

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULÁSICAS POR**  
***Aspergillus phoenicis***

Lucas André Dedavid e Silva

(Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas UFRGS)

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Março 2008

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai e minha mãe por sempre me apoiarem e me darem as melhores oportunidades para que pudesse estudar, não só durante o mestrado, mas ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos pelo apoio e convivência ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, não só pela orientação, mas também por ter apoiado desde o início a idéia do projeto e incentivado as ramificações do mesmo surgidas no decorrer do mestrado.

As colegas e amigas do laboratório Roberta Fontoura, Ana Paula Folmer Correa e Florencia Cladera Oliveira pelo apoio em diversos momentos, amizade e colaboração no decorrer do trabalho em vários momentos.

A Fernanda Cortez Lopes, não só por ter sido uma dedicada e competente estudante de iniciação científica, mas também pela amizade.

A Silvana Terra Silveira, pela constante troca de idéias, sugestões, opiniões que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo, mas pela grande amizade e apoio ao longo destes dois anos.

Aos colegas de laboratório Amanda, Aline, Cássia, Daniel, Fátima, Jaslin, Juliana, Karina, Lisiane, Manuela, Marilene, Melina, Nísia, Sabrine, Rodrigo, Rosiele, Simone, Voltaire.

Ao Prof. Dr. Plinho Hertz e demais colegas do ICTA pelo apoio ao projeto e agradável convivência.

Aos amigos Lucélia e Walter pelo apoio toda vez que foi preciso.

Aos funcionários do ICTA.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Aos amigos da graduação, bem como aos de Novo Hamburgo que apoiaram no decorrer da graduação e do mestrado nos mais diversos momentos e etapas da minha vida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao laboratório e bolsa de mestrado.

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULÁSICAS POR *Aspergillus phoenicis*<sup>1</sup>

**Autor:** Lucas André Dedavid e Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Adriano Brandelli

## RESUMO

A celulose é o polímero mais abundante na natureza, sendo sua biodegradação realizada por enzimas como exoglicanases, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, denominadas celulases. Entre os microrganismos capazes de secretar estas enzimas, destacam-se os fungos filamentosos, como *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Neste trabalho, em sua primeira etapa foi selecionado o fungo *Aspergillus phoenicis* entre seis fungos filamentosos para a produção de celulases. Foram testados doze meios de cultivos diferentes, buscando a escolha de um meio de cultivo baseado em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas celulásicas. O meio de cultivo composto por resíduo de uva e peptona foi escolhido para efetuar de otimização do meio de cultivo, por meio da metodologia de superfície de resposta, realizando o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. O cultivo submerso do fungo foi realizado em frascos erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio de cultivo, na temperatura de 30°C, durante 120 horas em agitador de plataforma, a 120 rpm. Foram mensuradas as atividades de celulases totais, endoglicanases, e  $\beta$ -glicosidases. A atividade enzimática presente no sobrenadante do meio de cultivo foi então caracterizada quanto a diferentes valores de pH, temperatura, termoestabilidade, presença de sais e reagentes. Os resultados demonstram que as enzimas presentes no sobrenadante bruto da cultura possuem melhores atividade entre os pHs 3,0 e 5,0, temperatura de 60 °C, mantendo-se estável por duas horas de incubação. A atividade enzimática sofreu perdas quando incubada na presença de Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, detergentes e  $\beta$ -mercaptoetanol.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (117 p.). Março 2008.

## **PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULOLYTIC ENZYMES BY *Aspergillus phoenicis***

**Author:** Lucas André Dedavid e Silva

**Advisor:** Prof. Dr. Adriano Brandelli

### **ABSTRACT**

Cellulose is the most abundant polymer in the nature, being its degradation carried out by enzymes such as exoglycanases, endoglycanases and  $\beta$ -glucosidases, called cellulases. Among the microorganisms capable to secrete these enzymes, the fungi distinguished the filamentous fungi, such as *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* are the most important microorganisms. In this work, the fungus *Aspergillus phoenicis* was selected among six other filamentous fungi for the production of cellulases. Twelve culture media based on agroindustrial waste for cellulase production were tested. Culture medium with the composition of waste grape and peptone was chosen for the optimization of process, with the help of the response surface methodology, through factorial planning  $2^2$ . The fungus was cultivated at a temperature of 30 °C and 120 rpm on shaker rotatory during 120 hours. The activity of total cellulases, endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases were measured. The enzymatic activity was characterized for the different values of pH, temperature, thermostability and presence of ions and other components. The results demonstrated that the crude enzymes have the optimum activity between pH 3,0 and 5,0, at 60 °C, temperature that it was remained steady for two hours of incubation. The enzymatic activity suffered losses when incubated in the presence of  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{+2}$ , detergents and  $\beta$ -mercaptoetanol.

1/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (117 p.). March, 2008.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Enzimas de interesse industrial .....	3
2.2 Celulases .....	4
2.2.1 Endoglicanases.....	5
2.2.2 Exoglicanases.....	6
2.2.3 $\beta$ -Glicosidases.....	7
2.2.4 Celulossomos .....	7
2.3 Celulases bacterianas.....	8
2.4 Celulases fúngicas.....	9
2.5 Aplicações industriais das celulases .....	11
2.5.1 Indústria de alimentos.....	11
2.5.2 Indústria de alimentação animal .....	12
2.5.3 Indústria têxtil e lavanderia .....	12
2.5.4 Indústria de polpa de celulose e papel.....	14
2.5.5 Hidrólise de substratos para a produção de etanol.....	14
2.6 Estrutura da parede celular dos vegetais.....	15
2.6.1 Celulose.....	16
2.6.2 Hemicelulose .....	17
2.6.3 Substâncias pécticas .....	18

2.6.4	Lignina .....	19
2.7	Resíduos agroindustriais e materiais lignocelulósicos .....	20
2.7.1	Resíduos da indústria vinícola .....	20
2.7.2	Bagaço de cana de açúcar .....	21
2.7.3	Resíduos da cultura do arroz.....	22
2.7.4	Casca de acácia negra .....	23
2.8	Cultivo submerso de microrganismos .....	24
2.9	Gênero <i>Aspergillus</i> .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1	Microrganismos e Manutenção .....	30
4.2	Suspensão de esporos .....	30
4.3	Seleção dos fungos filamentosos.....	31
4.4	Diálise das amostras.....	32
4.5	Determinação da atividade enzimática .....	32
4.5.1	Determinação da atividade de celulasas totais .....	32
4.5.2	Determinação da atividade de endoglicanases .....	33
4.5.3	Curva Padrão Glicose.....	34
4.5.4	Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -glicosidases.....	35
4.6	Análise Estatística dos Dados.....	35
4.7	Seleção de substratos para a produção de celulasas.....	35
4.8	Tratamento alcalino da casca de acácia negra .....	36
4.8.1	Determinação da atividade enzimática .....	37

4.8.2	Determinação de açúcares redutores totais .....	37
4.8.2.1	Solução DNS .....	38
4.8.2.2	Curva padrão de glicose para açúcares redutores totais.....	38
4.8.3	Determinação da concentração de proteínas solúveis .....	39
4.8.3.1	Curva padrão albumina sérica bovina .....	39
4.9	Determinação do pH .....	40
4.10	Produção e otimização de celulasas com o uso do planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta .....	40
4.11	Caracterização das atividades enzimáticas .....	41
4.11.1	Temperatura ótima das atividades enzimáticas .....	42
4.11.2	pH ótimo das atividades enzimáticas.....	42
4.11.3	Termoestabilidade das atividades enzimáticas.....	42
4.11.4	Efeito de sais e reagentes .....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1	Seleção dos fungos filamentosos.....	44
5.2	Seleção de meios de cultura.....	48
5.3	Atividade enzimática de celulasas totais e endoglicanases .....	48
5.3.1	Determinação de açúcares redutores totais .....	58
5.3.2	Determinação de proteínas solúveis.....	60
5.3.3	Determinação do pH durante o cultivo.....	62
5.4	Otimização da produção de celulasas .....	65
5.4.1	Atividades de celulasas totais.....	66
5.4.2	Atividade de endoglicanases .....	69
5.4.3	Atividade de $\beta$ -glicosidasas.....	73

5.5	Caracterização das enzimas celulásicas .....	77
5.5.1	Temperatura ótima das atividades enzimáticas .....	77
5.5.2	pH ótimo das atividades enzimáticas.....	78
5.5.3	Termoestabilidade das enzimas .....	80
5.5.4	Caracterização das enzimas frente a sais e reagentes .....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>104</b>
9.1	Apêndice 1 .....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Características das celulases em diferentes etapas na indústria têxtil e limpeza de roupas. Adaptado de BHAT, 2000. ....	13
<b>TABELA 2.</b> Composição lignocelulósica da casca e da palha de arroz. Adaptado de GRAMINHA et al., 2007. ....	23
<b>TABELA 3.</b> Produtos e processos com a participação do gênero <i>Aspergillus</i> .....	28
<b>TABELA 4.</b> Fungos filamentosos testados e seus respectivos meios de cultivo utilizados. ....	30
<b>TABELA 5.</b> Curva padrão de glicose para os ensaios de celulases totais e endoglicanases. ....	34
<b>TABELA 6.</b> Meios testados para a seleção produção de celulases por <i>A. phoenicis</i> . ....	37
<b>TABELA 7.</b> Curva padrão de glicose para açúcares redutores totais.....	38
<b>TABELA 8.</b> Curva Padrão de Albumina Sérica Bovina.....	40
<b>TABELA 9:</b> Codificação das variáveis para o planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> . ....	41
<b>TABELA 10.</b> Resultados obtidos no experimento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	65
<b>TABELA 11.</b> Efeitos e interações sobre atividade de celulases totais (PFU) no cultivo submerso de <i>A. phoenicis</i> . ....	68
<b>TABELA 12.</b> Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de celulases totais.....	68
<b>TABELA 13.</b> Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de celulases totais. ....	68
<b>TABELA 14.</b> Efeitos e interações sobre atividade de endoglicanases no cultivo submerso de <i>A. phoenicis</i> . ....	71
<b>TABELA 15.</b> Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de endoglicanases.....	71
<b>TABELA 16.</b> Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de endoglicanases.....	72

<b>TABELA 17.</b> Efeitos e interações sobre atividade de $\beta$ -glicosidases no cultivo submerso de <i>A. phoenicis</i> . .....	75
<b>TABELA 18.</b> Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de $\beta$ -glicosidases.....	75
<b>TABELA 19.</b> Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de $\beta$ -glicosidases. ....	76
<b>TABELA 20.</b> Efeito de sais na concentração de 5 mM sobre atividade de celulasas totais, endoglicanases e $\beta$ -glicosidases. ....	84
<b>TABELA 21.</b> Efeito de detergentes e reagentes sobre atividade de celulasas totais, endoglicanases e $\beta$ -glicosidases. ....	87

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexada (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e os quadrados em brancos terminais não redutores. Celulose, enzimas e produtos hidrolisados não estão em escala (adaptado de LYND et al., 2002)..... 5
- FIGURA 2.** Representação esquemática da estrutura da hemicelulose. A: Arabinose; FeA, :Ácido Ferúlico; G, Galactose; Glc, Ácido Glicoronico; X, Xilose. (Adaptado de GRAY et al., 2006)..... 18
- FIGURA 3.** Representação das fibras e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina. Adaptado de GRAMINHA et al., 2007..... 19
- FIGURA 4.** Atividade de celulases totais produzidas por diferentes fungos, com amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas. Teste estatístico relacionado às atividades enzimáticas coletadas após 72 horas de cultivo. Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente para o teste de Tukey com  $p < 0,01$ . ..... 45
- FIGURA 5.** Atividade de endoglicanases produzidas pelos diferentes fungos, com amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas. Teste estatístico relacionado às atividades enzimáticas coletadas após 72 horas de cultivo. Médias seguidas nas mesmas letras não diferem significativamente para o teste de Tukey com  $p < 0,01$ . ..... 45
- FIGURAS 6A e 6B.** Atividade enzimática de celulases totais produzidas por *A. phoenicis* em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Cultivos em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão)..... 50
- FIGURA 7.** Atividade enzimática de celulases totais produzidas pelo *A. phoenicis* após 96 horas de cultivo em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação 120, rpm a 30 °C. Média e desvio padrão dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias. .... 51
- FIGURAS 8A e 8B.** Atividade enzimática de endoglicanases produzidas pelo *A. phoenicis* no decorrer do tempo em diferentes meios de cultivo submerso, em agitação orbital de 120 rpm a 30 °C. Média e desvio padrão dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada..... 53

<b>FIGURA 9.</b> Atividade enzimática de endoglicanases produzidas pelo <i>A. phoenicis</i> após 96 horas de cultivo em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação 120 rpm, a 30 °C. Média dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada, ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias. ....	54
<b>FIGURAS 10A e 10B.</b> Concentração de açúcares redutores no decorrer dos diferentes meios de cultivo testados para a produção de celulases por <i>A. phoenicis</i> . Cultivos realizados em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (Média ± D.P.). ....	59
<b>FIGURA 11A e 11B.</b> Concentração de proteínas solúveis no decorrer dos diferentes meios de cultivo testados para a produção de celulases por <i>A. phoenicis</i> . Cultivos realizados em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (Média ± D.P.). ....	61
<b>FIGURAS 12A e 12B.</b> Variações no valor do pH no decorrer do cultivo do <i>A. phoenicis</i> em diferentes meios de cultivo testados. Cultivos realizados em duplicata. Média ± DP de cada cultivo. ....	64
<b>FIGURA 13.</b> Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de celulases totais por <i>A. phoenicis</i> . ....	69
<b>FIGURA 14.</b> Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de endoglicanases por <i>A. phoenicis</i> . ....	72
<b>FIGURA 15.</b> Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de $\beta$ -glicosidases por <i>A. phoenicis</i> . ....	76
<b>FIGURA 16.</b> Temperatura ótima para as atividades de celulases totais, endoglicanases e $\beta$ -glicosidases, utilizando como amostra as enzimas provenientes da cultura de <i>A. phoenicis</i> crescido durante 96 horas. Ensaios enzimáticos realizados em triplicata. ....	78
<b>FIGURA 17.</b> pH ótimo para as atividades de celulases totais, endoglicanases e $\beta$ -glicosidases, utilizando como amostra as enzimas provenientes da cultura de <i>A. phoenicis</i> crescido durante 96 horas. Ensaios enzimáticos realizados em triplicata. ....	80
<b>FIGURA 18.</b> Efeito da incubação das enzimas provenientes do cultivo de <i>A. phoenicis</i> sobre a atividade de celulases totais em diferentes temperaturas. Experimentos realizados em triplicatas ....	82

**FIGURA 20.** Efeito da incubação das enzimas provenientes do cultivo de *A. phoenicis* sobre a atividade de  $\beta$ -glicosidases em diferentes temperaturas. Experimentos realizados em triplicatas. .... 83

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida  
ANOVA: Análise da variância  
CMC: carboximetilcelulose  
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico  
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético  
FC: Reagente de Folin-Ciocalteu  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FPU: *Filter Paper Units* (atividade de celulases totais)  
GRAS: *Generally Recongnized as Safe*  
HEC: hidroxietilcelulose  
ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
MTBE: éter metil-terciário butílico  
rpm: rotações por minuto  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
TRIS: hidroximetilaminometano  
pNPβG: *p*-nitrophenil-β-D-glicopiranosídeo  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, como os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, pertencentes ao filo Ascomycota, são de grande importância para a produção de enzimas e outros metabólitos. A importância do gênero *Aspergillus* tem sido demonstrada com a presença de linhagens em processos industriais de produção de alimentos comidos e bebidas fermentadas, produção de ácidos orgânicos e enzimas com aplicações industriais.

A necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca de matérias-primas de custo baixo e renováveis para o processo de produção das mesmas. Os resíduos agroindustriais que possuem na sua composição material lignocelulósico demonstram potencial como meio de cultura para a produção de celulases.

Celulases é o nome genérico correspondente às enzimas presentes na biodegradação da celulose, polímero vegetal abundante na natureza. A aplicação das celulases atinge áreas como a produção de bebidas, alimentos, alimentação de animais, indústria têxtil e a hidrólise enzimática da celulose com o objetivo de se obter açúcares fermentáveis, utilizados para produção de biocombustíveis.

A utilização de enzimas em diversas áreas da indústria faz com que microrganismos sejam estudados e suas enzimas caracterizadas, disponibilizando

maior variedade e conhecimento para a produção de enzimas que vão de encontro às necessidades da indústria. O gênero *Aspergillus* possui potencial descrito para a produção de enzimas, mas algumas espécies precisam de estudos complementares, como o caso do *Aspergillus phoenicis*. Somado a isso, no estado do Rio Grande do Sul existe a possibilidade de utilizarem resíduos agroindustriais como meio de cultura para a produção de metabólitos de microrganismos.

Este estudo teve como objetivo selecionar um microrganismo e um meio de cultura constituído em parte por um resíduo agroindustrial para a produção de enzimas celulásicas em cultivo submerso, buscando a otimização da produção das enzimas e a caracterização das mesmas, quanto a fatores como presença de íons, detergentes, temperatura, pH e termoestabilidade.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Enzimas de interesse industrial**

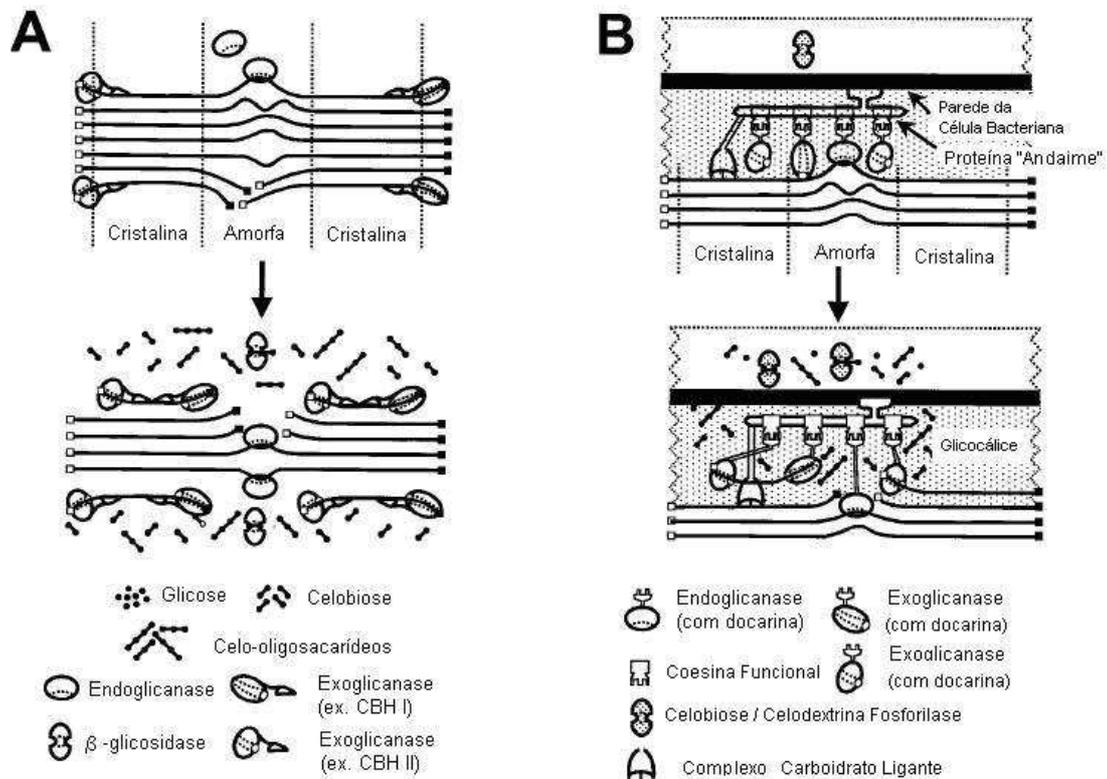
A utilização de catalisadores enzimáticos nos mais diferentes ramos industriais tem sido uma tendência cada vez maior em todo o mundo, sendo o valor total do mercado estimado em 2,3 bilhões de dólares anuais (MUSSATTO et al., 2007). O mercado se encontra dividido em três segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas indústrias de detergente, amido, têxtil, álcool combustível, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (KIRK et al., 2002; MUSSATTO et al., 2007).

Dentre as enzimas mais utilizadas estão às proteases, presentes na indústria de detergentes, processamento de carne e soja e tratamento do couro (CHERRY & FIDANTSEF, 2003). A utilização de lipases ocorre como catalisadores na produção de biodiesel e no aumento do poder de limpeza em detergentes (HASAN et al., 2006). As amilases além de estarem presentes na formulação de detergentes enzimáticos, são importantes para conferir maior qualidade no processo de panificação e na fermentação da cerveja (MITIDIERI et al., 2006). As pectinases permitem melhor clarificação e melhoram o rendimento da extração de sucos de fruta (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005). Tal variedade de

enzimas e ramos de aplicação para as mesmas, somado com a necessidade da utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente demonstra o potencial para aplicação de enzimas microbianas e justificam a pesquisa e produção de enzimas (MUSSATTO et al., 2007). Neste contexto, existe espaço para aplicação de celulasas, nome “genérico” para as enzimas envolvidas na degradação da celulose. Produzidas por uma diversidade de microrganismos em condições de anaerobiose e aerobiose e temperaturas, as celulasas são fundamentais para a obtenção de açúcares a partir da celulose como fonte de carbono e importantíssimas para a reciclagem do elemento carbono na biosfera.

