, M.A.; EL-BANNA, A.A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 559-567, 2013.

AGGELOPOULOS, T. et al. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710-716, 2014.

AGUILAR, C. et al. Oxalate Oxidase from *Ceriporiopsis subvermispora*: Biochemical and Cytochemical Studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, p. 275-282, 1999.

AGUILAR, C.N. et al. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 565-570, 2001.

AGUILAR, C.N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.

ALKAN, H. et al. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 2, p. 183-192, 2007.

AMIRITA, A. et al. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 13, 2012.

ANBU, P. et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine.

BioMed Research International, v. 2013, p. 204014, 2013.

BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K.C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 949-953, 2005.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

BARROS, M.C.; FLEURI, F.L.; MACEDO, G.A. Seed lipases: sources, applications and properties: A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BATRA, A.; SAXENA, R.K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1553-1557, 2005.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.

BELLO, M. O. et al. Studies on the chemical compositions and anti-nutrients of some lesser known Nigeria fruits. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3972-3979, 2008.

BELMARES, R. et al. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 857-864, 2004.

BENIWAL, V. et al. Production of tannase through solid state fermentation using Indian Rosewood (*Dalbergia Sissoo*) sawdust- a timber industry waste. **Annals of Microbiology**, p. 1-8, 2012.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOADI, D.K.; NEUFELD, R.J. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7, p. 590-595, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRADDOO S.; GUPTA R.; SAXENA R.K. Screening of extracellular tannase-producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, p. 325-330, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRASIL. Medida provisória nº. 2186-16/2001, 23 de agosto de 2001. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm. Acesso em: 29 set. 2013.

BROZZOLI, V. et al. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource technology**, v. 100, n. 13, p. 3395-3402, 2009.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-246, 1992.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64,

n. 3, p. 573-606, 2000.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological identification of Colletotrichum species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2450-2454, 2004.

CARDENAS, F. et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, n. 4, p. 111-123, 2001.

CHAPLA, D. et al. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 361-369, 2010.

CHATURVEDI, M. et al. Isolation of lipase producing bacteria from oil contaminated soil for the production of lipase by solid state fermentation using coconut oil cake. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 585-594, 2010.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Biotechnological advances and challenges of tannase: An overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 445-459, 2012.

CHHOKAR, V. et al. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

CHIAPPINI, C.C.J.; LEITE, S.G.F. Screening of yeasts for the production of the fruit aroma: sensory evaluation by comparative tests. **Alimentaria**, n. 357, p. 101-104, 2004.

COLEN, G; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.

COLLA, L.M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010.

CONTESINI, F.J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3, p. 163-171, 2010.

CONTESINI, F.J. et al. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 563-571, 2009.

CORDOVA, J. et al. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 1998.

COURI, S. et al. Comparação entre os tratamentos com tanase e com geleatina para clarificação do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 41-54, 2005.

D'ANNIBALE, A. et al. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

DOMINGUEZ, A. et al. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 15, p. 1225-1229, 2003.

DEREEPER A. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist: Nucleic Acids Res. 2008. Disponível em:
<<http://www.phylogeny.fr/version2/cgi/index.cgi>>. Acesso em: 07 dez. 2013.

EL-FOULY, M.Z. et al. Biosynthesis and characterization of *Aspergillus Niger* AUMC 4301 tannase. **Journal of American Science**, v. 6, n. 12, p. 709-721, 2010.

EI-MANSI, E.M.T. et al. **Fermentation Microbiology and Biotechnology**. 2ed. Londres: Taylor & Francis, 2006. 576p.

ERTUĞRUL, S.; DÖNMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 720-724, 2007.

FLEURI, L.F. et al. Exploration of microorganisms producing bioactive molecules of industrial interest by solid state fermentation. In: LIMA, G.P.; VIANELLO, F. **Food Quality, Safety and Technology**. Vienna: Springer, 2013. p. 147-161.

FORSTER-CARNEIRO, T. et al. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78-88, 2013.

GARLAPATI, V.K.; BANERJEE, R. Optimization of lipase production using differential evolution. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 2, p. 254-260, 2010.

GAYEN, S; GHOSH, U. Effect of carbon compounds and metal ions on the production of tannase by *Penicillium notatum* NCIM 923 utilizing agri-horticultural wastes by solid state fermentation. **Journal of Mycopathological Research**, v. 50, n. 1, p. 67-71, 2012.

GODOY, M.G. et al. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945-953, 2011.

GOMBERT, A.K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 85-90, 1999.

GONÇALVES, H.B. et al. Short Communication: Plant leaves as alternative substrates for

tannase production by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Emmericela nidulans* under solid-state fermentation. **Advances in Biological Research**, v. 7, n. 6, p. 296-300, 2013.

GOPINATH, S.C.B. et al. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy Industry. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GRAMINHA, E.B.N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1, p. 1-22, 2008.

GRIEBELER, N. et al. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578-586, 2011.

GUILHOTO, J.J.M. et al. A importância da agricultura familiar no Brasil e em seus estados. Brasília: NEAD, 2007.

GUTARRA, M. L. E et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.