## **2.2 Celulasas**

A necessidade da degradação da celulose, presente na parede de vegetais em condições naturais, faz com que os microrganismos secretem enzimas com três formas de ação. O processo de clivagem das ligações  $\beta$ -1,4 da celulose é efetuado por enzimas celulásicas, atuando de modo complexado, denominado celulosomos, no caso de bactérias anaeróbias (DESVAUX, 2005) ou não complexada, no caso de fungos e também de bactérias aeróbias (Figura 1) (LYND et al., 2002; BHAT & BHAT, 1997).



**FIGURA 1.** Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexada (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e os quadrados em branco terminais não redutores. Celulose, enzimas e produtos hidrolisados não estão em escala (adaptado de LYND et al., 2002).

As celulasas são produzidas por um espectro de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (BHAT & BHAT 1997).

Pertencentes a família das glicohidrolases (3.2), as celulasas classificadas por suas diferentes formas de ação:

### 2.2.1 Endoglicanases

Endo-1,4-β-D-glicana glicanohidrolase (EC 3.2.1.4): São também conhecidas como endo-β-1,4 glicanases e carboximetil celulasas. Catalizam a

hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas cadeias terminais. Seu substrato natural é a celulose e a xiloglicana. Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose (BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002; PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

### **2.2.2 Exoglicanases**

Atuando de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias da celulose, podendo liberar tanto glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática. As 1,4- $\beta$ -D-glicana glicanohidrolases, também podendo ser chamadas de glicana-1,4- $\beta$ -glicohidrolase ou exo- $\beta$ -glicosidase (E.C. 3.2.1.74), são responsáveis pela remoção sucessiva de unidades de D-glicose em 1,4- $\beta$ -D-glicanas. Já as 1-4- $\beta$ -celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), denominadas também por exo-glicanase ou celobiohidrolase, catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras em ao redutoras das cadeias (BHAT & BHAT, 1997, LYND et al., 2002). Possuem ação limitada sobre substratos como Carboximetilcelulose (CMC) e Hidroxietilcelulose HEC (SINGH & HAYASHI, 1995).

### 2.2.3 $\beta$ -Glicosidases

Necessárias para hidrolizar oligossacarídeo de cadeia curta e celobioses solúveis em glicose, também podem ser denominadas  $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase (EC 3.2.1.21) (BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002). Perde sua atividade com o aumento da extensão da cadeia de celulose (SINGH & HAYASHI, 1995). Efetua a hidrólise de resíduos terminais de  $\beta$ -D-glicose em oligossacarídeos (BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002).

### 2.2.4 Celulossomos

Em bactérias anaeróbias, ocorre a presença dos celulossomos, termo introduzido primeiramente a partir do estudo da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DESVAUX, 2005). Os celulossomos são definidos como um complexo multienzimático que possui celulasas que atuam de modo agrupado. Os microrganismos que secretam os celulossomos sobre o substrato são tipicamente encontrados em ambientes anaeróbicos, como no trato digestivo de ruminantes (LYND et al., 2002). No domínio *Bacteria*, organismos que possuem celulossomos são encontrados principalmente no gênero *Clostridium* (DESVAUX, 2005). Contudo, os gêneros *Acetivibrio*, *Fibrobacter*, e *Ruminococcus* também produzem celulossomos (LYND et al., 2002).

A presença do celulossomos em bactérias garante a adesão direta e específica no substrato de interesse, permitindo melhor eficiência na competição por nutrientes com outros microrganismos presentes na mesma biota e a proximidade entre a célula e a celulose, permitindo que as celodextrinas não se difundam pelo meio. Somado a isso, o celulossomo permite uma melhor

concentração da atividade celulásica e sinergismo da mesma, evita a adsorção não produtiva de celulases, limita a competição entre celulases por sítios de adsorção e permite a atividade das celulases ao longo da fibra (DESVAUX, 2005).

### 2.3 Celulases bacterianas

Em bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios (SINGH & HAYASHI, 1995; LYND et al., 2002). Em bactérias aeróbias, são descritos como produtores de celulases o gênero *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* (SINGH & HAYASHI, 1995). Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, capazes de formar celulosomas (secção 2.2.4) (LYND et al., 2002; DESVAUX, 2005).

Na ordem Actinomycetales, mais conhecida por actinomicetos, às espécies termofílicas *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces* e a mesofílica *Streptomyces*, correspondem a parte importante da comunidade microbiana responsável pela degradação lignocelulósica, sendo a atuação de suas enzimas similar às celulases fúngicas (SINGH & HAYASHI, 1995; LYND et al., 2002).

A pesquisa por celulases termoestáveis tem se intensificado nos últimos anos e o domínio *Archae* tem sido pesquisado com maior ênfase. Genes codificadores de enzimas celulásicas de microrganismos termófilos degradadores de celulose foram clonados e as enzimas correspondentes purificadas e caracterizadas (NIEHAUS et al., 1999). Entre os microrganismos do domínio *Archae*, incluem-se *Pyrococcus furiosus* e *Pyrococcus horikoshi*, espécies do

gênero *Sulfolobus* como produtores de  $\beta$ -glicosidases e o gênero *Thermotoga*, com suas endoglicanases e exoglicanases sendo purificadas e caracterizadas (NIEHAUS et al., 1999; HAKI & RAKSHIT, 2003.)

## **2.4 Celulases fúngicas**

Os fungos pertencem ao reino Fungi, maior reino eucariótico e dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). São estimadas aproximadamente 1,5 milhões de espécies, sendo que, 40% destas são ascomicetos, contendo espécies de grande importância para os seres humanos em áreas como agricultura, indústria de alimentos, indústria de fármacos e na medicina, além de serem fundamentais na decomposição de material orgânico (SCAZZOCCHIO, 2006).

Os fungos possuem grande diversidade em sua morfologia, já que podem ser tanto macroscópicos, como os cogumelos ou microscópicos como as leveduras, com sua fisiologia variando de espécie para espécie ocupando diversos habitats (BENNET, 1998),

Considerados uma classe de microrganismos de grande significado comercial, os fungos filamentosos são amplamente distribuídos na natureza, encontrados no solo, em vegetais e animais, podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas (GRIMM et al., 2005) e fundamentais na ciclagem de nutrientes na biosfera (WHITE et al., 2002). Também são capazes de associar-se simbioticamente com as raízes de plantas, formando micorrizas (STRULLU-DERRIEN & DÉSIÉ-GEORGES, 2007).

O interesse comercial nos fungos filamentosos se deve a sua capacidade de decompor diferentes substratos, que é explorada gerando produtos ou processos, como o isolamento de enzimas, a biodegradação de resíduos, fermentação em estado sólido de resíduos. O estudo da expressão de proteínas heterólogas em fungos filamentosos tem aumentado devido à ausência de corpos de inclusão nos microrganismos somados aos processos de controle de expressão gênica em pós-tradução (GRIMM et al., 2005), embora a produção de proteínas recombinantes em fungos filamentosos seja considerada baixa (WANG et al., 2005).

As celulasas fúngicas tem sido estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (NG, 2004). Entre os produtores de celulasas estão os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002).

Fungos termófilos também estão sendo pesquisados, devido a sua capacidade de secretar enzimas que degradam a celulose em temperaturas mais elevadas e possuem melhor estabilidade térmica. Entre os isolados estudados estão *Chaetomium termophile*, o gênero *Humicola*, *Thermoascus aurantiacus*, *Talaromuces emersonii*, *Sporotrichum termophile* (MAHESHWARI et al., 2000). Além de serem novas opções para a produção de celulasas termotolerantes, os microrganismos termófilos, tanto fungos como bactérias, sintetizam celulasas resistentes à pHs de alcalinidade e acidez elevados. Também conseguem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menores riscos de contaminação por outros microrganismos (BHAT & BHAT, 1997).

Fungos anaeróbios capazes de degradar a celulose que habitam o trato digestivo de animais ruminantes também são estudados, como o *Neocalimastix frontalis* (SINGH & HAYASHI, 1995). Além deste, outros gêneros de fungos anaeróbios, pertencentes ao filo Chytridiomycota, são estudados, como *Caecomyces*, *Piromyces*, *Orpinomyces* e *Ruminomyces* (TEUNISSEN & OP DEN CAMP, 1993; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

## **2.5 Aplicações industriais das celulases**

As celulases possuem uma ampla faixa de aplicações. A utilização das celulases e hemicelulases teve seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiro na indústria de alimentação animal, seguido na aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e lavanderia. O grupo de enzimas formado por celulases, pectinases e hemicelulases é responsável por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas, tendo os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* como principais produtores (BHAT, 2000).

### **2.5.1 Indústria de alimentos**

Na indústria de alimentos, celulases são utilizadas em processos de maceração, geralmente em conjunto com hemicelulases e pectinases (BHAT, 2000), como na extração de suco de frutas e óleo de sementes (BHAT & BHAT 1997). Também possuem importante papel na filtração e clarificação de sucos de frutas, aumento na efetividade da extração da cor de sucos e na liquefação do tecido vegetal, o que permite melhor extração de pigmentos dos frutos (BHAT &

BHAT 1997; VAILLANT et al., 1999; BHAT, 2000, NIEHAUS et al., 1999; MUSSATTO et al., 2007).

Dentre as celulases, as  $\beta$ -glicosidases possuem capacidade de liberar compostos aromáticos durante a fabricação do vinho, como terpenos, compostos fenólicos de capacidade antioxidante, nutracêutica e flavorizante (DAROIT et al., 2007). A utilização de infusões de  $\beta$ -glicosidases em conjunto com pectinases faz com que aromas e características voláteis de frutas e vegetais aumentem, o que é de grande importância para a indústria de alimentos (BHAT, 2000).

### **2.5.2 Indústria de alimentação animal**

A indústria de alimentação animal movimenta um mercado superior a 50 bilhões de dólares em todo mundo (BHAT, 2000). Em animais monogástricos as celulases atuam em conjunto com as xilanases, na hidrólise de polissacarídeos não amiláveis (BHAT & BHAT, 1997; BHAT, 2000). Em animais ruminantes, a utilização de celulases em conjunto com pectinases e hemicelulases, vêm da necessidade de aumentar a digestão das plantas forrageiras, base da alimentação dos animais, e assim poder incrementar a qualidade e digestibilidade da ração (NIEHAUS, et al., 1999 BHAT, 2000).

### **2.5.3 Indústria têxtil e lavanderia**

Na indústria têxtil, as celulases são utilizadas para a remoção do excesso de corantes em tecidos *jeans*, processo denominado bioestonagem. Este processo faz com que os *jeans* adquiram uma aparência “lavada”, danificando menos as fibras do tecido do que as pedra-pomes utilizadas neste processo (MUSSATTO et al., 2007). Outros benefícios presentes com a adição de celulases são a redução

do tempo de uso das máquinas envolvidas na estonagem, aumento da produtividade, melhorias nas condições de segurança no ambiente de trabalho e condições de automação do processo (BHAT & BHAT, 1997; BHAT, 2000; KIRK et al., 2002; CHEN et al., 2007). Um dos grandes desafios da aplicação das celulases na indústria têxtil e lavanderias é o uso de formulações corretas para a utilização das enzimas (BHAT, 2000). Na Tabela 1 é possível ver o uso das celulases de acordo com suas funções e aplicações.

**TABELA 1:** Características das celulases em diferentes etapas na indústria têxtil e limpeza de roupas. Adaptado de BHAT, 2000.

Enzima	Função	Aplicação
Celulases, preferencialmente neutras e com elevada atividade de endoglicanases.	Remoção de tintura na fabricação de jeans, suavizar impacto da tintura sem prejudicar o tecido de algodão.	Bioestonagem de jeans, lavagens de tecidos com qualidade e não agressivas ao meio ambiente.
Celulase, preferencialmente ácida e com elevada atividade de endoglicanases.	Remoção do excesso de microfibras da superfície do algodão sem danificar o tecido.	Biopolimento do algodão sem danificar as fibras.
Celulases, preferencialmente rica em endoglicanases.	Restauração da macies e cores de produtos têxteis de algodão.	Produção de peças de algodão com alta qualidade.

Na lavagem de roupas em lavanderias, as celulases atuam na remoção de microfibras desfiadas de algodão, formadas depois de repetidas lavagens do tecido, restauração da cor e brilho de roupas de algodão, evitando a formação de “fuzz” (fibras pequenas que saem da superfície do tecido) assim como a formação do “pilling”, glomérulos de fibras atadas ao tecido (BHAT & BHAT, 1997; BHAT, 2000; KIRK et al., 2002; CHEN et al., 2006).

#### **2.5.4 Indústria de polpa de celulose e papel**

No processo de fabricação da polpa de celulose, é realizado o refino da mesma, sendo removido materiais lenhosos que prejudicam a qualidade da polpa. A utilização de celulases de *Trichoderma* no processo permitiu uma economia de energia em 20%, mas podendo chegar até 40%, de acordo com o momento e tipo da enzima aplicada. A utilização das celulases se faz presente na modificação das propriedades das fibras, permitindo o desenxague das fibras o que aumenta a velocidade da fabricação do papel (BHAT, 2000).

Na indústria de polpa e papel, as celulases estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação das folhas de papel (BHAT & BHAT, 1997; LIMA et al., 2001; PELACH et al., 2003).

#### **2.5.5 Hidrólise de substratos para a produção de etanol**

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (PERCIVAL ZHANG et al., 2006). As pesquisas para a produção e desenvolvimento de celulases mais eficientes, usando técnicas de engenharia genética é um dos ramos que tem demonstrado avanços significativos (GRAY et al., 2006). O uso de celulases tem como entraves o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção de enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (SUN & CHENG, 2002). A expectativa é de que o

mercado de celulases pode ser superior a 400 milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

Para ocorrer à hidrólise enzimática de resíduos agrícolas por celulases, são necessárias três etapas: a adsorção das enzimas na superfície da celulose, a biodegradação da celulose em açúcares fermentáveis e a desadsorção das celulases dos resíduos. A perda de atividade enzimática devido à dificuldade das enzimas de desadsorverem após a ação sobre os substratos é um dos problemas encontrados, o que justifica a utilização de surfactantes no processo. Outra dificuldade é o aumento dos produtos da hidrólise, como de celobiose e glicose que podem inibir a atividade celulásica (SUN & CHENG, 2002).

## **2.6 Estrutura da parede celular dos vegetais**

A parede celular dos vegetais consiste em celulose, hemicelulose e pectinas além do polímero fenólico lignina (ARO et al., 2005). Tal característica faz ela se diferenciar da parede celular de outros reinos eucarióticos. Entre as funções da parede celular estão a absorção, transporte e secreção de substâncias, sítio de atividades digestiva (como vacúolos) e defesa contra bactérias e fungos patogênicos (RAVEN, 2001).

A parede celular dos vegetais pode ser dividida de acordo com o seu período de formação no vegetal. Durante o início do crescimento vegetal é formada a parede primária. Sua união com as células adjacentes é denominada lamela mediana. Muitas células depositam cadeias adicionais subsequentemente, formando então a parede secundária (RAVEN, 2001).

### 2.6.1 Celulose

A Celulose é o polímero natural mais abundante da terra, sendo formada por cerca de 8000-12000 resíduos de glicose ligados entre si através de ligações  $\beta$ -(1-4) (LIMA et al., 2005), formando microfibrilas com 10 a 25 nanômetros de diâmetro (RAVEN, 2001). As microfibrilas se entrelaçam, formando finos filamentos, denominados macrofibrilas, de 0,5 a até 4 micrômetros de comprimento. Tais características fazem da celulose um polímero de caráter estrutural (RAVEN, 2001).

As moléculas paralelas de celulose são ligadas entre si devido a pontes de hidrogênio, sendo divididas em duas regiões: região cristalina, que apresenta um maior número de interações moleculares intra e internamente, como pontes de hidrogênio e forças de Van der Waal's, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, a tração e a agentes químicos. A região amorfa, mais facilmente hidrolisável, possui menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (LYND et al; 2002, PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

Na natureza, a celulose é o produto primário da fotossíntese (PERCIVAL ZHANG et al., 2006) e é essencialmente sintetizada por vegetais, mas também por algumas bactérias e algas. Nas plantas, a celulose está associada a outro grupo de polímeros, como hemiceluloses, pectinas e ligninas, o que remete a designação de materiais lignocelulósicos (DESVAUX, 2005) e são considerados os recursos renováveis mais abundantes na natureza (HAN et al., 2004).

### 2.6.2 Hemicelulose

Presente na lamela média das células vegetais, a hemicelulose trata-se de um polímero composto por uma variedade de monossacarídeos, principalmente D-xilose, e por outras subunidades, com D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glicorônico e ácido galacturônico (POLIZEI et al., 2005) (Figura 2). A composição destas subunidades varia de acordo com a fonte da xilana: enquanto o farelo de arroz é rico em arabinose, a xilana de bétula possui um conteúdo significativo de glicuranato e baixo de arabinose (CHÁVEZ et al., 2006). Além de variar conforme os diferentes grupos de plantas, a composição da hemicelulose varia conforme os tipos de célula (RAVEN, 2001). Deste modo, a xilana, principal hemicelulose, é encontrada em cereais e *hardwoods* (termo aplicado a madeiras magnolídeas e eudicotiledoneas) sendo formada por ligações  $\beta$ -1,4 de D-xilose na cadeia principal do polímero. Em outras *hardwoods* e *softwoods* (termo aplicado a madeiras de coníferas), a cadeia principal é formada por ligações  $\beta$ -1,4 de manose, recebendo a denominação de (galacto) glicomanose (RAVEN, 2001, ARO et al., 2005;).

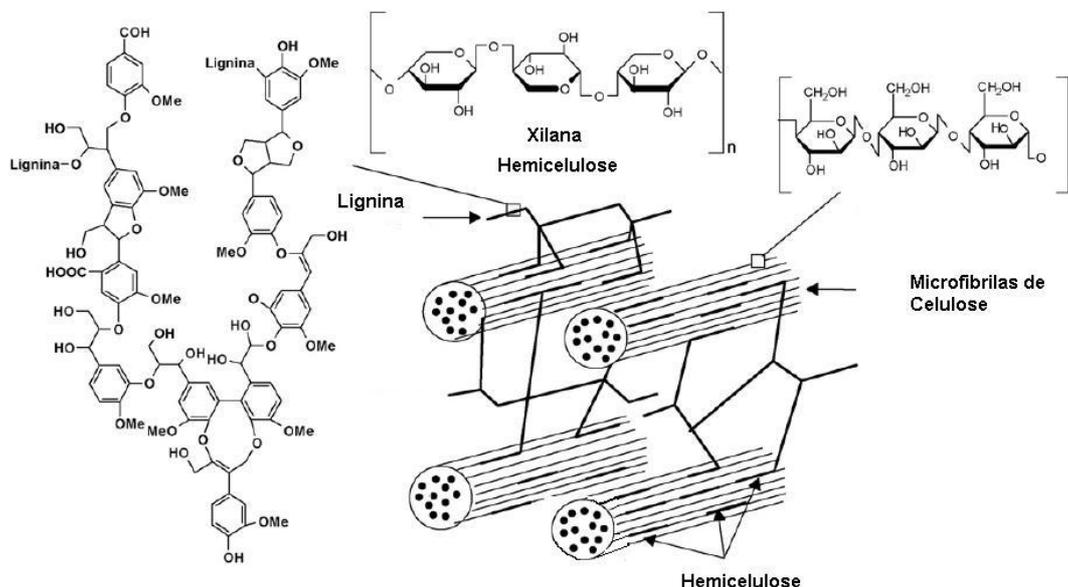
A hemicelulose é ligada fortemente à celulose por grupos de pontes de hidrogênio (RAVEN, 2001) e também através de ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais à parede da célula (POLIZEI et al., 2005).



### 2.6.4 Lignina

Necessária para a resistência à compressão hídrica e rigidez da parede celular, a lignina encontra-se nas células com funções mecânicas de sustentação e resistência à degradação microbiana (TUOMELA et al., 2000). À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a aumentar (RAVEN, 2001).

Composta por unidades de fenilpropano é considerada uma molécula amorfa, sendo que as subunidades não se acoplam de maneira regular e repetitiva, o que se credita ao mecanismo de biosíntese da lignina. Os diferentes tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano (Figura 3) (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).



**FIGURA 3.** Representação das fibras e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina. Adaptado de GRAMINHA et al., 2007.

## **2.7 Resíduos agroindustriais e materiais lignocelulósicos**

Cada vez mais existe a necessidade de utilizar matérias primas renováveis, bem como criar um uso adequado para a utilização de resíduos agroindustriais. Considerados recursos renováveis, possuem como principal virtude o seu baixo custo como matéria prima para outro processo além de poderem ser adquiridos em regiões próximas aos locais de processamento do material (THOMSEN, 2005). Devido à dificuldade de degradação de celulose em condições ambientais, resíduos celulósicos se acumulam o que os torna um transtorno para o meio ambiente. Estima-se que aproximadamente  $4 \times 10^9$  toneladas de celulose são geradas anualmente e que são degradadas no ambiente pela ação de microrganismos (ARO et al., 2005). A utilização da biomassa lignocelulósica provinda de resíduos da agricultura, reflorestamento e resíduos sólidos de esgotos podem trazer economia para a produção de combustíveis e outros produtos químicos, bem como redução de dejetos. Alguns dos resíduos agroindustriais possuem uma proporção de celulose e hemicelulose superior a 75 % em seu conteúdo, o que justifica o uso deste material na produção de celulases (ADSUL et al., 2004), ou bioconversão em metabólitos de alto valor agregado, como etanol.

### **2.7.1 Resíduos da indústria vinícola**

É considerado que mais de 20% do processo de fermentação da uva para fabricação do vinho são resíduos, sendo compostos pela casca, pedúnculo e sementes da uva. Capazes de gerar problemas ambientais, sua decomposição gera odores desagradáveis, atraindo insetos vetores de doenças, sendo

necessário à busca de um destino adequado para o mesmo. Dentre as diversas soluções para este problema, está a compostagem, digestão anaeróbia, pirólise (ARVANITTOYANNIS et al., 2006). A poda das videiras também libera material lignocelulósico e a queima do mesmo no campo é responsável pela formação de compostos tóxicos provindos da queima da lignina (THOMSEM, 2005).

### **2.7.2 Bagaço de cana de açúcar**

No Brasil, a produção de etanol com a utilização da cana de açúcar como matéria prima teve início em 1975, com o programa nacional do álcool. A produção de cana de açúcar no ano de 2003 foi de  $2,6 \times 10^8$  toneladas de cana de açúcar, com 324 usinas que processam a matéria prima para a produção de açúcar e álcool (BORRERO et al., 2003). A utilização do etanol como substituto a combustíveis fósseis e ao éter metil-terciário butílico (MTBE), aditivo cancerígeno presente na gasolina é realizado em países industrializados, como Estados Unidos da América (SUN & CHENG, 2002) e Brasil (GOLDEMBERG et al., 2008).

A aguardente é outro produto obtido da cana de açúcar, com a produção anual estimada em 1,3 bilhão de litros (ROSA et al., 2007). Como resíduo destes três produtos, existe o bagaço de cana de açúcar, com sua origem após a extração por pressão do suco da cana-de-açúcar e geralmente queimado na própria linha de produção para a geração de energia elétrica ou para aquecimento da água. O Brasil produziu em torno de  $4,36 \times 10^7$  toneladas de resíduo de cana de açúcar no biênio de 2005/2006 (GRAMINHA et al., 2007).

O bagaço de cana de açúcar tem na sua constituição aproximadamente 50% de celulose e o restante dividido igualmente entre lignina e hemicelulose e baixo

teor de cinza na sua composição (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003). Com o objetivo de melhorar o rendimento do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para o cultivo de fungos, a utilização de tratamentos químicos com hidróxido de sódio, amônia ou peróxido de hidrogênio tem sido utilizada, (PANDEY et al., 2000).

A utilização do bagaço de cana de açúcar é efetuada tanto em cultivos meio submerso ou em meio sólidos. Entre os metabólitos produzidos utilizando o bagaço de cana de açúcar como substrato estão celulases, lignases, xilanases, etanol, produção de aromas, ácido cítrico, ácido láctico dentre outros, sendo os produtos obtidos em ambos os modos de cultivo de perfil semelhante. Além disso, o bagaço de cana de açúcar pode ser utilizado como suporte para o crescimento de microrganismos, permitindo condições aeróbias homogêneas de crescimento (PANDEY et al., 2000).

### **2.7.3 Resíduos da cultura do arroz**

O Brasil é o 9º maior produtor mundial de arroz, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 50% da produção nacional, com a metade sul do estado responsável pela maior parte da produção. A produção do grão gerou um valor bruto de 4 bilhões de reais, correspondente a 2,84% do produto interno bruto estadual (MIRITIZ, 2007) .

A cultura de arroz é responsável pela liberação de pelo menos dois resíduos em abundância: a palha de arroz e a casca de arroz (THOMSEN, 2005). A composição da palha de arroz e da casca de arroz podem ser observadas na Tabela 2 e variam conforme a referência (GRAMINHA et al., 2007).

A utilização de resíduos provenientes da cultura do arroz para a produção de enzimas celulásicas e hemicelulásicas é descrita na literatura, como o cultivo semi-sólido de *A. niger* em palha de arroz (KANG et al., 2004), ou com o uso da casca de arroz em cultivo submerso pelo isolado *A. niger* PPI (PANDEY & PANDEY, 2002).

**TABELA 2.** Composição lignocelulósica da casca e da palha de arroz. Adaptado de GRAMINHA et al., 2007.

Composição (%)	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referências
Casca de Arroz	35	25	17	Couto & Sanromán, (2005)
Palha de Arroz	28-36	23-28	12-14	Couto & Sanromán, (2005)
	32-47	19-27	5-24	Karimi et al., 2006
	35,2	22,1	4,3	Prates 1995

#### 2.7.4 Casca de acácia negra

Introduzida no Brasil em 1928, no município de Estrela, Estado do Rio Grande do Sul e proveniente da África do Sul, a *Acacia mearnsii*, popularmente conhecida como Acácia Negra, pertence à família Leguminosae, servindo como matéria prima para a produção de taninos, necessários para a indústria de curtumes (VON POSER et al., 1990; BACKES & IRGANG, 2004; EMBRAPA, 2008). A produção de madeira para lenha, carvão vegetal e extração de celulose são outros produtos oriundos. Além disso, a acácia negra possui o papel ecológico de atuar como planta fixadora de nitrogênio em ambientes degradados (BACKES & IRGANG, 2004; EMBRAPA 2008). A área plantada de Acácia Negra no Brasil está em 140 mil a 200 mil hectares, sendo que no estado do Rio Grande do Sul o plantio está estimado entre 15 a 20 mil hectares (EMBRAPA 2008).

A cultura da acácia negra produz como resíduo, a casca da acácia negra, que pode ser explorado como matéria prima para a produção de enzimas lignocelulásicas.

## **2.8 Cultivo submerso de microrganismos**

O cultivo submerso de microrganismos, também conhecido como fermentação submersa, é um sistema capaz de gerar uma variedade de metabólitos em que os fungos filamentosos são de grande importância (PAPAGIANNI, 2004; GIBBS, et al., 2000). Dentre os produtos estão enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos (PAPAGIANNI, 2004), carotenóides, biotina (GIBBS et al., 2000), proteínas recombinantes (GIBBS et al., 2000; WANG et al., 2005; GRIMM et al., 2005) amino ácidos (GOMES & KUMAR, 2005).

Em relação ao cultivo semi-sólido, o cultivo submerso tem como vantagem a possibilidade de ter melhor racionalização e padronização do processo, o que é fundamental para a indústria (HOLKER & LENZ, 2005) além de permitir um sistema de cultura homogêneo (AGUILAR et al., 2004).

Contudo, para o sucesso do cultivo de fungos filamentosos em meio submerso, é necessário o estudo de diversas variáveis. Os constituintes físico-químicos do meio, como composição de nutrientes, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, forças mecânicas exercem mudanças na formação do micélio (PAPAGIANNI, 2004). O estudo de variáveis como a formação de pellets é fundamental, visto que para a produção de ácido cítrico por *A. niger* trata-se de um fator positivo, enquanto para a produção de amilase, a formação de pellets é prejudicial (GIBBS et al., 2000). Dentre os desafios para o cultivo submerso, estão os mecanismos de crescimento do fungo, a dinâmica de agregação do micélio, a fragmentação,

quantificação da morfologia e modelos matemáticos para o crescimento e formações de produtos do cultivo (PAPAGIANNI, 2004).

## 2.9 Gênero *Aspergillus*

Pertencente ao filo Ascomycota, o gênero *Aspergillus*, é de grande importância econômica. Sua primeira descrição foi realizada por Micheli, em 1729 (WARD et al., 2006). Credita-se ao gênero em torno de 250 espécies (KILICH, 2007) e ampla distribuição mundial, sendo disperso pelo ar em movimento ou junto a insetos, com a possibilidade de obter-se isolados em ar, solo e água (HEDAYATI et al., 2007). Além de ser um microrganismo saprófito, com a maioria dos seus membros responsáveis pela degradação de polissacarídeos de plantas (WARD 2006, et al.) alguns membros do gênero são patogênicos, responsáveis por enfermidades em animais e plantas (KLICH, 2007).

Na agricultura, *Aspergillus flavus* é descrito como fitopatógeno em culturas como milho, amendoim, algodão e tabaco. Outro problema acarretado pelos membros do gênero *Aspergillus* é a produção de micotoxinas. Consideradas metabólitos secundários e danosos ao seres humanos e animais, as micotoxinas são compostos hepatocancerosos, teratogênicos, mutagênicos e imunossupressores (HEDAYATI et al., 2007; KLICH, 2007; HOELTZ 2005).

Dentre as espécies citadas na literatura capazes de secretar as micotoxinas estão *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus wentii*. O tipo e o número de toxinas variam de espécie para espécie, sendo que um isolado pode produzir mais de uma toxina. Dentre as micotoxinas produzidas,

estão a aflotoxina, ocratoxina, ácido kojico, ácido asperlegico e ácido ciclopiazônico (HOELTZ, 2005; HEDAYATI et al., 2007).

Outro problema de saúde causado pelo *Aspergillus* é a aspergilose. HOPE et al. (2005), consideram pelo menos 33 espécies do gênero são responsáveis por infecções invasivas e alergias, entre elas, as espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, e *Aspergillus niger*, e menos comumente *Aspergillus nidulans*. Dentre as síndromes invasivas, a aspergilose invasiva pulmonar tem aumentado nas últimas duas décadas, devido à extensão do uso de agentes quimioterápicos e imunossupressores. Há predominância dos casos de aspergilose invasiva pulmonar ocorre em pacientes portadores da Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida (AIDS), pacientes recém transplantados e com problemas hematológicos reforçam a importância do estudo de aspergilosis, bem como a necessidade de prevenção da mesma (ZMEILI & SOUBANI, 2007).

Apesar de existirem espécies patogênicas, o gênero se faz presente na área de alimentos e na microbiologia industrial com aspectos positivos, de modo que as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* são considerados microrganismos seguros, segundo o Food and Drug Administration (FDA), órgão responsável pelo controle de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América, recebendo a denominação Generally Recognized as Safe (GRAS) (GRIMM et al., 2005; WARD et al., 2006). Industrialmente, o gênero está presente na fabricação de enzimas, fármacos, antibióticos e na fermentação de alimentos (BENNET, 1998; GIBBS et al., 2000; PAPAGINNI, 2004; WARD et al., 2006).

Entre os produtos, a produção de ácido cítrico é de grande destaque, presente na indústria farmacêutica e química. A maior parte da produção

comercial de ácido cítrico é realizada pela fermentação por *Aspergillus*, sendo produzidos mais de 200 g/L em períodos de 5-7 dias de fermentação (WARD et al., 2006).

Produção de diversas enzimas é descrita na literatura, entre  $\alpha$ -Amilases, Celulases, Xilanases,  $\beta$ -Glicosidases, Lípases, Invertase (WARD et al., 2006). Na tabela 3 é possível observar alguns processos e produtos provindos do cultivo do gênero. Também existe a produção de proteínas recombinantes, tanto de origem fúngica como não fúngica, utilizando o fungo *Aspergillus* como hospedeiro. Dentre estas, estão glicoamilase, quimiosina bovina, lactoferina humana, lisozima de ovos de galinha, interleucina humana 6 e taumatina (WANG et al., 2005 ).

**TABELA 3.** Produtos e processos com a participação do gênero *Aspergillus*.

Produto ou Processo	Espécie	Referência
Miso (Comida fermentada asiática)	<i>A. oryzae</i>	BENNETT (1998) KITANO et al., (2002) ESPOSITO & AZEVEDO (2004)
Molho shoyu	<i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i> .	BENNETT (1998)
Saque (Bebida fermentada de arroz)	<i>A. oryzae</i>	YAMANE et al., (2002)
Mevalonina (farmáco)	<i>A. terrus</i>	BENNETT (1998), WARD et al., (2004)
$\alpha$ -Amilase	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	BENNETT (1998) PAPAGINNI (2004)
Glicose oxidase	<i>A. niger</i>	BENNETT (1998) PAPAGINNI (2004)
Celulase	<i>A. niger</i> , <i>A. sojae</i> , <i>A. terrus</i>	PAPAGINNI (2004)
Tanase	<i>A. niger</i>	PAPAGINNI (2004) WARD et al., (2006)
Equinocandina B (Antibiótico)	<i>A. nidulans</i>	PAPAGINNI (2004)
Penicilinas (Antibiótico)	<i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i>	PAPAGINNI (2004)
Ciclosporina A	<i>A. terrus</i>	WARD et al., (2004)
Biotina	<i>A. oryzae</i>	GIBBS et al. (2000)
Ácido Cítrico	<i>A. niger</i> , <i>A. phoenicis</i> , <i>A. citricus</i>	BENNETT (1998), PAPAGINNI (2004), WARD et al., (2004)
Xilanases	<i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. oryzae</i>	WARD et al., 2006
Ácido Itaconico	<i>A. terrus</i>	BENNETT (1998) PAPAGINNI (2004)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Selecionar um microrganismo da coleção do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), capaz de produzir celulasas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Seleção de um microrganismo produtor de celulasas;
- Seleção de um meio de cultivo para a produção de celulasas, buscando a utilização de resíduos agroindustriais;
- Otimização do meio de cultivo visando à produção de enzimas celulásicas;
- Caracterização da atividade enzimática bruta quanto à temperatura e pH ótimos, termoestabilidade e presença de sais e reagentes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e Manutenção

Para etapa de seleção do microrganismo produtor de celulases foram utilizados seis fungos filamentosos presentes na coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA da UFRGS (Tabela 4).

As culturas foram preservadas em meio de cultura Ágar Sauboraud (Vetec) ou Ágar Batata (Biobras), em tubos inclinados, a temperatura de 4 °C, sendo semeados a cada três meses.

**TABELA 4.** Fungos filamentosos testados e seus respectivos meios de cultivo utilizados.

Isolado	Meio de Cultivo
<i>Penicillium stoloniformum</i>	Ágar Sauboraud
<i>Penicillium sp</i> isolado 17/3	Ágar Sauboraud
<i>Penicillium sp</i> isolado 20/4	Ágar Sauboraud
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Ágar Batata
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Ágar Sauboraud
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ágar Batata

### 4.2 Suspensão de esporos

Cada cultura foi semeada ao meio correspondente de manutenção, em placas de Petri, incubadas a 30 °C durante o tempo necessário para a esporulação de cada microrganismo (7-10 dias). Após, os esporos foram

suspensos do meio de cultura aderido à placa com água destilada estéril e auxílio de um alça de Drigalsky previamente flambada. O material foi coletado com capilares Pasteur estéreis e colocado em tubos estéreis, sendo centrifugados durante 7 minutos a 7000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado ressuspenso novamente em aproximadamente 5 mL água destilada estéril.

Para verificar a ausência de microrganismos contaminantes nas suspensões de esporos, 10 µL de cada suspensão foram inoculados em tubos com aproximadamente 3 ml de caldo nutriente. Os tubos foram incubados a temperatura de 30 °C durante 24 horas.

A determinação da concentração de esporos em cada suspensão foi determinada através da contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

### **4.3 Seleção dos fungos filamentosos**

A partir das suspensões de esporos dos fungos presentes na tabela 4, foram inoculados  $10^6$  esporos/mL em meio com 1% Carboximetilcelulose (CMC) + 0,5% Peptona, previamente com o pH ajustado em 6,0 e autoclavado a 121 °C e 104 kPa e durante 15 minutos.

O cultivo foi realizado em duplicata em frascos erlenmeyer de 500 mL, com 100 mL de meio de cultura, durante 72h a 30 °C em agitação orbital (125 rpm), sendo retiradas as amostras assepticamente em capela de fluxo vertical durante os períodos de 24, 48 e 72 horas. Foram coletados 7 mL de amostra em tubos tipo falcon. Para a retirada do micélio, as amostradas foram filtradas a vácuo em papel filtro e transpostas a outros tubos e congeladas.

Para a realização da diálise, as amostras foram então descongeladas e dialisadas (item 4.4) e ensaiadas para a atividade de celulasas totais (4.5.1) e endoglicanases (4.5.2).

#### **4.4 Diálise das amostras**

As membranas de diálise foram fervidas em solução aquosa de carbonato de cálcio 1% e EDTA 0,1% durante 30 minutos. Transcorrido o tempo, foram lavadas exaustivamente com água destilada e conservadas em etanol 70% em refrigeração (4 °C).

As amostras foram dialisadas para a retirada dos açúcares redutores totais que pudessem interferir na determinação enzimática. As amostras foram dialisadas overnight (aproximadamente 18 horas) contra tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 em volume de 6 litros.

#### **4.5 Determinação da atividade enzimática**

Para determinação da atividade enzimática de celulasas totais na etapa de seleção dos fungos filamentosos, foram ensaiadas a atividade de celulasas totais e endoglicanases.

##### **4.5.1 Determinação da atividade de celulasas totais**

A determinação da atividade de celulasas totais foi realizada conforme Ghose (1987). Em um tubo de ensaio, com uma tira de papel Whatman N°1, de 1,0 x 6,0 cm, foram pipetados 0,5 mL de amostra e 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. A reação foi incubada a temperatura de 50°C durante 60 minutos. Terminado o tempo de incubação, 3 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram adicionadas aos tubos, que foram fervidos durante 5

minutos, sendo então adicionados 20 mL de água destilada. A reação foi homogeneizada com ajuda de um vórtex. A absorbância da reação foi medida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. Para o branco total, a amostra foi substituída pelo tampão do ensaio. Como branco de amostra, o ensaio foi efetuado com 1 mL de tampão e 0,5 mL de amostra, sem a presença do substrato. O valor obtido da absorbância do branco de amostra foi subtraído de cada um dos valores da absorbância dos ensaios que compõem a triplicata. Os valores obtidos da subtração foram então comparados a uma curva padrão de glicose (0-5 mg/mL) (Tabela 5). Uma unidade enzimática foi definida como 1  $\mu$ mol de glicose liberado por mL por minuto no período do ensaio, sendo expressa em FPU (Filter Paper Units).

#### **4.5.2 Determinação da atividade de endoglicanases**

A determinação da atividade de endoglicanases foi realizada conforme Ghose (1987). Neste ensaio, 0,5 ml de amostra foram incubados a temperatura de 50°C durante 30 minutos em 0,5 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 50 mM. A reação foram adicionados 0,5 mL do substrato CMC 2%, solubilizada no mesmo tampão que o do ensaio. As amostras foram incubadas a temperatura de 50 °C, durante 30 minutos. Após, foram adicionados 3 mL do reagente DNS. As amostras foram fervidas durante 5 minutos e então 20 mL de água destilada foram adicionadas aos tubos, sendo então homogeneizados. A absorbância da reação foi medida no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro.

Como branco total, foi utilizado o tampão do ensaio no lugar da amostra. Em cada ensaio também foi realizado um branco de amostra, constituído por 1 mL de tampão e 0,5 mL de amostra. O valor da absorbância obtido do branco de

amostra foi descontado dos valores obtidos das leituras das amostras ensaiadas. Este valor foi comparado a uma curva padrão de glicose com a concentração de 0-5 mg/mL (Tabela 5). Cada amostra foi ensaiada em triplicata. Uma unidade enzimática foi determinada a liberação de 1  $\mu$ mol de glicose liberado no período do ensaio por minuto.

#### 4.5.3 Curva Padrão Glicose

A curva padrão de glicose para os ensaios de celulases totais e endoglicanases foi realizada conforme a tabela 5. A glicose utilizada para a elaboração o padrão foi mensurado em balança analítica e solubilizada em água destilada. Foram pipetados 0,5 mL de cada ponto da curva em tubos de ensaios e adicionados 1 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 50 mM (Tabela 5).

**TABELA 5.** Curva padrão de glicose para os ensaios de celulases totais e endoglicanases.

Padrão (mL) (5 mg/mL)*	Tampão citrato de Sódio 50 mM pH 4,8 (mL)	mg de glicose	mg de glicose/mL	$\mu$ mol de glicose
0	0,5	0	0	0
0,05	0,45	0,25	0,5	1,38
0,1	0,4	0,5	1	2,77
0,15	0,35	0,75	1,5	4,16
0,2	0,3	1	2	5,49
0,25	0,25	1,25	2,5	6,86
0,3	0,2	1,5	3,0	8,23
0,35	0,15	1,75	3,5	9,60
0,4	0,1	2	4,0	10,97
0,45	0,05	2,25	4,5	12,34
0,5	0	2,5	5	13,71

\*A cada ponto do padrão da tabela foram adicionados um mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 50 mM.