HAMDY, H.S.; FAWZY, E.M. Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, n. 4, p. 7441, 2012.

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

HARVEY, A.L. et al. Current strategies for drug discovery through natural products. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 559-568, 2010.

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

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 9-18, 2004.

HERNES, P.J.; HEDGES, J.I. Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 68, n. 6, p. 1293-1307, 2004.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HOWSON, S.J.; DAVIS, R.P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 5, p. 377-382, 1983.

IMANDI, S.B.; KARANAM, S.K.; GARAPATI, H.R. Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 115-121, 2010.

IQBAL, H.; KAPOOR, A. Culture conditions for the production of tannase from *Trichoderma harzianum* MTCC 10841. **International Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 10, p.584-595, 2012.

IWAMOTO, K. et al. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 269-277, 2008.

JANA, A. et al. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1080-1083, 2012 (a).

JANA, A. et al. Tannase production by *Penicillium purpurogenum* paf6 in solid state fermentation of tannin-rich plant residues following ovat and rsm. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1254-1269, 2012 (b).

JARVIS, G.N.; THIELE, J.H. Qualitative Rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 29, n. 1, p. 41-47, 1997.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1552-1558, 2011.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KAR, B.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2000.

KAWAKUBO, J. et al. Screening for gallic acid-producing microorganisms and their culture conditions. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 875-877, 1991.

KEMPKA, A.P. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

KHANBABAEE, K.; REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M.P.; KLIBANOV, A.M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7072-7076, 1985.

KIRK, P.M. et al. **Dictionary of the Fungi**, Wallingford: CABI, 2008. 784p.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242p.

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

KUMAR, A.R.; KANWAR, S. Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 13-27, 2012.

KUMAR, A.R.; SINGH, M. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 447-453, 1984.

LACAZ, C.S. et al. **Guide of identification: fungi, actinomycetales, algas of physician interest**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

LIMA, U.A. et al. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, 616p., 2001.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LINKO, Y. et al. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 41-50, 1998.

LONGO, M.A.; SANROMÁN, M.A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

LOPES, D.B. **Comparação do perfil das lactonas produzidas por biotransformação microbiana e biocatálise enzimática a partir dos óleos de mamona e linhaça**. 2013. 211p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campina. 2013.

LOPES, D.B.; DUARTE, M.C.T.; MACEDO, G. A. Biosynthesis of oleyl oleate wax ester by non-commercial lipase. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1203-1209, 2011.

LUMYONG, S. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1109-1112, 2002.

MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases biocatalysis in the production of flavor esters. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 115-119, 1997.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M.; RODRIGUES, M.I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 687-693, 2004.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 246-252, 2005.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193-218, 1985.

MADEIRA JR, J. V.; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state

fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7343-7348, 2011.

MADEIRA JR, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 477-482, 2012.

MAHADIK, N.D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

MAHENDRAN B.; RAMAN N., KIM D.J. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 444-450, 2006.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MATEOS DIAZ, J.C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

MENEZES, J.P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma spp.*(biocontrolador) e *Fusarium oxysporum f. sp. Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MIRANDA, O.A. et al. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, n. 2, p. 145-147, 1999.

MOHAPATRA, P.K.D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1462-1467, 2007.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS biology**, v. 9, n. 8, p. 1001127, 2011.

MURUGAN, K.; SARAVANABABU, S.; ARUNACHALAM, M. Screening of tannin acyl hydrolase (EC 3.1. 1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 946-949, 2007.

OECD- Organization for economic co-operation and development. Agricultural Policies in OECD Countries: At a Glance. Report, 2010.

ORDOÑEZ, R.M. et al. Production of tannase from wood-degrading fungus using as substrate plant residues: purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 2325-2333, 2011.

PALMA, M.B. et al. Lipase Production by *Penicillium testricum* Using Solid Waste of Industrial Babassu Oil Production as Substrate. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 2000. p. 1137-1145.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PAQUES, F.W. et al. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 20-27, 2008.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARANTHAMAN, R. et al. Biosynthesis of tannase and simultaneous determination of phenolic compounds in *Aspergillus niger* fermented paddy straw by HPLC. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 4, p. 93-97, 2009.

PARANTHAMAN, R. et al. Optimization of various culture media for tannase production in submerged fermentation by *Aspergillus flavus*. **Advances in Biological Research**, v. 3, n. 1-2, p. 34-39, 2009.

PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; SINGARAVADIVEL, K. Comparative study on the suitability of different substrates for Tannin Acyl Hydrolase production using *Aspergillus oryzae*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 36, p. 36-42, 2009.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; SANT'ANNA JR, G.L.A stable lipase from *Candida lipolytica*. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 1997. p. 73-85.

PERINBAM, K. et al. Production of enzyme tannase by solid state fermentation using tamarind seed powder. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, v. 6, n. 1, p. 209-214, 2009.

PINTO, G.A.S. et al. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 24-26, 2001.

POLITZER, K; BON, E.P.S. **Enzimas industriais e especiais**. Rio de Janeiro: CGE. Report, 2006.

PRASAD, D. et al. Advances in production and characteristic features of microbial tannases: An Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 145-165, 2012.