#### 4.5.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -glicosidases

A avaliação da atividade  $\beta$ -glicolítica foi determinada com a utilização do substrato cromogênico *p*-nitrophenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ G). Em um microtubo foram pipetados 90  $\mu$ L de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), 10  $\mu$ L da solução de pNP $\beta$ G (4 mg/mL) e 100  $\mu$ L do sobrenadante. Transcorrido os 20 minutos do ensaio, a 50°C foram então pipetados 1 mL de 500 mM CaCO<sub>3</sub>. A reação foi lida em espectrofotômetro, na absorvância de 405 nm, quantificando o *p*-nitrofenol liberado ( $\epsilon = 18,700$ ). Para o branco total, o tampão da reação foi utilizado no lugar da amostra.

Uma unidade enzimática foi determinada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1  $\mu$ mol de pNP $\beta$ G liberado por minuto.

#### 4.6 Análise Estatística dos Dados

Os valores obtidos das atividades enzimáticas de celulases totais e endoglicanases foram analisados utilizando o software Statistica 6.0. (Statsoft Inc.), realizando análise de variância (ANOVA) por comparação e posteriormente foi aplicado o teste de Tukey.

#### 4.7 Seleção de substratos para a produção de celulases

Selecionado o fungo filamentosos para a produção de celulases, a próxima etapa consistiu na escolha de um meio de cultivo utilizando como fonte de carbono resíduos agroindustriais. Foram testadas seis fontes de carbono, CMC, como meio de referência e cinco resíduos agroindustriais: resíduo de uva, casca

de acácia negra, casca de acácia negra tratada, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz.

Para cada um dos meios de cultivo, os resíduos foram utilizados na concentração de 1% e ao meio foram adicionados 0,5% de peptona ou 0,5 % de proteína de soja como fontes complementares de nutrientes (Tabela 6).

Os meios de cultivo foram ajustados para pH 7,0 antes da autoclavagem, sendo o volume final, de cada meio, fixado em 100 mL. A esterilização do meio de cultivo foi realizada durante 15 minutos a 121 °C de temperatura e 104 kPa de pressão.

Para o inóculo dos meios, foram utilizadas suspensões de esporos obtidas conforme o item 4.2. Foram inoculados  $10^6$  esporos/mL de *A. phoenicis* em cada meio. O cultivo transcorreu durante o período de 96 horas, a temperatura de 30°C e 125 rpm em incubadora com agitação. Cada meio de cultivo da tabela 6 foi cultivado em duplicata.

Foram retirados assepticamente 7 mL da amostra de cada erlenmeyer, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram filtradas a vácuo em papel filtro Whatman N°1, para retirada do micélio e o ensaio enzimático foi realizado em triplicata para a determinação de celulases totais, endoglicanases, açúcares redutores totais e proteínas solúveis totais. Para determinar o pH, foi utilizado o volume total da amostra.

#### **4.8 Tratamento alcalino da casca de acácia negra**

Para o tratamento químico da casca de acácia negra, 20 g do substrato foi autoclavado em uma solução aquosa de NaOH 4%, durante 30 minutos a 121 °C

e 104 kPa. Após a autoclave, a solução foi desprezada e a casca da acácia foi lavada com água destilada para a remoção do hidróxido de sódio residual. As trocas da água destilada foram realizadas até atingir o pH neutro, sendo utilizados aproximadamente 2800 mL de água destilada. Após, o substrato foi seco em estufa a 45 °C durante 48 horas.

**TABELA 6.** Meios testados para a seleção produção de celulases por *A. phoenicis*.

Meio de Cultivo
1% CMC + 0,5% Peptona
1% CMC + 0,5% Proteína de Soja
1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona
1% Resíduo de Uva + 0,5 Proteína de Soja
1% Casca de Acácia Negra + 0,5% Peptona
1% Casca de Acácia Negra + 0,5% Proteína de Soja
1% Casca de Acácia Negra Tratada + 0,5% Peptona
1% Casca de Acácia Negra Tratada + 0,5% Proteína de Soja
1% Bagaço de Cana de Açúcar 1% + 0,5% Peptona
1% Bagaço de Cana de Açúcar 1% + 0,5% Proteína de Soja
1% Casca de Arroz + 0,5% Peptona
1% Casca de Arroz + 0,5% Proteína de Soja

#### 4.8.1 Determinação da atividade enzimática

Nesta etapa, as atividades enzimáticas de celulases totais e endoglicanases foram determinadas conforme o item 4.5.

#### 4.8.2 Determinação de açúcares redutores totais

Foram pipetados 100 µL de amostra em tubos de ensaio e adicionados 1 mL do reagente de DNS. As amostras foram aquecidas em banho maria durante 5 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em

triplicata, e a média aritmética e desvio padrão calculados. A quantidade de açúcares redutores foi comparada a curva padrão de glicose (5 mg/mL).

#### 4.8.2.1 Solução DNS

A solução DNS foi preparado solubilizando 0,25 g de Ácido 3,5 Dinitrosalicílico, 75 g de Tartarato de Sódio e Potássio em 50 mL de NaOH 2M. Após, a solução resultante foi diluída até o volume final de 250 mL com água destilada.

#### 4.8.2.2 Curva padrão de glicose para açúcares redutores totais

A glicose utilizada para a elaboração da curva padrão foi pesada em balança analítica. O açúcar foi solubilizado em água destilada, com a concentração final de 5 mg/mL. Após o padrão foi diluído, conforme a tabela 7.

**TABELA 7.** Curva padrão de glicose para açúcares redutores totais.

Padrão Glicose (5 mg/mL) (mL)	Água Destilada (mL)	Concentração de Glicose (mg/mL)
0	1	0
0,1	0,9	0,5
0,2	0,8	1,0
0,3	0,7	1,5
0,4	0,6	2,0
0,5	0,5	2,5
0,6	0,4	3,0
0,7	0,3	3,5
0,8	0,2	4,0
0,9	0,1	4,5
1	0	5,0

Foram pipetados 100 µL de cada diluição em tubos de ensaio e adicionados 1 mL do reagente DNS a cada tubo. Os tubos foram aquecidos em banho-maria durante 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente. Após foram lidos em

espectrofotômetro a absorvância de 540 nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para a curva padrão, calculada com o programa ORIGIN 5.0.

#### **4.8.3 Determinação da concentração de proteínas solúveis**

Para a análise da concentração de proteínas solúveis totais, foi utilizado o método descrito por LOWRY et al., (1951). Trabalhou-se com dois reagentes: o reagente combinado (RC) constituído por 0,5 mL de 5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 1% tartarato de sódio e potássio tetraidratado adicionados a 50 mL de solução de 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em NaOH 0,1M. O segundo reagente foi o de Folin-Ciocalteu (FC) (POLIPUR), diluído 1:1 em água destilada.

Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de amostra e 2,5 mL do reagente combinado em tubos de ensaio, deixando a reação a 37 °C durante 10 minutos. Transcorrido o tempo, adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  do reagente diluído de FC, deixando-o a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para o branco total foi utilizada água destilada no lugar de amostra. As reações foram realizadas em triplicata para cada ponto coletado, mediu-se a absorvância em 750 nm em espectrofotômetro.

Os valores obtidos foram comparados a um curva padrão de Albumina Sérica Bovina com concentração de 0-1 mg/mL .

##### **4.8.3.1 Curva padrão albumina sérica bovina**

A Albumina Sérica Bovina (BSA) foi pesada em balança analítica, sendo solubilizada e homogenizada em água destilada, com sua concentração final de 1 mg/mL. Após foram realizadas diluições decimais conforme Tabela 8 em microtubos.

**TABELA 8.** Curva Padrão de Albumina Sérica Bovina.

Padrão BSA (1 mg/mL) (mL)	Água Destilada (mL)	Concentração (mg/mL)
0	1	0
0,1	0,9	0,1
0,2	0,8	0,2
0,3	0,7	0,3
0,4	0,6	0,4
0,5	0,5	0,5
0,6	0,4	0,6
0,7	0,3	0,7
0,8	0,2	0,8
0,9	0,1	0,9
1	0	1,0

Foram então coletados 100 µL de cada ponto da curva e pipetados em tubos de ensaio. Adicionou-se 2,5 mL do reagente combinado, conforme a seção 4.9.3 e incubando os a 37 °C durante 10 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram então adicionados 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau. A leitura da reação foi efetua a 750 nm em espectrofotômetro.

#### **4.9 Determinação do pH**

As amostras tiveram seu pH determinado utilizado o potenciômetro modelo Handylab I, Schoot Glaswerke Mainz.

#### **4.10 Produção e otimização de celulases com o uso do planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta**

Após a seleção do meio de cultura baseado em resíduos agroindustriais, a próxima etapa do trabalho consistiu em avaliar a variação dos substratos resíduos de uva e peptona para produção de enzimas celulolíticas. Para isto, foi efetuado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, em configuração de estrela completo, com quatro repetições nos pontos centrais, totalizando 12 combinações. Foram propostos

cinco níveis para as variáveis independentes (Resíduo de Uva e Peptona), sendo as variáveis independentes as atividades enzimáticas de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. A Tabela 9 apresenta os valores codificados dos substratos.

**TABELA 9:** Codificação das variáveis para o planejamento fatorial  $2^2$ .

Experimento	(X <sub>1</sub> ) Resíduo de Uva*	(X <sub>2</sub> ) Peptona*
1	(-1) 5	(-1) 2,5
2	(-1) 5	(+1) 7,5
3	(+1) 15	(-1) 2,5
4	(+1) 15	(+1) 7,5
5	(0) 10	(0) 5
6	(0) 10	(0) 5
7	(0) 10	(0) 5
8	(0) 10	(0) 5
9	(0) 10	(-1,41) 1,5
10	(0) 10	(+1,41) 8,5
11	(-1,41) 3	(0) 5
12	(+1,41) 17	(0) 5

\*São apresentados os valores reais e codificados (entre parênteses) para variáveis independentes (Resíduo de Uva e Peptona).

O experimento foi realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL de meio de cultivo. O crescimento ocorreu em 120 horas à temperatura de 30 °C em agitador de plataforma com 120 rpm. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro para a separação do micélio e o sobrenadante posteriormente analisado para as variáveis dependentes, conforme o item 4.5.

#### 4.11 Caracterização das atividades enzimáticas

Nesta etapa, o *A. phoenicis* foi cultivado em meio de cultura com 1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona, durante o período de 96 horas, a 30 °C e 120 rpm. Ao final do período de cultivo, o sobrenadante foi separado do micélio com papel filtro e congelado.

#### **4.11.1 Temperatura ótima das atividades enzimáticas**

Para determinar a temperatura ótima de atividade enzimática de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. As atividades de celulases totais e endoglicanases foram quantificadas conforme os itens 4.5.1 e 4.5.2. A atividade de  $\beta$ -glicosidases seguiu o item 4.5.4, mas o tempo do ensaio foi de 10 minutos. As temperaturas avaliadas foram de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C.

#### **4.11.2 pH ótimo das atividades enzimáticas**

Para verificar o pH ótimo das atividades enzimáticas, foram utilizados os tampões citrato de sódio 50 mM, pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; Tris HCl 50 mM 8,0 (seção 4.5.1), para as atividades de celulases totais e endoglicanases (seção 4.5.2). Para a atividade de  $\beta$ -glicosidases, o ensaio foi efetuado conforme a seção, 4.5.4, mas com 10 minutos para o tempo do ensaio. Para o ensaio de endoglicanases o substrato foi solubilizado no tampão do ensaio, sem qualquer outra alteração.

#### **4.11.3 Termoestabilidade das atividades enzimáticas**

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se o sobrenadante bruto durante os períodos de 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos em temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C. Após este período de incubação, foram realizados ensaios enzimáticos de celulases totais e endoglicanases conforme as seções 4.5.1 e 4.5.2. O ensaio de  $\beta$ -glicosidases foi realizado conforme o item 4.5.4, mas o tempo do ensaio foi de 10 minutos.

#### **4.11.4 Efeito de sais e reagentes**

Para determinar os efeitos da adição de íons e reagentes para atividade enzimática presente ao sobrenadante bruto de meio de cultivo, foram utilizados os sais e reagentes presentes nas Tabelas 20 e 21.

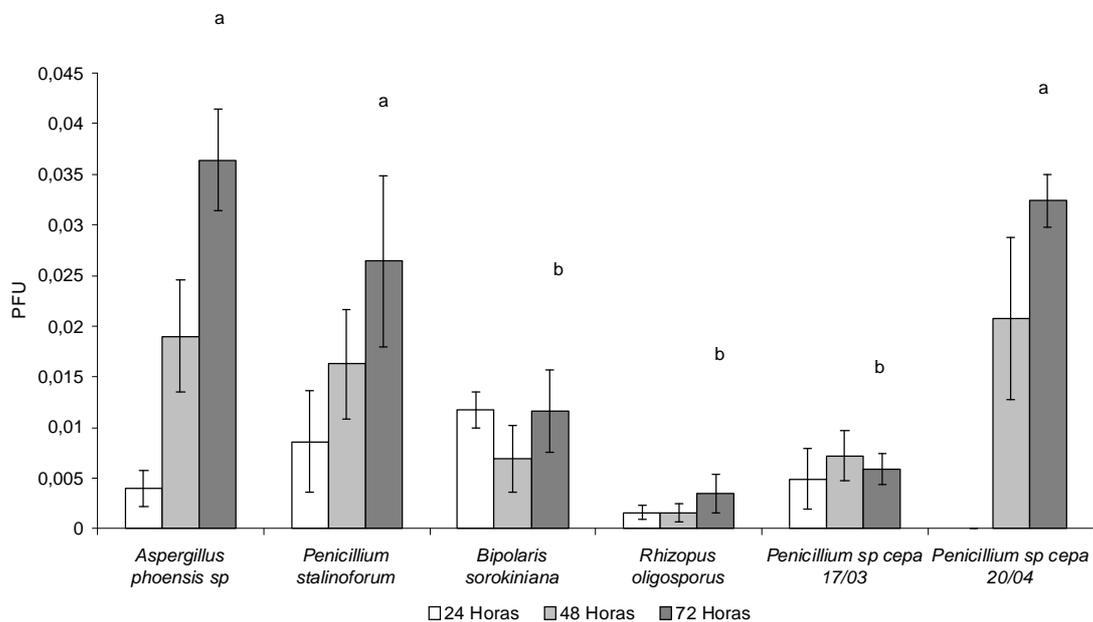
O ensaio de celulases totais foi realizado conforme o item 4.5.1., enquanto o de endoglicanases, conforme o item 4.5.2. Os valores das atividades foram comparados ao do tubo controle, com o ensaio padrão, sem a presença de sais e outros reagentes.

A determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidases foi realizada conforme o item 4.5.4. Para o branco de amostra, foi retirado o substrato e o volume completado com o tampão do ensaio. O branco total foi determinado com a retirada da amostra e o uso do tampão no lugar da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores das atividades foram comparados a o tubo controle, com o ensaio padrão, sem a presença de sais e outros reagentes.

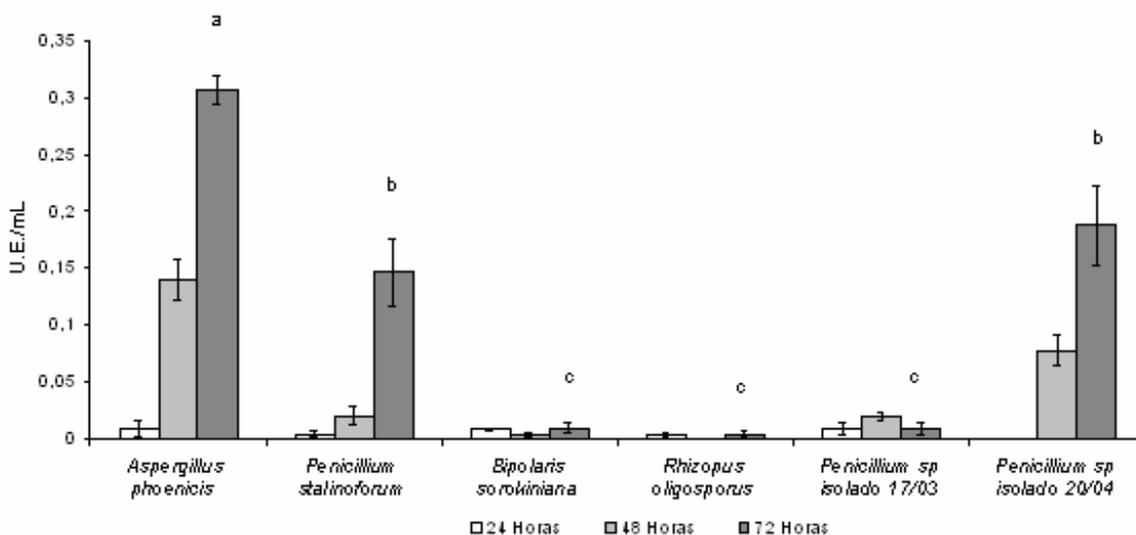
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção dos fungos filamentosos

Dos seis fungos testados em meio com CMC 1% + Peptona 0,5%, os isolados *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium stalinoforum* e *Penicillium sp* isolado 20/4 tiveram atividades enzimáticas superiores aos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Bipolaris sorokiniana* e *Penicillium sp* isolado 17/3 para o ensaio com celulases totais, segundo o teste de Tukey com  $p < 0,01\%$  (Figura 4), realizado sobre as atividades enzimáticas determinadas após 72 horas de cultivo. O fungo *A. phoenicis* demonstrou a mais elevada atividade enzimática para endoglicanases, superior aos demais. O teste estatístico de Tukey foi novamente utilizado para as atividades enzimáticas de 72 horas, sendo selecionado para a etapa de investigação de seleção de meios de cultivo (Figura 5).



**FIGURA 4.** Atividade de celulases totais produzidas por diferentes fungos, com amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas. Teste estatístico relacionado às atividades enzimáticas coletadas após 72 horas de cultivo. Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente para o teste de Tukey com  $p < 0,01$ .



**FIGURA 5.** Atividade de endoglucanases produzidas pelos diferentes fungos, com amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas. Teste estatístico relacionado às atividades enzimáticas coletadas após 72 horas de cultivo. Médias seguidas nas mesmas letras não diferem significativamente para o teste de Tukey com  $p < 0,01$ .

O fungo *Rhizopus oligosporus* tem histórico de ser utilizado na indústria de alimentados fermentados. A fermentação de feijões de soja por fungos do gênero *Rhizopus* é responsável pelo Tempeh, um bolo a base de soja e outros cereais, alimento tradicional na Indonésia (NOUT & KIERS, 2005). Na pesquisa de enzimas, a produção de proteases com atividade enzimática em pH ácidos e neutro já foram descritas pelo gênero (SUMANTHA et al., 2005), assim como a produção de lipases, xilanases (GOULART et al., 2005), fitase (RAMACHANDRAN, et al., 2005). VARZAKAS (1998) detectou atividade de celulasas usando CMC e papel filtro como substratos durante a fermentação do Tempeh pelo fungo. A atividade de celulasas foi baixa durante os períodos de 0, 12, 24, 30 e 36 horas de fermentação. Com 40 horas de cultivo, foi possível observar que atividade enzimática foi inferior às preparações comerciais de *Trichoderma viride* acrescentadas ao cultivo, tanto para endoglicanases como para celulasas totais, mas superior à outra preparação comercial com celulasas de *A. niger*. Esta atividade foi relacionada com a penetração do micélio do fungo dentro da parede celular dos grãos de soja. Embora o fungo tenha produzido celulasas, a atividade enzimática demonstrou estar ligada mais ao preparo de um alimento tradicional, o qual o *R. oligosporus* foi selecionado com o passar dos anos, do que a produção de celulasas propriamente dita.

A produção de enzimas celulásicas pelo *B. sorokiniana*, no presente trabalho foi detectada ao longo das 72 horas, utilizando papel filtro e CMC como substratos. A atividade de endoglicanases extracelulares foi detectada por GEIMBA et al. (1999), no mesmo tempo de cultivo, contudo, atividades superiores foram encontradas após 12 dias de cultivo. Atividades de  $\beta$ -glicosidases e

celobiohidrolases também foram detectadas, com suas maiores atividades detectadas também após 12 dias de cultivo. Portanto, a baixa atividade em comparação aos fungos *A. phoenicis*, *P. stalinoforum* e *Penicillium* isolado 20/4 e o tempo elevado para a produção de celulases foram determinantes na não seleção do *B. sorokiniana*.

Dos três fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* testados, dois demonstraram atividades enzimáticas elevadas dentre os seis fungos testados contudo, ainda inferiores ao *A. phoenicis* para atividade de endoglicanases. A literatura relata que o gênero *Penicillium* possui um grande número de isolados capazes de secretar enzimas celulolíticas (BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002; NG, 2004). Entretanto, RUEGGER & TAU-K-TORNISIELO (2004) obtiveram um grande número de isolados deste gênero, e os testaram em relação à atividade celulásica. Foi possível observar nos resultados diferenças das atividades enzimáticas entre isolados do mesmo gênero, o que demonstra que nem todos os membros de um mesmo gênero possuem o mesmo potencial para a produção de enzimas, como visto na seleção realizada neste trabalho. A pesquisa de complexos enzimáticos capazes de degradar a celulose e a hemicelulose em *Penicillium* cresce, pois se trata de um gênero com grande potencial, contudo ainda não devidamente investigado tanto como o gênero *Trichoderma* (JØRGENSEN et al., 2003). Portanto, embora tenha demonstrado atividades enzimáticas inferiores ao *A. phoenicis*, os isolados de *Penicillium* estudadas são promissoras para estudos posteriores.

O *A. phoenicis* demonstrou a melhor atividade entre os seis fungos. O gênero *Aspergillus* está amplamente relatado na literatura como produtor de

celulases (STEWART & PARRY, 1981; BHAT & BHAT, 1997; LYND et al., 2002; NG, 2004; KANG et al., 2004; BOTELLA et al., 2005; MAMMA et al., 2007). O *A. phoenicis* em especial, é descrito como um bom produtor de  $\beta$ -glicosidases, o que demonstra o potencial do mesmo como o fungo selecionado para a produção de enzimas celulásicas (DESCHAMPS & HUET, 1984; DUFF et al., 1986; JÄGER et al., 2001; FLACHNER & RÉCZEY, 2004; WEN et al., 2005). O fungo então foi selecionado para a próxima etapa do trabalho, consistindo na busca por um substrato baseado em resíduos agroindustriais para a produção de um complexo celulásico.

## **5.2 Seleção de meios de cultura**

Com o objetivo de selecionar um resíduo agroindustrial adequado para a produção de celulases pelo *A. phoenicis*, foram testadas 12 variações de meios de cultivo. As culturas foram realizadas em cultivo submerso por um período de 96 horas de cultivo. Além das atividades enzimáticas de celulases totais e endoglicanases, foram mensuradas a concentração de açúcares redutores totais, proteína solúvel total e pH, buscando obter-se uma caracterização parcial do meio de cultura.

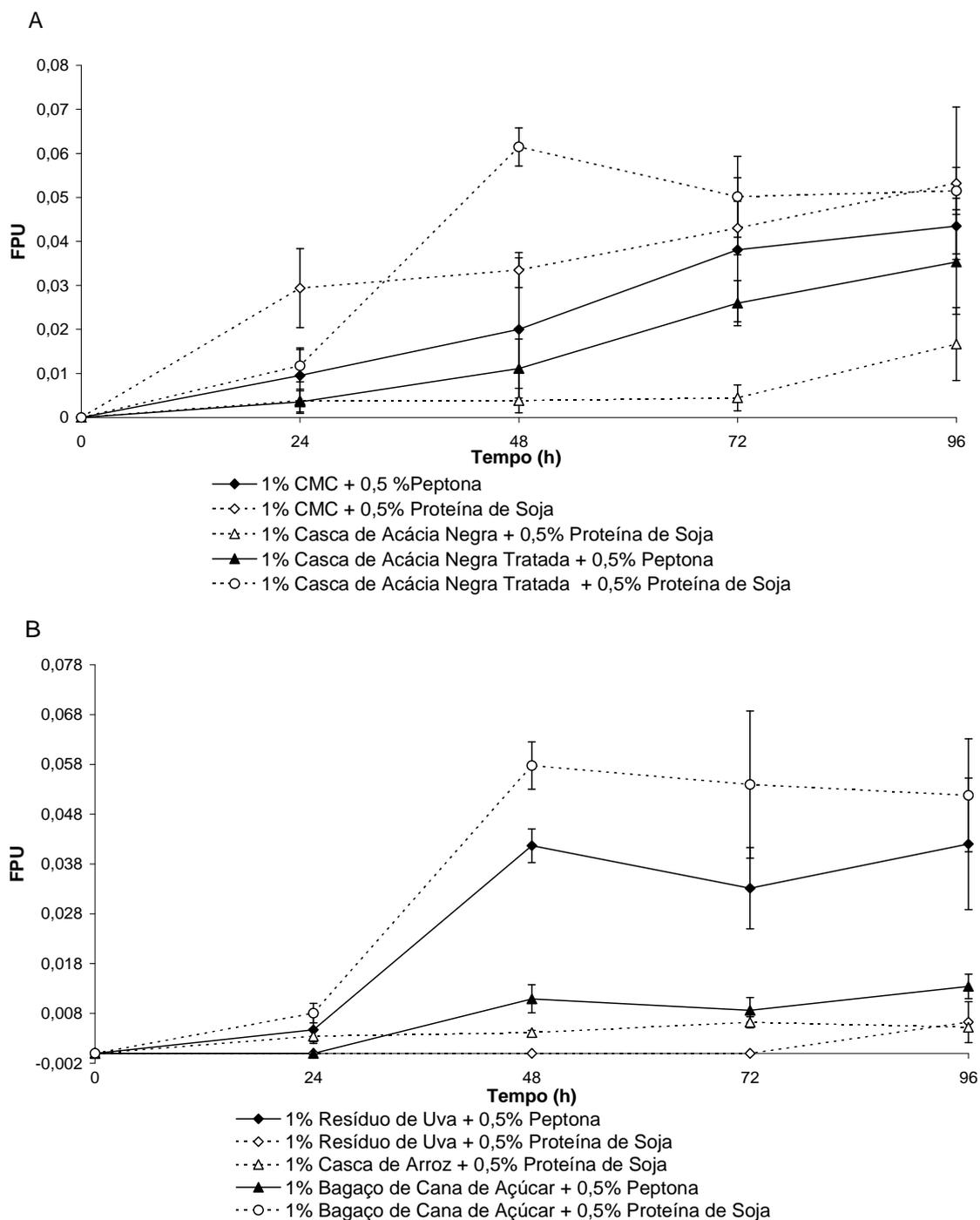
## **5.3 Atividade enzimática de celulases totais e endoglicanases**

A utilização de meio baseados em resíduos agroindustriais foi promissora tanto para a produção de celulases totais como de endoglicanases. A cinética de produção de celulases com os diferentes substratos pode ser observada nas figuras 6A e 6B. Na figura 6A, observa-se que o resultado da atividade enzimática de celulases totais no meio 1% Casca de Acácia Negra Tratada + 0,5% Proteína

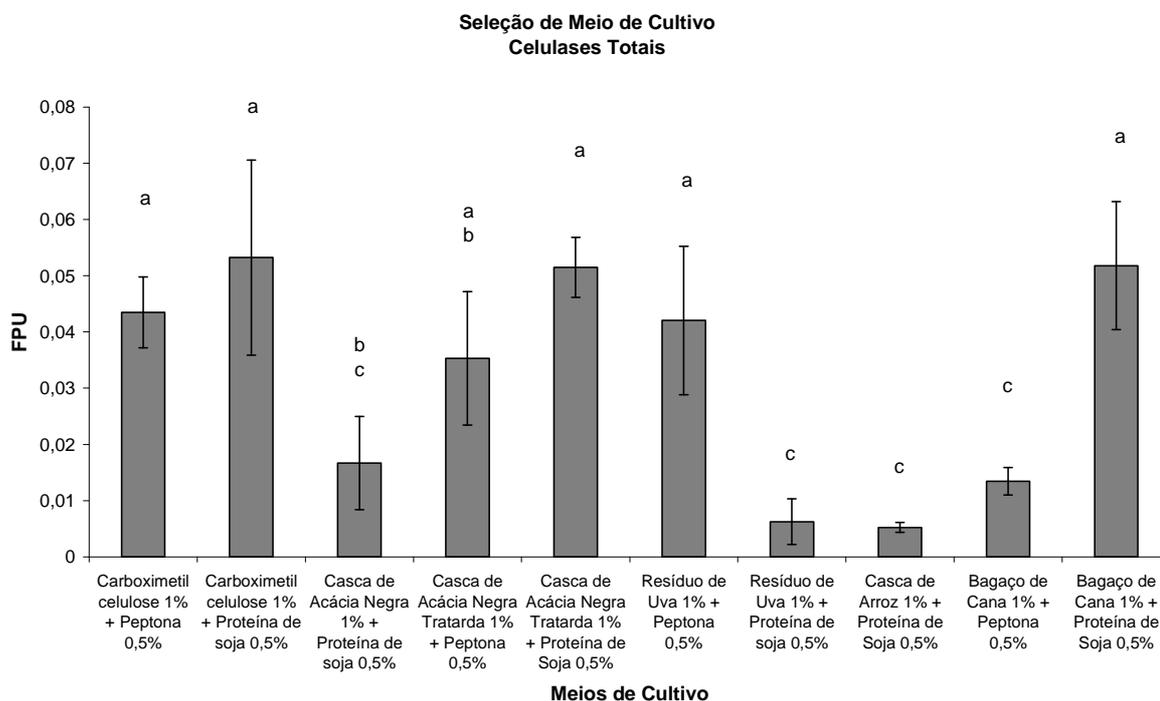
de Soja foi mais elevada em 48 horas, após teve um leve decréscimo, estabilizando-se. O meio composto por 1% CMC + 0,5% Proteína de Soja, a atividade enzimática aumentou com o decorrer do cultivo. A utilização de peptona em conjunto com a CMC teve rendimento menor que 1% CMC + 0,5% Proteína de Soja e Casca de 1% Acácia Negra Tratada + 0,5 % Proteína de Soja, assim como a 1% Casca de Acácia Tratada + 0,5% Peptona. Quando não ocorreu o tratamento alcalino na casca de acácia, a atividade foi baixa, como no 1% Casca de Acácia + 0,5% Proteína de Soja ou não detectada quando a proteína de soja foi substituída pela peptona.

O meio de cultivo 1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona permitiu uma a secreção de celulasas totais a partir das 48 horas de cultivo, assim como o meio com 1% Bagaço de Cana de Açúcar + 0,5% Proteína de Soja. Os meios de cultivo 1% Resíduo de Uva + 0,5% Proteína de Soja, 1% Bagaço de Cana de Açúcar + 0,5% Peptona e 1% Casca de Arroz + 0,5% Proteína de Soja não foram ideais para o desenvolvimento de uma boa atividade enzimática no decorrer das 96 horas. Na Figura 7, foi possível observar para a atividade de celulasas totais, que os meios de cultura com resíduo de uva, bagaço de cana de açúcar e casca de acácia negra tratada tiveram atividades enzimáticas nos sobrenadantes semelhantes ao meio 1% CMC + 0,5% Proteína de Soja.

Comparando as atividades de celulasas totais obtidas no presente trabalho com a atividade de outros fungos, foi possível observar que os resultados foram inferiores a linhagens do gênero *Trichoderma*, mas superiores a outros isolados do gênero *Aspergillus* (GOMES et al., 1989).



**FIGURAS 6A e 6B.** Atividade enzimática de celulases totais produzidas por *A. phoenicis* em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Cultivos em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (média  $\pm$  desvio padrão).



**FIGURA 7.** Atividade enzimática de celulases totais produzidas pelo *A. phoenicis* após 96 horas de cultivo em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação 120, rpm a 30 °C. Média e desvio padrão dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias.

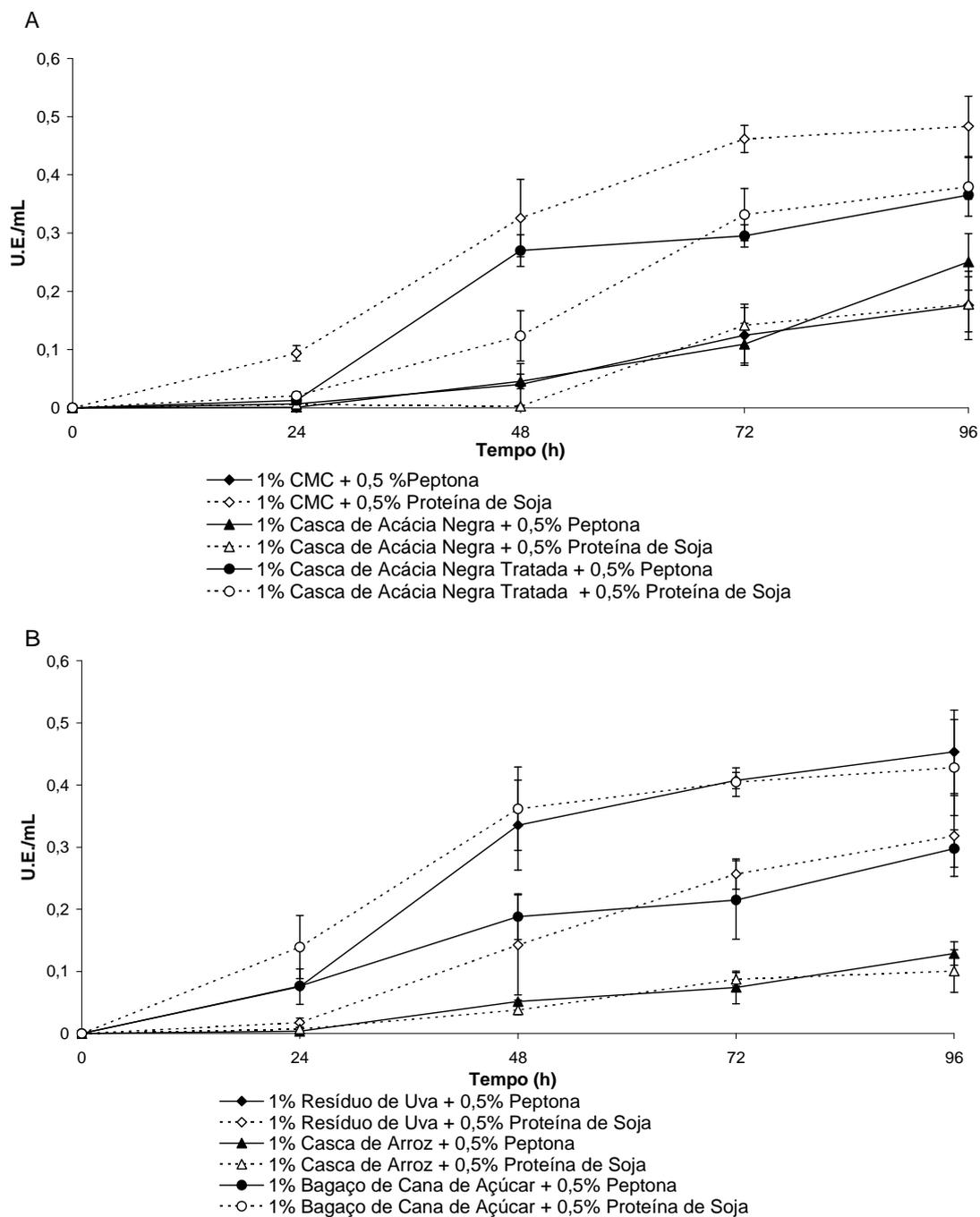
Para atividade de endoglicanases, todos os meios de cultura testados demonstraram atividade (Figura 9). O comportamento dos substratos que atuam como fonte de carbono frente à presença de proteína de soja ou peptona como fontes de nitrogênio foram semelhantes ao observado com a atividade de celulases totais, a única exceção aos meios com casca de acácia negra, embora não diferiram significativamente para o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

O meio de CMC 1% + Proteína de Soja 0,5% teve secreção elevada de endoglicanases em 72 horas de cultivo, estabilizando-se com 96 horas. Os meios de cultivo com casca de acácia tratada acrescidos de peptona ou proteína de soja tiveram comportamento semelhante quanto à atividade de endoglicanases ao

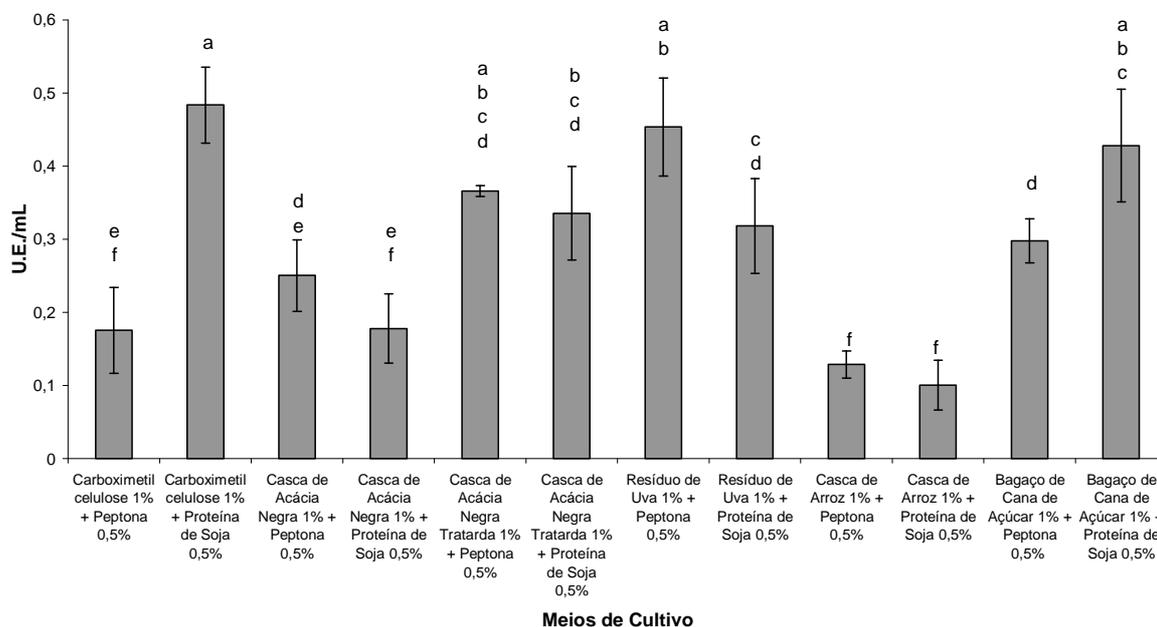
longo das 96 horas. Os meios com casca de acácia negra não tratada não permitiram o desenvolvimento de uma boa atividade ao longo da 96 horas, assim como CMC 1% + 0,5%Peptona (Figura 8A).

Na figura 8B, o comportamento da atividade enzimática nos meios 1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona e 1%Bagaço de Cana de Açúcar + 0,5% Proteína de Soja foi semelhante no decorrer das 96 horas de cultivo, ambos diferenciando-se entres os meios 1% Resíduo de Uva + 0,5% Proteína de Soja e 1% Bagaço de Cana de Açúcar + 0,5% Peptona, que também tiveram perfis de atividade enzimática semelhantes entre si. Nos meios de cultivo que usaram casca de arroz como substrato lignocelulósico, a detecção de endoglicanases foi baixa.

Conforme a Figura 9, os meios de cultivo compostos por resíduos agroindustriais com melhor potencial foram os meios 1% Casca de Acácia Negra Tratada + 0,5% Peptona, 1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona e 1% Bagaço de Cana de Açúcar + 0,5% Proteína de Soja.



**FIGURAS 8A e 8B.** Atividade enzimática de endoglicanases produzidas pelo *A. phoenicis* no decorrer do tempo em diferentes meios de cultivo submerso, em agitação orbital de 120 rpm a 30 °C. Média e desvio padrão dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada.



**FIGURA 9.** Atividade enzimática de endoglucanases produzidas pelo *A. phoenicis* após 96 horas de cultivo em diferentes meios de cultivo submerso, sob agitação 120 rpm, a 30 °C. Média dos experimentos de dois cultivos, com ensaios em triplicata em cada,  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias.

O resíduo de uva difere dos demais resíduos devido a sua composição, (Apêndice 1), com a presença de proteínas, amido e lipídios, enquanto a casca de arroz, bagaço de cana de açúcar e a casca de acácia negra possui na grande maioria de sua composição matéria lignocelulósica. Esta composição de nutrientes do resíduo de uva em conjunto com a proteína de soja pode ter criado condições repressoras para a secreção de celulasas (Apêndice 1).

Assim, os meios com presença de CMC e resíduos compostos por material lignocelulósicos, necessitam de um aporte maior de nutrientes, e a proteína de soja pode ter em sua composição estes nutrientes, dando condições para a

secreção de celulasas em relação aos mesmos substratos com peptonas em sua composição.

Em *A. niger*, a necessidade de possuir um maior aporte de nutrientes para a produção de celulasas totais foi necessária quando, ao compararem-se três meios diferentes, mínimo, basal e meio de Czapek Dox, todos acrescidos com 1% de celulose, foi observado que o meio de Czapek Dox foi o que permitiu a atividade enzimática mais elevada (NARASIMHA et al., 2006). A utilização de diferentes fontes de nitrogênio permite uma produtividade maior na secreção de enzimas celulásicas, conforme visto em *A. niger* (HANIF et al., 2004), e em *Pleurotus dryinus* (ELISASHVILI, et al. 2006).

A utilização de resíduos de uva já foi descrita como um substrato alternativo para a produção de outros produtos de origem microbiana. A produção de  $\beta$ -glicosidases (DAROIT et al., 2007), e de pigmentos (SILVEIRA et al., 2007) pelo fungo *Monascus purpureus* foi demonstrada utilizando o mesmo resíduo de uva deste trabalho. Outro resíduo agroindustrial composto por sementes, casca e pedúnculos de uva demonstrou ser um meio eficaz para a produção de enzimas hidrolíticas como exo-poligalacturonases e xilanases, mas não para celulasas em cultivo semi-sólido (BOTELLA et al., 2005).