PRASAD, D. et al. Utilization of bahera fruits for production of tannase and gallic acid by *Aspergillus heteromorphus* MTCC 5466 and synthesis of propyl gallate thereof. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 119-128, 2011.

PUROHIT, J.S. et al. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 795-801, 2006.

QIANG, H. et al. Evaluation of environmental impact of typical leather chemicals. Part III: biodegradability of vegetable tannin extracts by activated sludge. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 92, n. 3, p. 103-106, 2008.

RAEDER, U.; BRODA, P. Comparison of the lignin-degrading white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Sporotrichum pulverulentum* at the DNA level. **Current Genetics**, v. 8, n. 7, p. 499-506, 1984.

RAAMAN, N. et al. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1033-1039, 2010.

REDDY, S. B.; RATHOD, V. Gallic acid production and tannase activity of *Penicillium purpurogenum* stoll employing agrobases wastes through solid state fermentation: Influence of carbon and nitrogen sources. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 59-62, 2012.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 237-250, 2009.

RENOVATO, J. et al. Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 382-395, 2011.

RIBEIRO, B.D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, 16p., 2011.

RIGO, E. et al. Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. **Industrial Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 119-126, 2009.

RIVERA, I. et al. Lipase from *Carica papaya* latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (*R*, *S*)-2-bromophenylacetic acid octyl ester. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 40, p. 5523-5526, 2013.

RIVERA-MUNOZ, G. et al. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 277-280, 1991.

SALIHU, A. et al. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 66-73, 2011.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224-230, 2010.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513, 1958.

SARROUH, B. et al. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, p. 2, 2012.

SCHONS, P. et al. Immobilization of *Paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 3, p. 211-219, 2011.

SELWAL, M.K. et al. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 374-387, 2011.

SHARMA, N.K. et al. Production of tannase under solid state fermentation and its application in detannification of guava juice. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 281-290, 2014.

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

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; DAWRA, R.K. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 673-677, 1999.

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; DAWRA, R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 85-89, 2000.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 3, p. 123-137, 1987.

SHERIEF, A.A.; EL-TANASH, A.B.; NOUR, A. Optimization of tannase biosynthesis from two local *Aspergilli* using commercial green tea as solid substrate. **Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 78-85, 2011.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA, M.F. et al. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 2, p. 145-152, 2011.

SIMPSON, B.K.; RUI, X.; KLOMKLAO, S. **Food Biochemistry and Food Processing**. 2ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012. 912p.

SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SINGHANIA, R.R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGLETON, V.L. Tannins and the qualities of wines. **Plant Polyphenols**, v. 59, p. 859-880, 1992.

SPERANZA, P.; MACEDO, G.A. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1699-1706, 2012.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 89-106, 1991.

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 219-224, 2008.

TAUK-TORNISIELO, S.M. et al. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TOMMASO, G. et al. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473-1481, 2011.

TORRADO, A.M. et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 394-409, 2011.

TRAN, D.N.; BALKUS JR, K.J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **Acs Catalysis**, v. 1, n. 8, p. 956-968, 2011.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

UNPE- United Nations Environment programme. Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource – Compendium of Technologies. Report, 2009.

VARDANEGA, R. et al. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 461-465, 2010.

WANG, F. et al. Tea stalks- a novel agro-residue for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* JMU-TS528. **Annals of Microbiology**, p. 1-8, 2012.

WILLERDING, A.L. et al. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

WIRSENIUS, S.; AZAR, C.; BERNDES, G. How much land is needed for global food production under scenarios of dietary changes and livestock productivity increases in 2030?. **Agricultural Systems**, v. 103, n. 9, p. 621-638, 2010.

WU, X.Y. et al. Research on conditions of solid-state fermentation and characters of tannase by *Aspergillus Niger* B0201 with Gallnut. **Advanced Materials Research**, v. 236, p. 1029-1038, 2011.

YAO, D. et al. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of biodegradable polyester containing l-malic acid unit in solvent system. **Journal of applied polymer science**, v. 120, n. 2, p. 1114-1120, 2011.

APÊNDICES

Apêndice 1. Linhagens de fungos filamentosos isoladas da Região Amazônica

Tabela 1. Número sequencial das linhagens de fungos filamentosos e origem da amostra Amazônica da qual foram obtidas.

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
1049	Pé de buriti	1444	Açaí
1020	Pé de buriti	1448	Açaí
1029	Pé de buriti	1502	Batata
1146	Pupunha	1507	Batata
1203	Araçá	1512	Batata
1204	Araçá	1534	Batata
1205	Araçá	1539	Batata
1206	Araçá	1628	Casa de Castanha
1208	Araçá	1630	Casa de Castanha
1215	Araçá	1635	Casa de Castanha
1221	Araçá	1638	Casa de Castanha
1222	Araçá	1643	Casa de Castanha
1223	Araçá	1701	Jambu
1227	Araçá	1719	Jambu
1232	Araçá	1737	Jambu
1240	Araçá	1747	Jambu
1245	Araçá	1811	Ilha do Outeiro
1310	Jambu	1817	Ilha do Outeiro
1313	Jambu	1824	Ilha do Outeiro
1326	Jambu	1836	Ilha do Outeiro
1331	Jambu	1909	Rio da UFPA
1333	Jambu	1914	Rio da UFPA
1342	Jambu	1916	Rio da UFPA
1425	Açaí	1918	Rio da UFPA
1441	Açaí		

Apêndice 2. Linhagens de leveduras isoladas da Região Amazônica

Tabela 2. Número sequencial das linhagens de leveduras e origem da amostra Amazônica da qual foram obtidas.

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
1011	Pé de buriti	1541	Batata
1019	Pé de buriti	1614	Casa de Castanha
1024	Pé de buriti	1626	Casa de Castanha
1132	Pupunha	1627	Casa de Castanha
1135	Pupunha	1628	Casa de Castanha
1204	Araçá	1631	Casa de Castanha
1205	Araçá	1639	Casa de Castanha
1206	Araçá	1710	Jambu
1207	Araçá	1717	Jambu
1209	Araçá	1718	Jambu
1215	Araçá	1729	Jambu
1220	Araçá	1810	Ilha do Outeiro
1222	Araçá	1833	Ilha do Outeiro
1223	Araçá	1837	Ilha do Outeiro
1234	Araçá	1902	Rio da UFGA
1238	Araçá	1903	Rio da UFGA
1308	Jambu	1913	Rio da UFGA
1425	Açaí	1916	Rio da UFGA
1430	Açaí	1921	Rio da UFGA
1436	Açaí	1940	Rio da UFGA
1512	Batata		

Apêndice 3. Linhagens de fungos filamentosos isoladas da região de Mata Atlântica

Tabela 3. Número sequencial das linhagens de fungos filamentosos e origem da amostra da região de Mata Atlântica da qual foram obtidas.

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
02a	Folhas	27a	Solo
03a	Folhas	27b	Solo
04a	Folhas	28a	Fruta
04b	Folhas	29a	Solo
04c	Folhas	31a	Solo
05a	Folhas	31b	Solo
06a	Tronco	31c	Solo
06b	Tronco	32a	Tronco
06c	Tronco	33a	Folhas
06d	Tronco	33b	Folhas
06e	Tronco	33c	Folhas
07a	Folhas	34a	Folhas
08a	Folhas	35a	Folhas
08b	Folhas	35b	Folhas
09a	Solo	35c	Folhas
10a	Tronco	36a	Folhas
10b	Tronco	36b	Folhas
10c	Tronco	36c	Folhas
11a	Fruta	37a	Folhas
11b	Fruta	38a	Jaca
11c	Fruta	38b	Jaca
11d	Fruta	38c	Jaca
11e	Fruta	38d	Jaca
11f	Fruta	38e	Jaca
13a	Fruta	39a	Fruta
14a	Fruta	40a	Folhas
14b	Fruta	40b	Folhas
14c	Fruta	44a	Folhas
16a	Folhas	44b	Folhas
17a	Folhas	44c	Folhas
17b	Folhas	44d	Folhas
18a	Folhas	44e	Folhas
18b	Folhas	44f	Folhas
21a	Tronco	44g	Folhas
21b	Tronco	45b	Folhas
23a	Solo	46a	Tronco
23b	Solo	49a	Folhas
24a	Fruta	49b	Folhas
24b	Fruta	49c	Folhas
25a	Fruta	50a	Folhas
25b	Fruta	50b	Folhas

Apêndice 4. Linhagens de leveduras isoladas da região de Mata Atlântica

Tabela 4. Número sequencial das linhagens de leveduras e origem da amostra da região de Mata Atlântica.

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
01A	Fruta	28B	Fruta
01B	Fruta	29A	Solo
03A	Folhas	29B	Solo
03B	Folhas	29E	Solo
04A	Folhas	31B	Solo
04B	Folhas	31D	Solo
04C	Folhas	32B	Tronco
05A	Folhas	32C	Tronco
07A	Folhas	32D	Tronco
07B	Folhas	33A	Folhas
08A	Folhas	33B	Folhas
08B	Folhas	33C	Folhas
10A	Tronco	34A	Folhas
10B	Tronco	35A	Folhas
11A	Fruta	35B	Folhas
12A	Solo	36A	Folhas
12C	Solo	37A	Folhas
13A	Fruta	39A	Fruta
14A	Fruta	40B	Folhas
14B	Fruta	41A	Fruta
15A	Fruta	41B	Fruta
16A	Folhas	41C	Fruta
17A	Folhas	41D	Fruta
17B	Folhas	45A	Folhas
17C	Folhas	45B	Folhas
21A	Tronco	45C	Folhas
23A	Solo	46A	Tronco
23B	Solo	46B	Tronco
23C	Solo	47A	Folhas
26B	Semente	47C	Folhas
26C	Semente	47D	Folhas
27A	Solo	48A	Folhas
27B	Solo	50A	Folhas
27C	Solo	50B	Folhas

Apêndice 5. Caracterização morfológica macroscópica das linhagens de fungos filamentosos isoladas da Região Amazônica

Tabela 5. Características morfológicas dos micro-organismos isolados da Região Amazônica. *p.d.: pigmento difundido no meio