Os meios compostos 1% Casca de Acácia Negra + 0,5% Peptona e 1% Casca de Arroz + 0,5% Peptona não resultaram em atividade enzimática detectável para celulasas totais. O uso de resíduos agroindustriais da cultura de arroz, nem sempre se revela a melhor alternativa. A utilização de palha de arroz como substrato lignocelulósico correspondeu a menor atividade enzimática de celulasas totais e endoglicanases por *A. niger* quando comparada com outros

substratos, como pó de serragem, folha secas de tabaco e palha de sorgo (NARASIMHA et al., 2006). Entretanto, a combinação da palha de arroz com o farelo de trigo (1:3) permitiu a produção elevada de celulases e xilanases pelo fungo termófilo *Scytalidium thermophilum* em cultivo sólido. A utilização de ambos resíduos foi superior aos mesmos quando o cultivo foi realizado utilizando apenas um dos resíduos (JATINDER et al., 2006).

O bagaço de cana de açúcar com proteína de soja demonstrou ser promissor, não diferindo estatisticamente do 1% Resíduo de Uva + 0,5% Peptona, da 1% Casca de Acácia Tratada + 0,5% Proteína de Soja e da 1% CMC + 0,5% Proteína de Soja. Resultados similares ao deste trabalho para as atividades de celulases totais e endoglicanases foram observadas com o cultivo de *Penicillium* sp, *A. terreus* e ambos simultaneamente em cultivo líquido com bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio (GARCIA-KIRCHNER et al., 2002).

A utilização de cepas mutantes pode permitir o melhor aproveitamento de um substrato. KANG et al. (2004), utilizaram o mutante de *A. niger* KK2 para o cultivo sólido em palha de arroz obtendo bons resultados para a produção de enzimas celulásicas e xilanases. O mesmo microrganismo mutante também demonstrou potencial para a secreção de  $\beta$ -glicosidases em meio com palha de arroz e resíduos de papel impresso e madeira que sofreram tratamentos enzimáticos e térmicos (KANG et al., 1999). A obtenção de mutantes do gênero *Penicillium* também permitiu o aumento de atividade enzimática de celulases em relação a sua respectiva linhagem parental, tanto para atividade de celulases totais (duas vezes mais) como para  $\beta$ -glicosidases (seis vezes mais) (DILLON et al., 1992). O

uso de mutantes para o incremento da produção de celulases pode permitir melhor aproveitamento de resíduos e economia em processo de produção enzimática.

O tratamento alcalino da casca do arroz pode ser uma alternativa para a utilização do mesmo para a produção de celulases. O cultivo de *A. niger* em meio com casca de arroz tratada demonstrou uma produtividade de celulases superior a meios de cultivo com sabugos de milho tratado CMC, mas inferior a farelo de trigo tratado (HANIF et al., 2004).

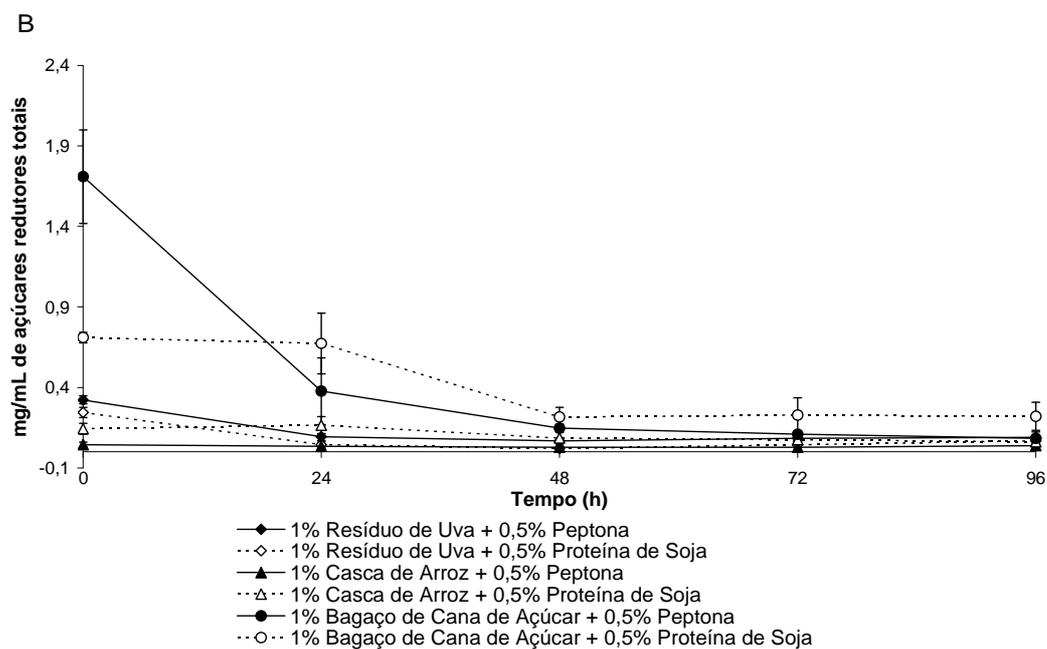
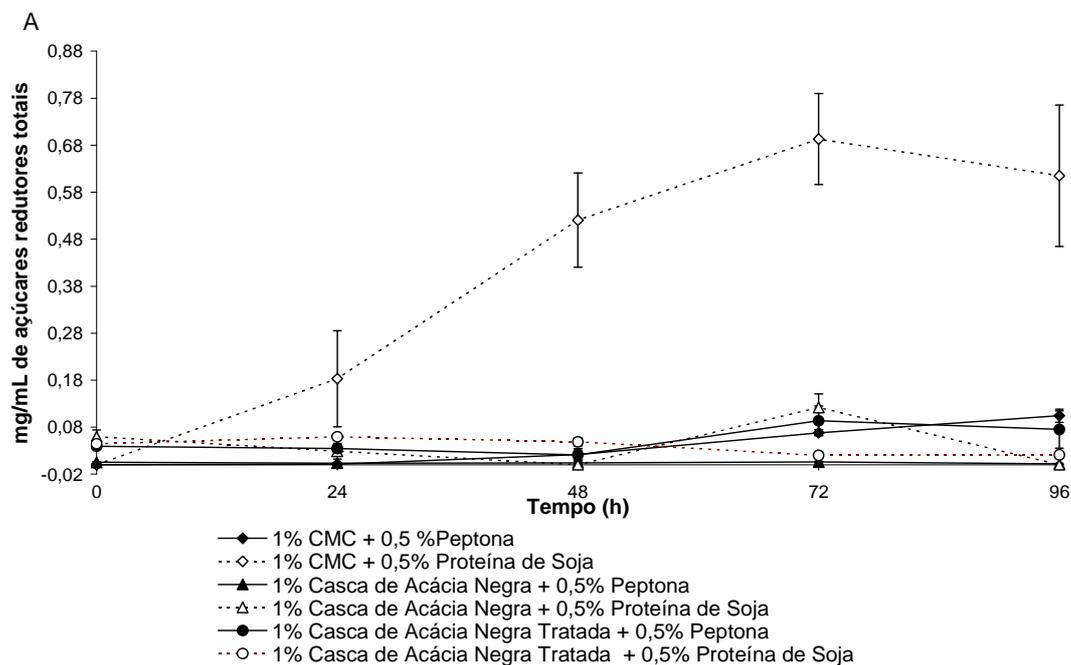
A utilização de resíduos provindos de árvores, como a casca de acácia negra, para a produção de celulases possui paralelo na literatura e o tratamento da mesma, embora realizado, nem sempre demonstra bons resultados. JUHÁSZ et al. (2005), realizou o cultivo de *Trichoderma reesei* utilizando resíduo de salgueiro e coníferas tratados com a impregnação de SO<sub>2</sub> e após a vaporização do resíduo, e as atividades enzimáticas mensuradas foram inferiores para celulases totais, endoglicanases e β-glicosidases, comparando-as com os meios com celulose deslignificada e palha de milho tratada. O cultivo de um isolado de basidiomiceto, denominado CPC 142, em lenho de coníferas e *Hibiscus cannabinus* tratadas a vapor com 4 N de NaOH durante 1 hora demonstrou ser mais eficiente para a produção de celulases e β-glicosidases do que os mesmos resíduos sem o tratamento (SHEWALE & SADANA, 1978), porém com atividade inferior ao bagaço de cana de açúcar com o mesmo tratamento.

### 5.3.1 Determinação de açúcares redutores totais

Com o objetivo de caracterizar a presença de açúcares presentes nos resíduos agroindústrias testados nos meios de cultura, além de verificar o possível consumo pelo fungo no decorrer do cultivo, realizamos o ensaio de açúcares redutores totais. Dos meios cultivados, a presença de açúcares redutores totais utilizando o reagente de DNS, foi maior nos meios com bagaço de cana de açúcar no mosto do meio de cultivo (hora 0) (Figura 10B). Entretanto, é possível observar que os valores da concentração de açúcares redutores de no meio com peptona ( $1,7 \pm 0,29$  mg/mL) foi maior do que os meios com proteína de soja ( $0,70 \pm 0,03$  mg/mL). Embora se tenha utilizado o bagaço de mesmas fontes, a insolubilidade do resíduo pode causar diferenças no açúcar redutor. Contudo, é importante salientar que a concentração de açúcares redutores presentes no meio de cultivo diminuiu com o passar das horas de cultivo em ambos os meios de cultivo, o que provavelmente está ligado ao consumo dos açúcares presentes no meio de cultura como fonte de carbono.

Comportamento semelhante foi observado nos meios de cultura com resíduo de uva. Nos demais meios de cultura, a presença de glicose manteve-se estável com exceção do meio de cultura com CMC e proteína de soja (Figura 10B).

Dos meios de cultivo testados, o único que demonstrou ter um incremento maior na concentração de açúcares redutores totais no decorrer do cultivo foi o meio 1% CMC + 0,5% Proteína de Soja (Figura 10A). Possivelmente a degradação da CMC em oligosacarídeos redutores pode ter aumentado a presença de açúcares redutores detectadas pelo ensaio.

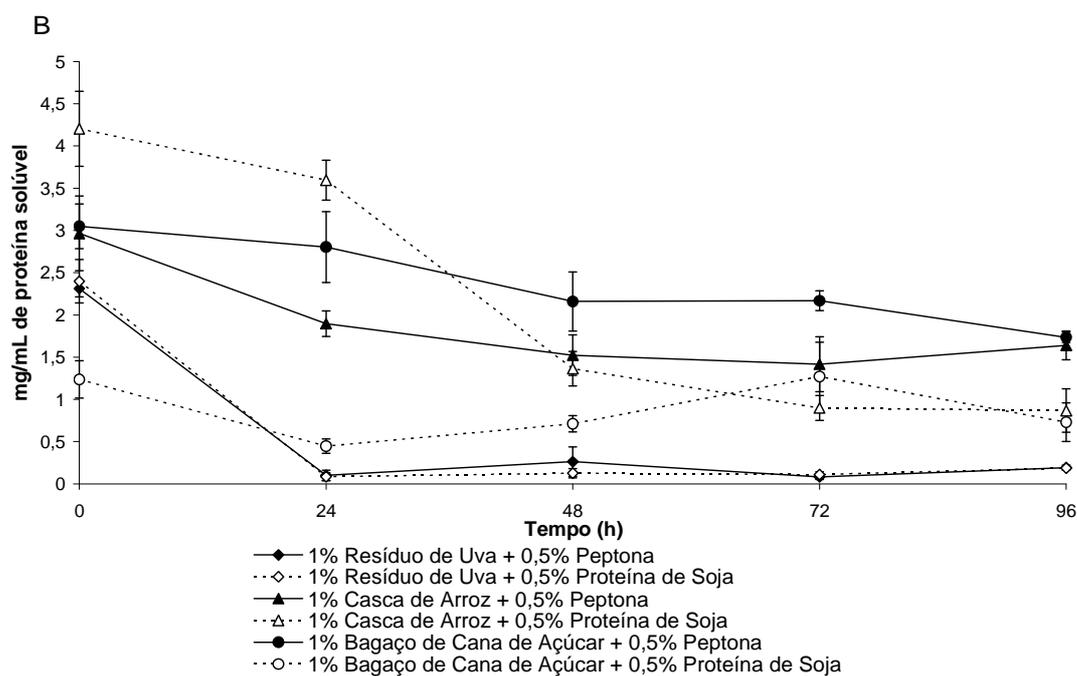
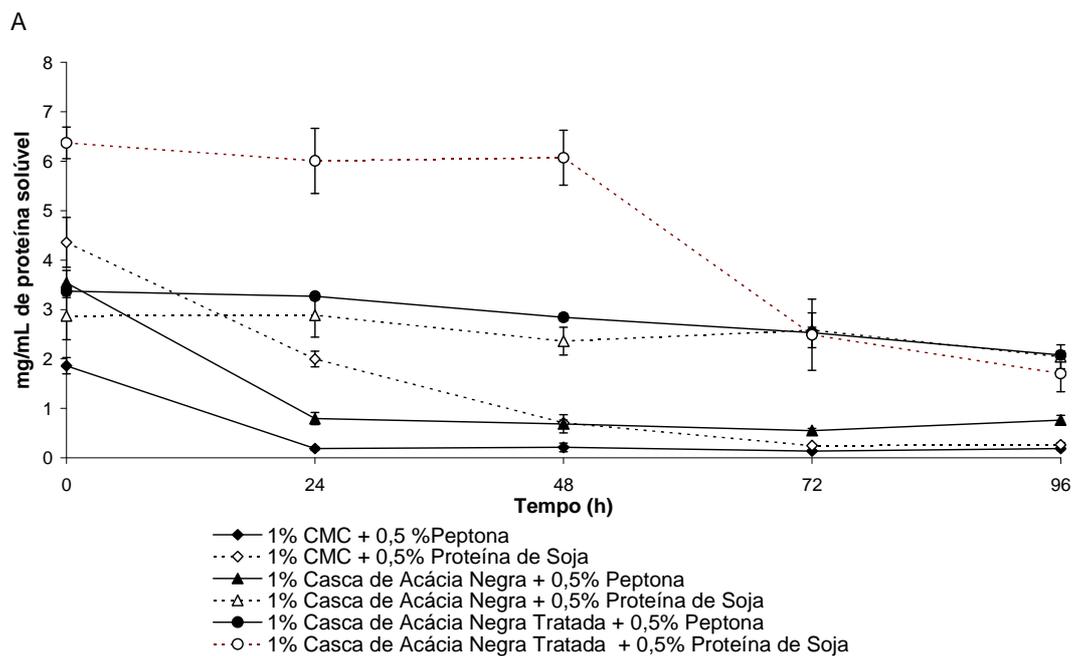


**FIGURAS 10A e 10B.** Concentração de açúcares redutores no decorrer dos diferentes meios de cultivo testados para a produção de celulases por *A. phoenicis*. Cultivos realizados em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (Média ± D.P.).

### 5.3.2 Determinação de proteínas solúveis

Em todos os meios de cultivo, foi possível observar o consumo de proteínas, embora os valores obtidos na caracterização do cultivo foram diferentes para os meios com proteína de soja, em especial para a hora zero. As diferenças podem ter ocorrido pelo fato da proteína de soja ser tão solúvel no meio de cultivo como a peptona, além de que, embora fosse realizada a homogeneização na coleta das amostras. Diferenças na degradação da proteína de soja também podem ter influenciado na quantificação de proteínas solúveis (Figuras 11A e 11B).

A queda na concentração de proteína solúveis nos meios pode ser creditada a utilização como fonte de nitrogênio da proteína de soja e da peptona e possível secreção de proteases pelo *A. phoenicis*. Já foram descritas no gênero tanto proteases que atuam em pH alcalinos (FARAG & HASSAN, 2004), como proteases que possuem atividade em pH ácidos (TREMACOLDI et al., 2004). A produção de proteases ácidas por *A. phoenicis* e *A. awamori* utilizando farinha de soja aumenta a possibilidade do consumo da proteína de soja pelo fungo, diminuindo a concentração de proteína solúvel no meio (BHUMIBHAMON, 1982). O *A. phoenicis* presente neste trabalho possui a capacidade de secretar proteases com pH ótimos próximos a 4,0 (SILVA & BRANDELLI).



**FIGURA 11A e 11B.** Concentração de proteínas solúveis no decorrer dos diferentes meios de cultivo testados para a produção de celulasas por *A. phoenicis*. Cultivos realizados em duplicata, com ensaios realizados em triplicata (Média  $\pm$  D.P.).

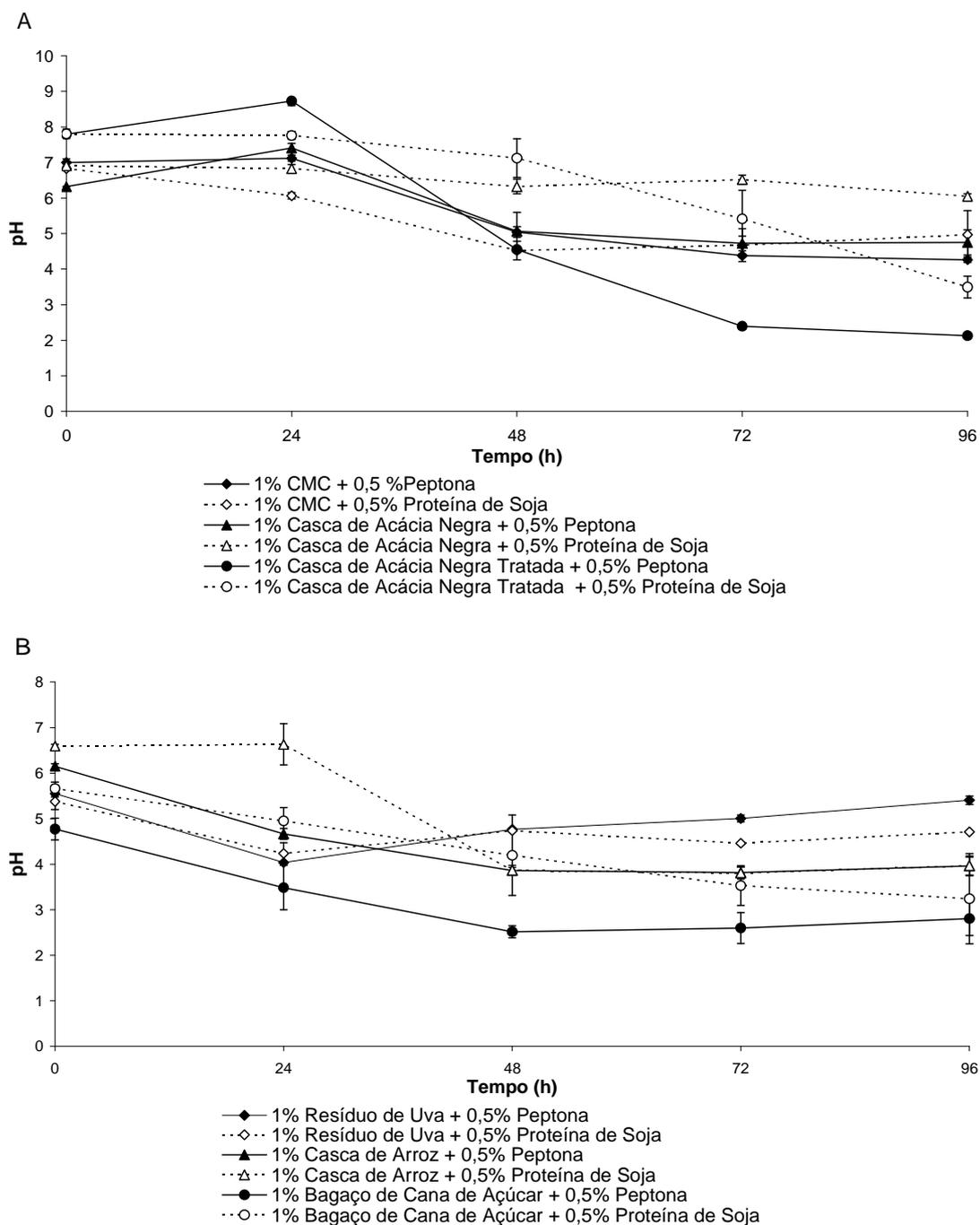
### 5.3.3 Determinação do pH durante o cultivo

Foi observado que em todos os meios de cultivo ocorreu a tendência de acidificação nas primeiras 48 horas, mas na grande maioria deles, o pH estabilizou-se ou subiu gradativamente. As exceções foram os cultivos com Casca de Acácia Negra, em que seu pH continuou decrescendo até 72 horas em meio acrescido de peptona ou 96 horas no meio acrescido com proteína de soja em (Figuras 12A e 12B).