Linhagem	Origem	Morfologia da Colônia		
		Cor	Textura	p.d.*
1049	Pé de buriti	branco	algodonado	ausente
1020	Pé de buriti	verde	pulverulento	ausente
1029	Pé de buriti	branco	aveludado	ausente
1146	Pupunha	cinza	aveludado	ausente
1203	Araçá	cinza	pulverulento	ausente
1204	Araçá	rosa	cremoso	ausente
1205	Araçá	branco	cremoso	ausente
1206	Araçá	branco	cremoso	ausente
1208	Araçá	marrom	pulverulento	ausente
1215	Araçá	creme	cremoso	ausente
1221	Araçá	branco	cremoso	ausente
1222	Araçá	creme	cremoso	ausente
1223	Araçá	marrom	pulverulento	ausente
1227	Araçá	branco	aveludado	ausente
1232	Araçá	preto	aveludado	ausente
1240	Araçá	verde	aveludado	ausente
1245	Araçá	verde	aveludado	ausente
1310	Jambu	creme	cremoso	ausente
1313	Jambu	verde	pulverulento	ausente
1326	Jambu	preto	poroso	ausente
1331	Jambu	verde	pulverulento	ausente
1333	Jambu	cinza	pulverulento	ausente
1342	Jambu	branco	cremoso	ausente
1425	Açaí	branco	aveludado	ausente
1441	Açaí	marrom	pulverulento	ausente
1444	Açaí	verde	pulverulento	ausente
1448	Açaí	branco	aveludado	ausente
1502	Batata	cinza	pulverulento	ausente
1507	Batata	branco	cremoso	ausente
1512	Batata	cinza	poroso	ausente
1534	Batata	verde claro	aveludado	ausente
1539	Batata	marrom	pulverulento	ausente
1628	Casa de Castanha	cinza	pulverulento	ausente
1630	Casa de Castanha	cinza	poroso	ausente
1635	Casa de Castanha	cinza	poroso	ausente
1638	Casa de Castanha	verde	pulverulento	ausente
1643	Casa de Castanha	marrom	pulverulento	ausente
1701	Jambu	marrom	pulverulento	ausente
1719	Jambu	creme	aveludado	ausente
1737	Jambu	branco	cremoso	ausente
1747	Jambu	branco	aveludado	ausente
1811	Ilha do Outeiro	verde	pulverulento	ausente

Tabela 5. Continuação

Linhagem	Origem	Morfologia da Colônia		
		Cor	Textura	p.d.*
1914	Rio da UFPA	verde	pulverulento	ausente
1916	Rio da UFPA	marrom	pulverulento	ausente
1918	Rio da UFPA	verde	pulverulento	ausente
1817	Ilha do Outeiro	branco	aveludado	ausente
1824	Ilha do Outeiro	cinza	aveludado	ausente
1836	Ilha do Outeiro	cinza	aveludado	ausente
1909	Rio da UFPA	marrom	pulverulento	ausente

Apêndice 6. Caracterização morfológica macroscópica das linhagens de fungos filamentosos isoladas da região de Mata Atlântica

Tabela 6. Características morfológicas dos micro-organismos isolados da região de Mata Atlântica.
*p.d.: pigmento difundido no meio

Linhagem	Origem	Morfologia da Colônia		
		Cor	Textura	p.d.*
02a	Folhas	Branco	aveludada	ausente
03a	Folhas	Verde	aveludada	ausente
04a	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
04b	Folhas	Verde escuro	aveludada	ausente
04c	Folhas	Creme	cremosa	ausente
05a	Folhas	Branco	aveludada	ausente
06a	Tronco	Verde	aveludada	ausente
06b	Tronco	Verde-amarelado	aveludada	ausente
06c	Tronco	Branco	algodonosa	ausente
06d	Tronco	Marrom claro	pulverulenta	marrom
06e	Tronco	Violeta	aveludada	ausente
07a	Folhas	Verde calro	aveludada	ausente
08a	Folhas	Rosa	aveludada	ausente
08b	Folhas	Branco e verde	aveludada	ausente
09a	Solo	Branco e marrom	aveludada	ausente
10a	Tronco	Branco	aveludada	ausente
10b	Tronco	Branco	algodonosa	ausente
10c	Tronco	Branco	aveludada	ausente
11a	Fruta	Preto	aveludada	vermelho
11b	Fruta	Amarelo	aveludada	ausente
11c	Fruta	Branco	algodonosa	ausente
11d	Fruta	Creme	aveludada	marrom
11e	Fruta	Amarelo	aveludada	ausente
11f	Fruta	Creme	aveludada	marrom
13a	Fruta	Marrom	pulverulenta	ausente
14a	Fruta	Marrom	pulverulenta	ausente
14b	Fruta	Branco	aveludada	ausente
14c	Fruta	Branco	aveludada	ausente
16a	Folhas	Marron claro	aveludada	marrom escuro
17a	Folhas	Marrom	pulverulenta	ausente
17b	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
49b	Folhas	Creme	aveludada	ausente
49c	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
50a	Folhas	Marrom	algodonosa	ausente
50b	Folhas	Verde	aveludada	ausente

Tabela 6. Continuação.

Linagem	Origem	Morfologia da Colônia		
		Cor	Textura	p.d.*
18b	Folhas	Rosa	aveludada	rosa
21a	Tronco	Branco	aveludada	ausente
21b	Tronco	Branco	aveludada	ausente
23a	Solo	Marrom claro	pulverulenta	marrom escuro
23b	Solo	Marrom claro	pulverulenta	ausente
24a	Fruta	Creme	aveludada	ausente
24b	Fruta	Creme	aveludada	ausente
25a	Fruta	Branco	algodonosa	ausente
25b	Fruta	Branco	algodonosa	ausente
27a	Solo	Marrom	pulverulenta	marrom
27b	Solo	Verde	aveludada	ausente
28a	Fruta	Marrom escuro	pulverulenta	marrom
29a	Solo	Creme	cremosa	ausente
31a	Solo	Preto	pulverulenta	ausente
31b	Solo	Branco	aveludada	ausente
31c	Solo	Marrom claro	pulverulenta	ausente
32a	Tronco	Branco	algodonosa	ausente
33a	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
33b	Folhas	Marrom	pulverulenta	marrom
33c	Folhas	Creme	pulverulenta	ausente
34a	Folhas	Marrom claro	pulverulenta	marrom escuro
35a	Folhas	Branco e verde	aveludada	ausente
35b	Folhas	Marrom claro	aveludada	ausente
35c	Folhas	Marrom	pulverulenta	ausente
36a	Folhas	Amarelo claro	aveludada	ausente
36b	Folhas	Verde escuro	aveludada	ausente
36c	Folhas	Creme	cremosa	ausente
37a	Folhas	Verde claro	aveludada	ausente
38a	Fruta (Jaca)	Branco	aveludada	ausente
38b	Fruta (Jaca)	Marrom	pulverulenta	ausente
38c	Fruta (Jaca)	Branco	algodonosa	ausente
38d	Fruta (Jaca)	Creme	aveludada	ausente
38e	Fruta (Jaca)	Rosa	aveludada	vermelho
39a	Fruta	Branco e rosa	aveludada	rosa
40a	Folhas	Branco e verde	aveludada	ausente
40b	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
44a	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
44b	Folhas	Branco	aveludada	amarelo
44c	Folhas	Branco e verde	aveludada	ausente
44d	Folhas	Branco	aveludada	ausente
44e	Folhas	Branco	aveludada	ausente
44f	Folhas	Preto	algodonosa	rosa
44g	Folhas	Violeta	aveludada	ausente
45b	Folhas	Verde	pulverulenta	ausente
46a	Tronco	Branco	aveludada	ausente
49a	Folhas	Marrom	pulverulenta	ausente

Apêndice 7. Medida do índice enzimático de linhagens produtoras de lipase em placa

Tabela 7. Medida do Índice Enzimático das linhagens positivas para lipase. *dT: diâmetro do halo, dC: diâmetro da colônia

Linhagem	dT	dC	IE
10a	2,0	0,7	2,9
33a	2,1	1,1	1,9
39a	2,3	1,8	1,3
28a	2,3	1,1	2,1
44g	2,1	1,5	1,4
38d	3,0	1,9	1,6
08b	2,3	1,6	1,4
18b	2,8	1,8	1,6
38e	1,8	0,8	2,3
73	1,5	0,8	1,9
343	1,5	1,0	1,5
316	2,1	0,9	2,3
94	1,7	1,1	1,5
79	1,6	1,2	1,3
51	1,3	0,9	1,4
437	1,9	1,2	1,6
331	1,2	0,7	1,7
143	1,7	1,1	1,5
298	2,1	1,2	1,8
458	1,9	1,3	1,5
406	2,0	1,4	1,4
374	2,3	2,0	1,2
264	1,9	1,3	1,5
3	2,3	1,7	1,4
488	1,8	1,4	1,3
307	1,8	1,1	1,6

Apêndice 8. Medida do índice enzimático de linhagens produtoras de tanase em placa

Tabela 8. Medida do Índice Enzimático das linhagens positivas para tanase. *dT: diâmetro do halo, dC: diâmetro da colônia