A tendência de valores de pH ácidos durante o cultivo submerso de fungos filamentosos visando à produção de celulasas já foi descrita na literatura. Comportamento semelhante foi observado para *T. reesei* quando cultivado em papel jornal com tratamento alcalino (CHEN & WAYMAN, 1991). O crescimento de *A. niger* e *Aspergillus terreus* em celulose cristalina também resultou na acidificação do meio de cultura nas primeiras 48 horas de cultivo e após um aumento gradativo do pH (GOMES et al., 1989). A utilização de sabugos de milho como fonte de carbono pelo *T. reesei* fez com que o pH do meio de cultivo acidificasse nas primeiras 48 horas e gradualmente subia próxima à neutralidade com 120 horas de cultivo (LIMING & XUELIANG, 2004). A comparação entre o cultivo de quatro diferentes espécies de *Aspergillus* demonstrou uma acidificação rápida e decréscimo do pH em 24 horas de cultivo (5,7 para 2,3) seguido de aumento no terceiro dia (5,8) e após um aumento gradual até o nono dia de cultivo (6-6,5) (FLACHNER & RÉCZEY, 2004). O cultivo de *A. terreus* em meio com bagaço de cana de açúcar, milhocina e sais minerais teve um gradual aumento no pH, de 5 no início do cultivo a 6 no final do mesmo. O cultivo de um

isolado de *Penicillium* no mesmo meio teve como resultado um valor final de pH 6,5 nas mesmas condições de cultivo (GARCIA-KIRCHNER et al., 2002).

No cultivo de *Acremonium cellulolyticus*, realizado em maior escala, o valor do pH foi inicialmente ácido, seguido de aumento após as primeiras 24 horas de cultivo. O meio acidificado em pH 4,0 no reator de 50 L causou perda na atividade celulásica segundo os autores (IKEDA, et al., 2007). Embora o comportamento do pH dos meios em que o *A. phoenicis* tenha sido cultivado estejam de acordo com os dados da literatura, o estudo do mesmo pode ser necessário para o escalonamento do cultivo em bioreator.



**FIGURAS 12A e 12B.** Variações no valor do pH no decorrer do cultivo do *A. phoenicis* em diferentes meios de cultivo testados. Cultivos realizados em duplicata. Média  $\pm$  DP de cada cultivo.

#### 5.4 Otimização da produção de celulases

A utilização da metodologia de superfície resposta já foi utilizada como ferramenta de otimização de bioprocessos para uma diversidade de metabólitos, como pigmentos (SILVEIRA et al., 2007), bacteriocinas (CLADERA-OLIVERA, et al., 2004), enzimas, como a amilase (FRANCIS et al., 2003), queratinase (ANBU et al., 2007) e xilanases (HECK et al., 2006).

O estabelecimento das condições ótimas para a produção de enzimas celulásicas foi efetuada variando os substratos que compõem o meio de cultura. As condições experimentais e os resultados obtidos estão mostrados na tabela 10. É possível estimar sobre os efeitos dos substratos (resíduo de uva e peptona) frente às atividades enzimáticas obtidas no desempenho do processo, variando ambos de um nível mais baixo (-1) para outro mais elevado (+1) dos fatores correspondentes. Ambos os valores obtidos  $t$  e  $p$  do teste estatístico foram utilizados para confirmar a significância dos fatores estudados.

**TABELA 10.** Resultados obtidos no experimento fatorial  $2^2$ .

Experimento	$X_1$ (Resíduo de Uva)*	$X_2$ (Peptona)*	FPU**	Endoglicanases U.E./mL**	$\beta$ -glicosidases I.U./mL**
1	(-1) 5	(-1) 2,5	0,053	0,463	45,45
2	(-1) 5	(+1) 7,5	0,059	0,545	35,31
3	(+1) 15	(-1) 2,5	0,028	0,463	40,33
4	(+1) 15	(+1) 7,5	0,095	0,666	43,56
5	(0) 10	(0) 5	0,090	0,564	44,88
6	(0) 10	(0) 5	0,106	0,615	46,41
7	(0) 10	(0) 5	0,090	0,573	46,29
8	(0) 10	(0) 5	0,079	0,574	50,36
9	(0) 10	(-1,41) 1,5	0,045	0,466	48,59
10	(0) 10	(+1,41) 8,5	0,081	0,567	51,76
11	(-1,41) 3	(0) 5	0,046	0,483	34,72
12	(+1,41) 17	(0) 5	0,070	0,572	47,79

\*São apresentados os valores reais e codificados (entre parênteses) para variáveis independentes (Resíduo de Uva e Peptona).

\*\* Variáveis dependentes

#### 5.4.1 Atividades de celulases totais

Para atividade de celulases totais, atividade mais elevada foi observada no tratamento 4 (0,094 FPU) e na média dos quatro pontos centrais (0,091 FPU), enquanto a atividade mais baixa foi observada no tratamento 3 (Tabela 10). A Tabela 11 apresenta os efeitos de cada variável independente e sua interação com FPU. A mudança na concentração de resíduo de uva do nível axial (-1,41) para o nível axial superior causou uma redução na atividade enzimática, em média de 0,034 FPU, significativa para um nível de confiança de 95%. O efeito do resíduo de uva variando de -1 para + 1 não foi significativo para o nível de significância de 90%, com o valor do  $p = 0,247$  (tabela 11).

A concentração de peptona, variando entre 2,5 a 7,5 g/L fez com que a atividade enzimática aumentasse em média 0,031 FPU. Entretanto, quando a concentração de peptona diminuiu para 1,5 g/L ou aumentou para 8,5 g/L, ocorre uma baixa na atividade enzimática de 0,029 FPU (Tabela 11). O efeito combinado do resíduo de uva com a peptona promoveu o aumento da atividade enzimática, em média, de 0,030 FPU para um valor  $p$  de 0,074.

A possibilidade de utilizar a peptona entre o nível de -1 a +1 como matéria prima do bioprocessamento é interessante para o custo do mesmo, por não ser necessário uma concentração elevada do substrato para obtenção de uma atividade enzimática mais elevada. Outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas na busca de meios de cultivo para a produção de celulases. Em *Acremonium cellulolyticus*, a utilização de uréia e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fontes de nitrogênio foram mais efetivas para o aumento da atividade de celulases totais no sobrenadante do cultivo do que a utilização de milhocina (IKEDA et al., 2007). A

milhocina também se revelou uma fonte de nitrogênio inadequada para a produção de celulases pela cepa mutante de *T. reesei* WX-112. Utilizando a metodologia de superfície e resposta para a produção de celulases totais, os resultados demonstraram que de cinco variáveis nutricionais testadas, Avicel (celulose microcristalina), farelo de trigo,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , farinha de soja, extrato de levedura e milhocina, somente o farelo de soja e Avicel influenciaram na produção de celulases (HAO et al., 2006).

Para a construção de um modelo de segunda ordem que pode prever a atividade enzimática (variável dependente) em função do resíduo de uva, a análise da variância (ANOVA) (Tabela 12) foi utilizada para avaliação de significância do modelo. Baseado no teste-F, o modelo é capaz de prever a atividade enzimática em relação as variáveis independentes. O valor F foi calculado em 14,01, enquanto o F tabelado foi 2,96 para o nível de confiança de 90%. O valor elevado do F calculado em relação ao F tabelado permitiu o estabelecimento do modelo (Eq. 1), com a atividade enzimática em função das variáveis independentes. Os coeficientes da equação foram calculados com ajuda do programa Statistica 7.0, estando presentes na tabela 13. O modelo codificado foi utilizado para gerar o gráfico de superfície resposta ilustrado na figura 18.

$$Y (\text{FPU}) = 0,091 + 0,015 X_2 - 0,017 X_1^2 - 0,014 X_2^2 + 0,015 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 1})$$

**TABELA 11.** Efeitos e interações sobre atividade de celulases totais (PFU) no cultivo submerso de *A. phoenicis*.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T calc	p-valor
Média	0,091	0,005	16,41	0,0005 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva (L)	0,011	0,008	1,43	0,247
Resíduo de Uva (Q)	-0,034	0,009	-3,87	0,030 <sup>a</sup>
Peptona (L)	0,031	0,008	3,97	0,028 <sup>a</sup>
Peptona (Q)	-0,029	0,009	-3,29	0,046 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva x Peptona	0,030	0,011	2,69	0,074 <sup>b</sup>

a = fatores significativos para  $p < 0,05$

b = fatores significativos para  $p < 0,08$

$R^2 = 0,88$

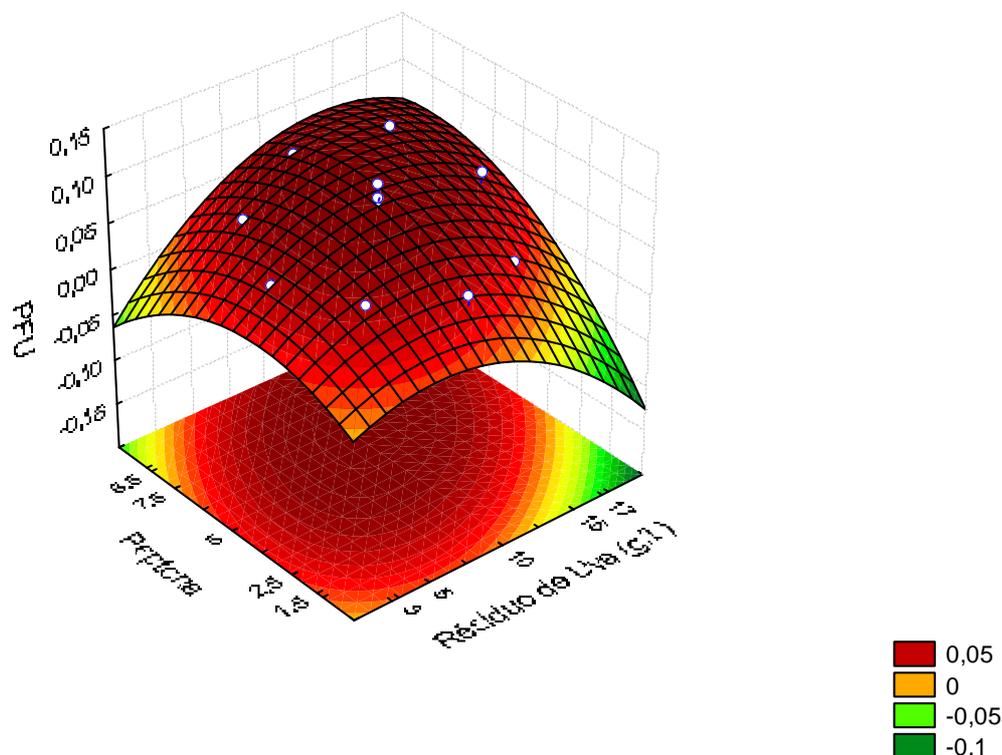
**TABELA 12.** Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de celulases totais.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	0,0060	4	0,0015	14,01	2,96
Resíduo	0,00075	7	$1,07 \times 10^{-4}$		

**TABELA 13.** Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de celulases totais.

Fator	Coeficiente	Valor p
Intersecção	0,091045	0,000492*
$X_1$	0,005627	0,247539
$X_1X_1$	-0,017035	0,030576*
$X_2$	0,015605	0,028533*
$X_2X_2$	-0,014488	0,046099*
$X_1X_2$	0,014942	0,074220*

\*Estatisticamente significativo para intervalo de 90% de confiança.



**FIGURA 13.** Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de celulases totais por *A. phoenicis*.

#### 5.4.2 Atividade de endoglicanases

Para a atividade de endoglicanase, foi observado um comportamento similar aos das celulases totais. O tratamento quatro teve a atividade mais alta (0,666 U.E./mL) e os tratamento 1, 3, 9 e 11 tiveram as atividades mais baixas (0,463, 0,463, 0,466 e 0,483 U.E./mL, respectivamente). Para esta atividade enzimática, todas as variáveis independentes tiveram um valor significativo para  $p < 0,08$  (tabela 10). Assim como visto para atividades de celulases totais, a concentração de resíduo de uva e peptona nos níveis axiais levou decréscimo a atividade enzimática, em 0,048 e 0,058 U.E./mL, respectivamente. Contudo, o efeito linear

de resíduo de uva teve efeito positivo, de 0,062 U.E./mL, para um nível de significância de 90% e valor  $p = 0,03$ , o que contrastou com o valor de  $p$  observado para a mesma variável em celulases totais. Para a peptona, no intervalo 2,5 g/L a 7,5 g/L, ocorreu um efeito positivo, assim como em celulases totais, calculado em 0,107 U.E./mL. Poucos trabalhos demonstram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de celulases por fungos. STEWART & PARRY (1981) verificaram que a utilização de sulfato de amônio ou nitrato de amônio como fonte de nitrogênio foi mais efetiva para a produção endoglucanase e exoglucanases em *A.fumigatus* ao final de 16 dias de cultivo submerso. Em *A.niger*, a presença de milhocina em meio de cultura promoveu à síntese de exoglucanase em relações as fontes de nitrogênio inorgânico testadas, como nitrato de amônio, sulfato de amônio, glutamato de sódio, nitrato de sódio e uréia (HANIF et al, 2004). Em *Pleurotus dryinus*, a produção de enzimas lignocelulíticas não teve um efeito dependente em relação as diferentes fontes de nitrogênio testadas (nitrato de potássio, sulfato de amônio, nitrito de amônio e peptona) (ELISASHVILI et al., 2007). Em estudo com a metodologia de superfície resposta para a produção de celulases e xilanases pelo fungo *S. thermophilium*, a utilização do sulfato de amônio com única fonte de nitrogênio teve efeito positivo sobre à atividade de endoglucanases, celulases totais e  $\beta$ -glicosidases, em condições lineares, mas em excesso, inibiu a produção das enzimas (JATINDER et al., 2006).

Os resultados presentes na tabela 14 foram utilizado para a construção de um modelo em segunda ordem, com a atividade enzimática em função do resíduo de uva e peptona. A ANOVA do modelo de regressão (Tabela 15) demonstrou a

significância do modelo, com o valor de F calculado em 15,57, quatro vezes maior que o F tabelado, que foi 3,11, para um nível de significância de 90%. O modelo codificado foi utilizado para gerar o gráfico de superfície resposta, conforme a figura 19 e os coeficientes de regressão (Tabela 16), bem como a equação (Eq. 2), que prediz a atividade de endoglucanase em função das variáveis independente:

$$Y \text{ (U.E./mL)} = 0,581 + 0,030 X_1 + 0,053 X_2 - 0,024 X_1^2 - 0,029 X_2^2 + 0,030 X_1 X_2$$

(Eq. 2)

**TABELA 14.** Efeitos e interações sobre atividade de endoglicanases no cultivo submerso de *A. phoenicis*.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T calc	p-valor
Média	0,581	0,011	51,34	<0,001
Resíduo de Uva (L)	0,062	0,016	3,86	0,030 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva (Q)	-0,048	0,018	-2,66	0,076 <sup>b</sup>
Peptona (L)	0,107	0,016	6,67	0,007 <sup>a</sup>
Peptona (Q)	-0,058	0,018	-3,25	0,047 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva x Peptona	0,061	0,022	2,68	0,075 <sup>b</sup>

a = fatores significativos  $p < 0,05$

b = fatores significativos  $p < 0,08$

$$R^2 = 0,90$$

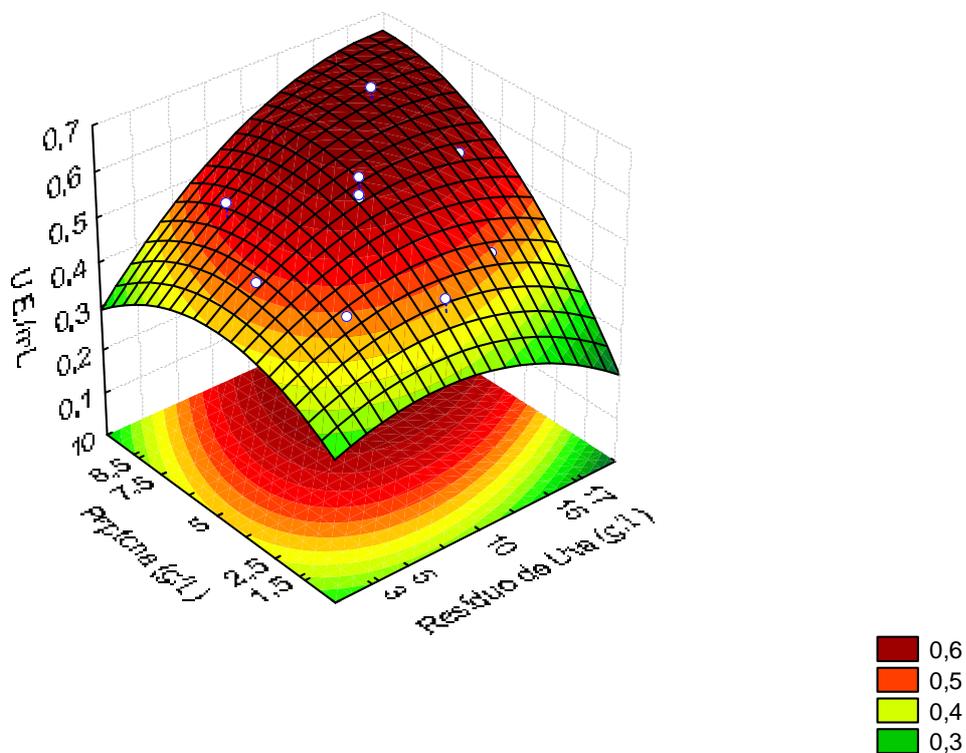
**TABELA 15.** Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de endoglicanases.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	0,045	5	0,009	12,57	3,11
Resíduo	0,0043	6	$7,16 \times 10^{-4}$		

**TABELA 16.** Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de endoglicanases

Fator	Coefficiente	Valor p
Intersecção	0,581396	0,000000*
X <sub>1</sub>	0,030960	0,017379*
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-0,023961	0,065758*
X <sub>2</sub>	0,053550	0,001346*
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-0,029255	0,033612*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,030380	0,064448*

\* Estatisticamente significativo para intervalo de 90% de confiança.



**FIGURA 14.** Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de endoglicanases por *A. phoenicis*.

### 5.4.3 Atividade de $\beta$ -glicosidases

Para atividade de  $\beta$ -glicosidases, as variações de concentração entre 5 e 15 g/L de resíduo de uva teve efeito positivo na atividade, calculado em 5,40 U.E./mL (Tabela 17). Entretanto, quando as concentrações do resíduo de uva foram para níveis axiais, a atividade decaiu em 8,06 U.E./mL. O tratamento 11, com 3 g/L de resíduo de uva teve a atividade mais baixa, com 34,72 U.E./mL. A peptona não teve efeito significativo na atividade de  $\beta$ -glicosidases, com o valor p calculado para 0,739 em níveis entre -1 e 1 e 0,66 nos níveis -1,41 e 1,41 (Tabela 17). Apesar da peptona não causar efeitos na atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidases, a interação entre as variáveis independentes demonstrou ser significativa em um nível de confiança de 90%, para  $p = 0,066$ . O modelo gerado (Figura 15) a partir da ANOVA (Tabela 18) demonstrou que a os níveis ótimos de atividade enzimática estiveram em concentrações próximas a das atividades de celulases totais e endoglicanases, com o valor de F calculado em 7,14, superior ao F tabelado 2,92. A equação que prediz a atividade enzimática para  $\beta$ -glicosidases em função das variáveis independentes foi determinada, conforme os coeficientes de regressão na tabela 19 .

Equação 3:

$$Y \text{ (U.E./mL)} = 47 + 2,70 X_1 - 4,12X_1^2 + 3,34 X_1X_2 \text{ (Eq. 3)}$$

A produção de  $\beta$ -glicosidases no gênero *Aspergillus* é descrita na literatura. HANG e WOODAMS (1994) demonstraram a utilização de resíduos de maçã para a produção da enzima em fermentação semi sólida pelo *Aspergillus foetidus*. Em *Aspergillus oryzae*, fungo utilizado na fermentação sólida do arroz para produção

de saque, foi demonstrado a participação importante da  $\beta$ -glicosidase para a formação de álcool durante o processo fermentativo (YAMENE et al., 2002).

Em *A. phoenicis*, DESCHAMPS & HUET (1984) descrevem a produção da enzima com grãos de milho quebrados, amido de batata, polpa de amido de batata, polpa de beterraba. Quatro linhagens de *Aspergillus* foram testadas para a produção de  $\beta$ -glicosidases (*A. niger*; *A. foetidus*, e duas linhagens de *A. phoenicis*), todas com produtividade semelhante para enzima, mas superior a linhagem de *T. reesei* RUT C30 (FLACHNER & RÉCZEY 2004). O uso de glicose a 1% com fonte de carbono em *A. phoenicis* demonstrou a capacidade do fungo em secretar enzimas  $\beta$ -glicosídicas em meio líquido sem a presença de uma fonte de celulose, sendo esta atividade superior aos fungos *A. niger* e *Aspergillus carbonarius*. Entretanto, o crescimento das mesmas três linhagens em meio sólido com farinha de trigo, o *A. niger* mostrou atividade enzimática superior aos demais fungos estudados (JÄGER et al., 2001). A comparação entre *A. phoenicis* e *A. niger* também foi efetuado quando cultivado em frascos erlenmeyers, reatores cilíndricos (70 mm x 500 mm) com injeção de injeção de ar e em tanques de fermentação com agitação. Os experimentos demonstraram uma produtividade semelhante em cultivo em erlenmeyers para  $\beta$ -glicosidases em ambos os fungos. Quando o cultivo foi realizado em reatores cilíndricos a produtividade para a enzima foi superior em *A. phoenicis* e em tanques com agitação o *A. niger* demonstrou um desempenho superior (BRUMBAUER & RÉCZEY, 1999). O sistema de cultivo influenciou a obtenção de uma melhor produtividade enzimática pelos microrganismos estudados.