Lin.	dT	dC	IE	Lin.	dT	dC	IE	Lin.	dT	dC	IE
31a	1,8	0,4	4,5	344	1,4	0,7	2,0	111	0,7	0,3	2,3
36c	2,0	0,9	2,2	303	1,1	0,4	2,8	188	1,6	0,3	5,3
04b	1,5	0,6	2,5	314	1,0	0,5	2,0	103	1,2	0,3	4,0
04a	1,5	1,0	1,5	238	1,2	0,4	3,0	212	1,5	0,6	2,5
39a	1,2	0,4	3,0	164	1,1	0,4	2,8	288	1,3	0,5	2,6
06d	1,4	0,5	2,8	491	1,5	0,6	2,5	291	1,0	0,3	3,3
23a	1,5	0,5	3,0	403	1,5	0,6	2,5	287	1,0	0,3	3,3
27a	1,8	0,4	4,5	63	1,5	0,4	3,8	462	1,2	0,3	4,0
13a	1,7	0,4	4,3	360	1,7	0,6	2,8	50	1,2	0,5	2,4
11a	1,8	0,2	9,0	56	1,6	0,3	5,3	37	1,2	0,3	4,0
04c	1,4	0,7	2,0	363	1,0	0,5	2,0	518	0,9	0,4	2,3
14a	1,8	0,3	6,0	182	1,5	0,5	3,0	466	1,0	0,3	3,3
25a	2,0	1,0	2,0	156	1,8	0,5	3,6	81	0,6	0,2	3,0
33a	1,6	0,5	3,2	148	2,0	0,4	5,0	41	1,0	0,5	2,0
36b	1,0	0,5	2,0	140	1,6	0,7	2,3	356	0,9	0,2	4,5
34a	1,5	0,6	2,5	61	1,6	0,5	3,2	280	0,9	0,2	4,5
31c	1,5	0,6	2,5	64	1,6	0,4	4,0	192	1,4	0,5	2,8
10a	1,9	0,8	2,4	411	1,5	0,5	3,0	150	1,6	0,6	2,7
10b	1,5	0,6	2,5	208	1,8	0,7	2,6	479	1,7	0,5	3,4
08b	1,6	0,5	3,2	43	1,9	0,4	4,8	253	1,5	0,5	3,0
38d	1,5	0,5	3,0	210	1,3	0,5	2,6	159	1,6	0,6	2,7
44g	1,0	0,5	2,0	277	1,5	0,4	3,8	12	1,6	0,4	4,0
1326	2,0	0,8	2,5	9	1,0	0,3	3,3	376	1,2	0,3	4,0
1517	1,5	0,5	3,0	355	1,1	0,4	2,8	105	1,2	0,5	2,4
1817	1,5	0,7	2,1	204	1,1	0,5	2,2	60	2,0	0,6	3,3
1811	1,4	0,6	2,3	290	0,7	0,3	2,3	367	1,2	0,5	2,4
1049	1,4	0,5	2,8	459	1,0	0,5	2,0	377	2,0	0,7	2,9
lu 129	1,0	0,4	2,5	263	1,3	0,3	4,3	358	2,0	0,6	3,3
lu 64	1,0	0,5	2,0	278	0,9	0,3	3,0	375	2,3	0,6	3,8
lu 13	1,1	0,5	2,2	271	1,0	0,4	2,5	347	1,2	0,5	2,4
lu 162	1,1	0,5	2,2	438	1,1	0,4	2,8	183	1,2	0,6	2,0
nat d1	1,5	0,5	3,0	366	1,1	0,5	2,2	233	1,4	0,6	2,3
nad m1	1,2	0,4	3,0	365	1,1	0,4	2,8	87	1,2	0,6	2,0
104	1,4	0,7	2,0	175	1,1	0,4	2,8	260	1,0	0,5	2,0
480	1,3	0,4	3,3	5	2,5	0,6	4,2	255	1,5	0,5	3,0

Apêndice 9. Caracterização bioquímica da lipase de *Colletotrichum* sp.

Tabela 9. Valores experimentais, previstos pelo modelo e erros relativos e de ajuste da atividade enzimática (U/mL) do DCCR 2^o de lipase obtida de *Colletotrichum* sp.

Ensaio	Atividade Experimental (U/mL)	Atividade prevista (U/mL)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	27,2	28,0	-0,8	-3,1
2	10,7	9,9	0,8	7,1
3	11,6	10,7	0,9	7,7
4	18,9	16,4	2,5	13,2
5	18,0	17,6	0,4	2,2
6	7,9	10,0	-2,1	-26,0
7	23,5	23,2	0,3	1,3
8	12,5	14,5	-2,0	-15,7
9	27,2	26,5	0,6	2,3
10	27,2	26,5	0,6	2,3
11	25,3	26,5	-1,2	-4,8

Tabela 10. Valores experimentais, previstos pelo modelo e erros relativos e de ajuste da atividade enzimática (U/mL) do DCCR 2^o de lipase obtida de *Rhizopus oryzae*.

Ensaio	Atividade Experimental (U/mL)	Atividade prevista (U/mL)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	76,6	78,1	-1,5	-2,0
2	85,7	84,2	1,5	1,8
3	24,4	39,2	-14,8	-60,8
4	79,3	91,1	-11,8	-14,9
5	68,3	71,0	-2,7	-4,0
6	64,7	48,5	16,2	25,0
7	75,3	66,5	8,8	11,7
8	111,9	107,3	4,6	4,1
9	106,4	102,2	4,2	3,9
10	110,1	102,2	7,9	7,2
11	90,0	102,2	-12,2	-13,6

Apêndice 10. Curvas padrão.

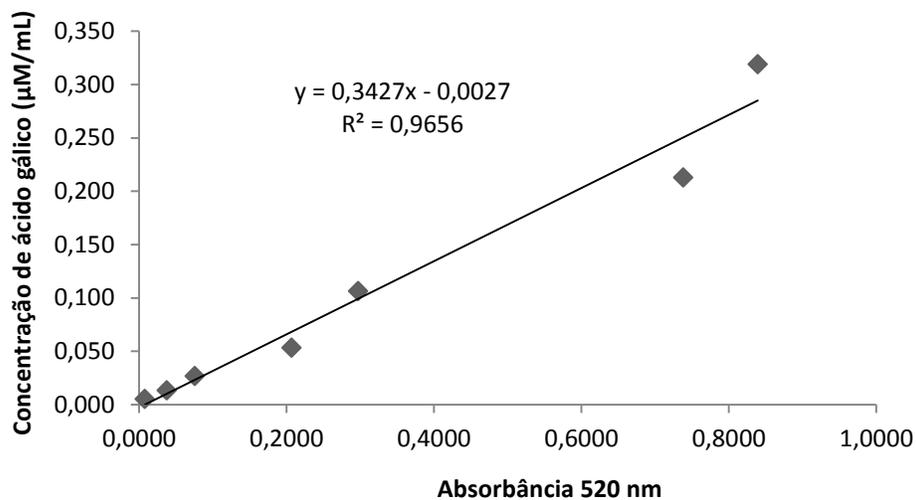


Figura 1. Curva padrão determinada a partir da leitura a 520 nm de diferentes concentrações de ácido gálico

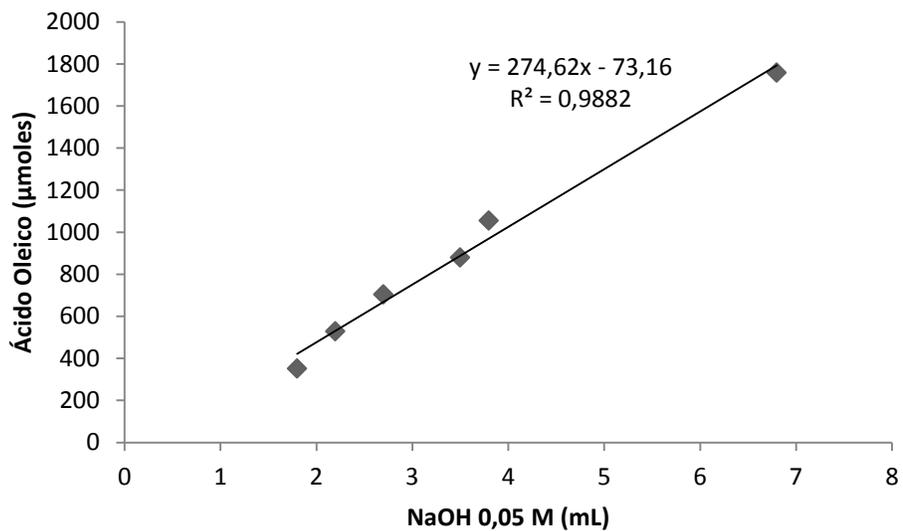


Figura 2. Curva padrão determinada a partir da titulação de soluções de diferentes concentrações de ácido oleico contra solução de NaOH a 0,05M.

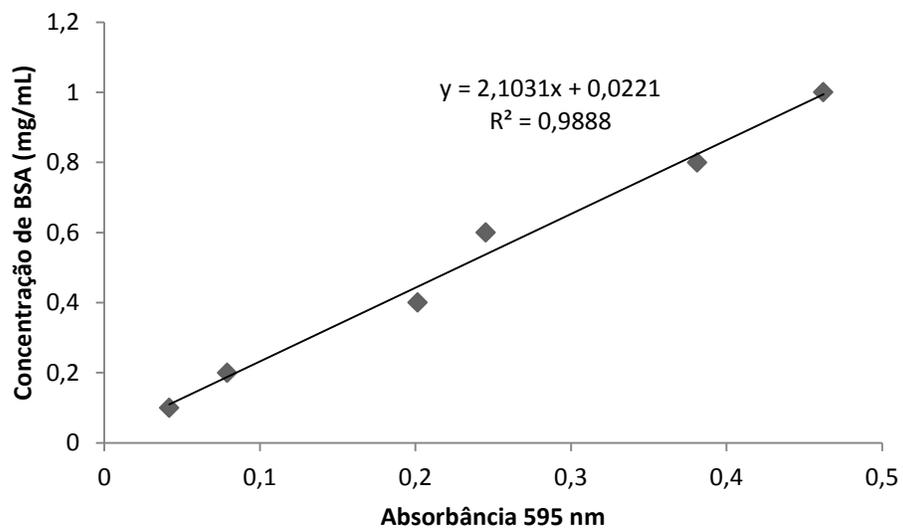


Figura 3. Curva padrão determinada a partir da leitura a 595 nm de diferentes concentrações de BSA



**Autorização de Acesso e de Remessa de
Componente do Patrimônio Genético**

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.

Brasília, 29 de Agosto de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde
PO 161/2010

Processo: 010662/2013-8

Validade: 02/09/2013 a 02/09/2015

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Pesquisador: Gabriela Alves Macedo

CPF: 137.671.328-42

RG: 201157706 - SSP / SP

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página

<http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 9867076345737109 para recuperá-la do banco de dados do CNPq