A produção de  $\beta$ -glicosidases também é descrita em outros fungos. THYGESEN et al. (2003), tiveram atividades elevadas de  $\beta$ -glicosidases e endoglicanases por *Botrytis cinerea* e *Penicillium brasilianum*, superiores a de isolados de *A. niger* e *T. reesei*, quando cultivados em palha de trigo tratada com carbonato de sódio. Em *T. reesei*, a utilização de diferentes resíduos como fontes de carbono, como celulose deslignificada, salgueiro, conífera e sabugo de milho tratados, demonstraram ser fatores determinantes para a produção de  $\beta$ -glicosidases (JUHÁSZ et al., 2005). Entretanto, a produção de  $\beta$ -glicosidases pelo gênero *Trichoderma* não é tão elevada quanto ao *A. phoenicis*, o que justifica a utilização de culturas mistas para a produção de enzimas celulásicas de modo eficiente (DUFF et al., 1986; WEN et al., 2005) e reforça a capacidade do *A. phoenicis* como produtor da enzima.

**TABELA 17.** Efeitos e interações sobre atividade de  $\beta$ -glicosidases no cultivo submerso de *A. phoenicis*.

Fator	Efeito (I.U./mL)	Erro Padrão	Valor t	Valor p
Média	47,0	1,18	39,90	<0,001 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva (L)	5,40	1,67	3,24	0,048 <sup>a</sup>
Resíduo de Uva (Q)	-8,06	1,87	-4,31	0,023 <sup>a</sup>
Peptona (L)	-0,61	1,67	-0,36	0,739
Peptona (Q)	0,91	1,87	0,49	0,66
Resíduo de Uva x Peptona	6,69	2,35	2,84	0,066 <sup>b</sup>

a = fatores significativos  $p < 0,05$

b = fatores significativos  $p < 0,07$

$R^2 = 0,67$

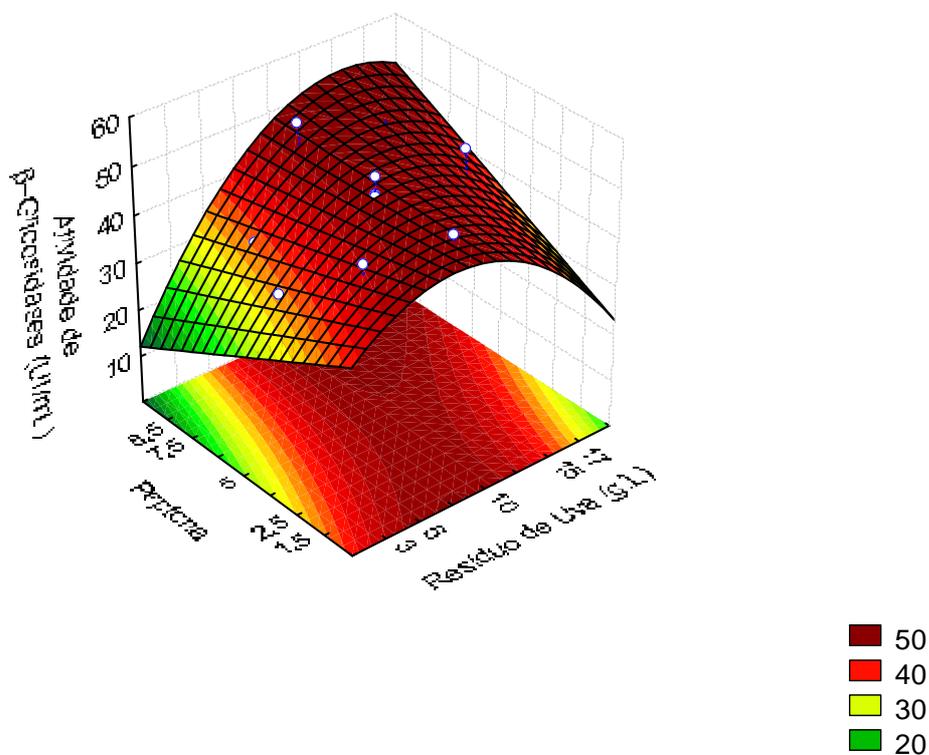
**TABELA 18.** Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de  $\beta$ -glicosidases.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	282,63	3	94,21	7,14	2,92
Resíduo	105,56	8	13,19		

**TABELA 19.** Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares para atividade de  $\beta$ -glicosidases.

Fator	Coefficiente	Valor p
Intersecção	47,00104	0,000035*
$X_1$	2,70196	0,047894*
$X_1X_1$	-4,03226	0,022975*
$X_2$	-0,30510	0,738842
$X_2X_2$	0,45522	0,659777
$X_1X_2$	3,34447	0,065700*

\* Estatisticamente significativo para intervalo de 90% de confiança



**FIGURA 15.** Superfície de resposta para os efeitos de concentrações diferentes de Resíduo de Uva e Peptona sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases por *A. phoenicis*.

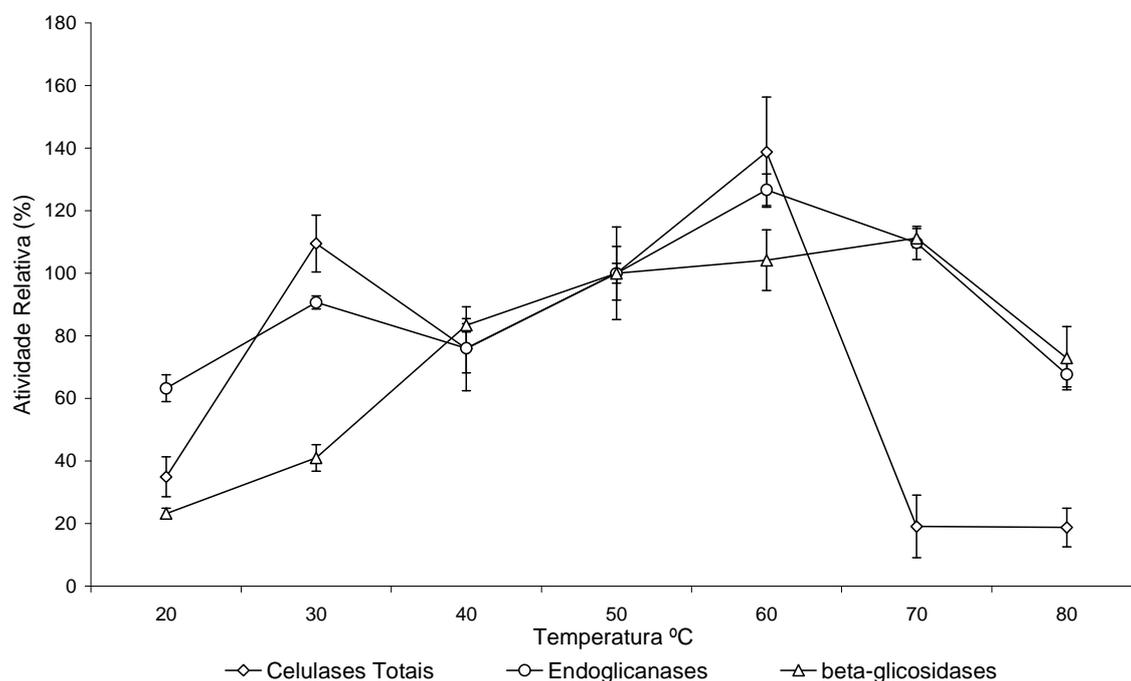
O planejamento fatorial realizado demonstrou a possibilidade da produção de um complexo celulolítico em cultivo submerso, com destaque para a produção de  $\beta$ -glicosidases utilizando resíduo de uva como fonte de carbono e peptona como

de nitrogênio. As três atividades enzimáticas analisadas (celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases) tiveram seus valores mais elevados em concentrações semelhantes dos substratos utilizados, o que valoriza a produção das enzimas obtidas no processo.

## **5.5 Caracterização das enzimas celulásicas**

### **5.5.1 Temperatura ótima das atividades enzimáticas**

Foi observado que a temperatura ótima para as atividades enzimáticas de celulases totais e endoglicanases foi de 60°C (Figura 16). Para  $\beta$ -glicosidases, a atividade mais elevada foi observada na temperatura de 70 °C, mas em temperaturas de 50 °C e 60 °C os valores de atividade enzimática foram próximos a máxima (Figura 16). Em *Penicillium echinulatum*, a atividade de celulases totais foi maior a temperatura de 60 °C, enquanto que para atividade de  $\beta$ -glicosidases esteve entre 55-60 °C (CAMASSOLA et al., 2004).



**FIGURA 16.** Temperatura ótima para as atividades de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, utilizando como amostra as enzimas provenientes da cultura de *A. phoenicis* crescido durante 96 horas. Ensaios enzimáticos realizados em triplicata.

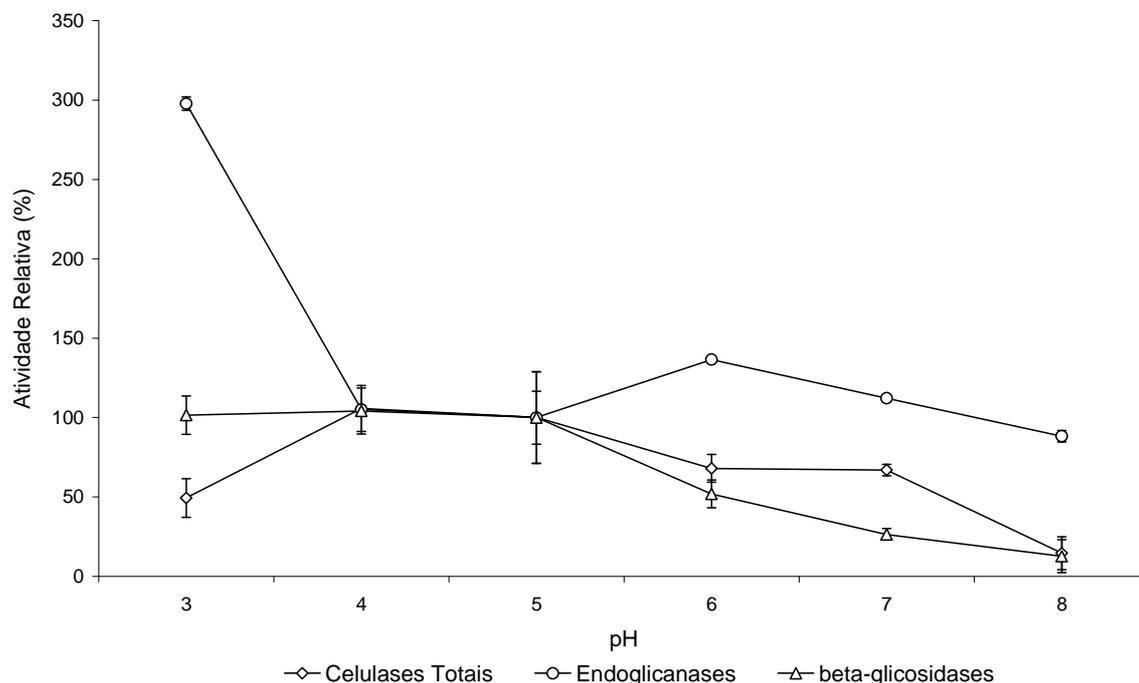
### 5.5.2 pH ótimo das atividades enzimáticas

O pH ótimos da atividade de endoglicanases foi de 3,0 o que contrastou com outras espécies de *Aspergillus*. Em *A. nidulans*, há a presença de duas endoglicanases, uma com pH ótimo em 5,0 e a outra em 6,0 (BAGGA et al., 1990), resultado semelhante ao termófilo *Melanocarpus* sp que apresentou duas endoglicanases atuando com pH ótimos em 5,0 e 6,0 (KAUR, et al., 2007).

Para celulases totais, as melhores atividades foram encontradas em pH ácido, variando, entre os pH 4,0 e 5,0. Em pH alcalino, a perda da atividade foi elevada, conforme visto na Figura 17. Em outros fungos, a secreção de celulases com atividade em pH ácido também está presente. No sobrenadante do cultivo de

*P. echinulatum*, a atividade de celulases totais foi maior em pH próximo a 4,5 (CAMASSOLA et al., 2004). O sobrenadante do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* com o pH do ensaio enzimático a 3,0 manteve 75% da atividade em relação ao seu valor ótimo de suas enzimas, que foi de 4,5, enquanto em pH neutro a atividade manteve-se em 45 %. Para atividade de  $\beta$ -glicosidases, a atividade de foi de 50% em pH 3,0 e 20% em pH 7,0 em relação ao pH 4,5 (GOMES et al., 2000).

Para atividade de  $\beta$ -glicosidases, os valores ótimos de pH variaram entre 3,0-5,0. Embora os resultados deste trabalho seja sobre o sobrenadante bruto, tais resultados conferem com a purificação de  $\beta$ -glicosidases de diferentes espécies de *Aspergillus*, com o pH de suas atividades enzimáticas mais elevadas variando entre 4,2 e 5,0 (DECKER et al., 2000). A purificação de uma  $\beta$ -glicosidase de *A. phoenicis* caracterizou a enzima com pH ótimos em 4,0 (STENBERG et al., 1977) e 5,0 (JÄGER et al., 2001). Em outros fungos, como no cultivo de dois isolados de *B. sorokiniana*, os sobrenadantes da cultura tiveram sua atividade enzimática em pH variando entre 4,0 e 5,0 sendo que um dos isolados manteve sua atividade enzimática em uma faixa de pH variando entre 3,0-9,0 embora com perdas de 50% em relação ao pH ótimo (GEIMBA & BRANDELLI 2002). Em *P. echinulatum*, a atividade enzimática ótima foi entre os pH 4,5 e 5,0, sendo que próxima ao pH 3,5 a atividade manteve-se próxima da ótima, com perdas maiores na atividade a partir do pH 5,0, com os ensaios realizados em tampão citrato de sódio 50 mM. Perdas mais elevadas nesta atividade ocorreram quando os ensaios foram realizados com tampão acetato de sódio em mesmo valor de pH (CAMASSOLA et al., 2004).



**FIGURA 17.** pH ótimo para as atividades de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, utilizando como amostra as enzimas provenientes da cultura de *A. phoenicis* crescido durante 96 horas. Ensaios enzimáticos realizados em triplicata.

### 5.5.3 Termoestabilidade das enzimas

A termoestabilidade das enzimas celulásicas foi observada para as temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C (Figuras 18, 19 e 20). Foi possível verificar que após 5 minutos de incubação, todas as atividades enzimáticas diminuíram de valor para a temperatura de 80 °C, sendo a atividade para endoglicanases reduzida totalmente após 15 minutos, porém as atividades de papel filtro e  $\beta$ -glicosidases estabilizaram-se. A temperatura de 70 °C teve pouco efeito sobre a atividade de endoglicanases, mas significativo sobre a atividade de  $\beta$ -glicosidases e papel filtro.

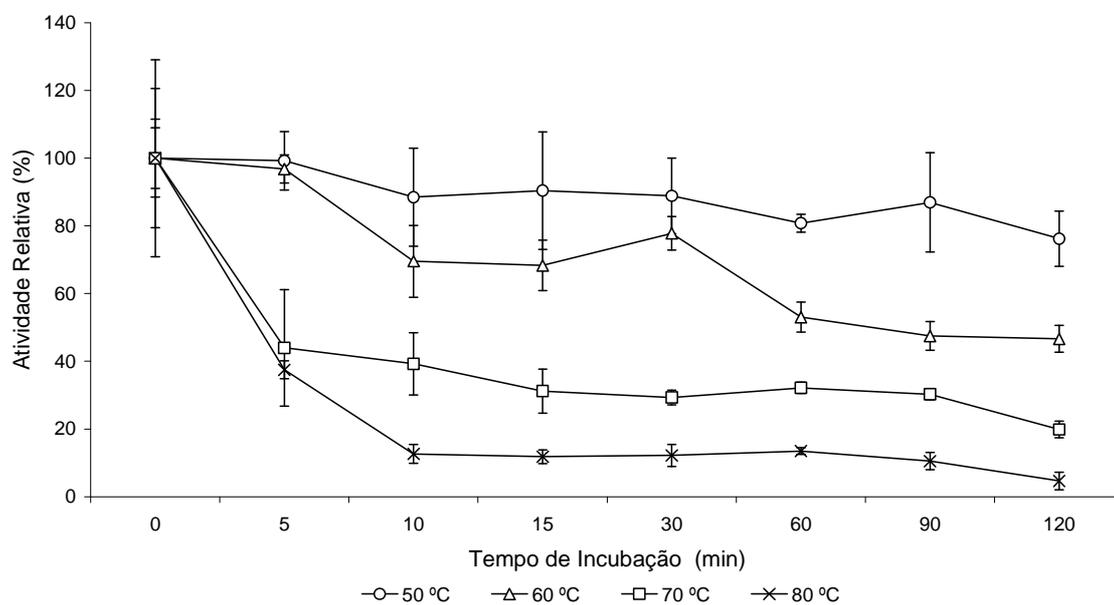
A estabilidade térmica de  $\beta$ -glicosidases a 50 °C de *A. phoenicis* (Figura 18) está descrita na literatura. JÄGER et al., (2001) verificou a estabilidade de uma  $\beta$ -

glicosidase a temperatura superior a 50 °C. Além de enzimas celulásicas, o *A. phoenicis* é capaz de secretar enzimas termotolerantes, como xilanases e  $\beta$ -xilosidases (RIZZATTI et al., 2004).

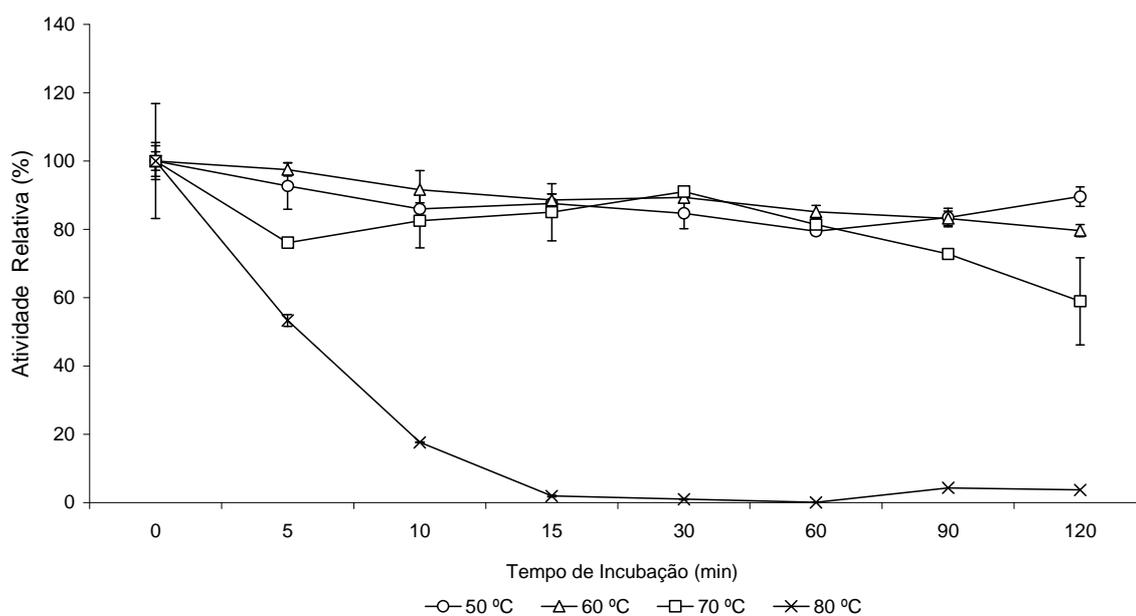
A presença de enzimas celulásicas estáveis a temperaturas entre 50 e 60 °C está presente em outros microrganismos. Em *A. niger* a meia vida de uma celobiase foi de 8 horas para a temperatura de 55 °C e 4 horas para 60 °C (RAJOKA et al., 2006).

Em *P. echinulatum*, a atividade de celulases totais sofreu perdas de 50 % da atividade em cerca de 1 h de incubação a temperatura 45, 50 e 55 °C e perda da atividade enzimática mais acentuada a 60 °C de incubação. Contudo as perdas na atividade de  $\beta$ -glicosidases não foram tão acentuadas quanto à atividade de celulases totais a temperatura no mesmo período. Apesar da perda de atividade de celulases totais e  $\beta$ -glicosidases, as atividades enzimáticas mantiveram-se estáveis após estáveis pelo período de 70 horas de incubação (CAMASSOLA et al., 2004).

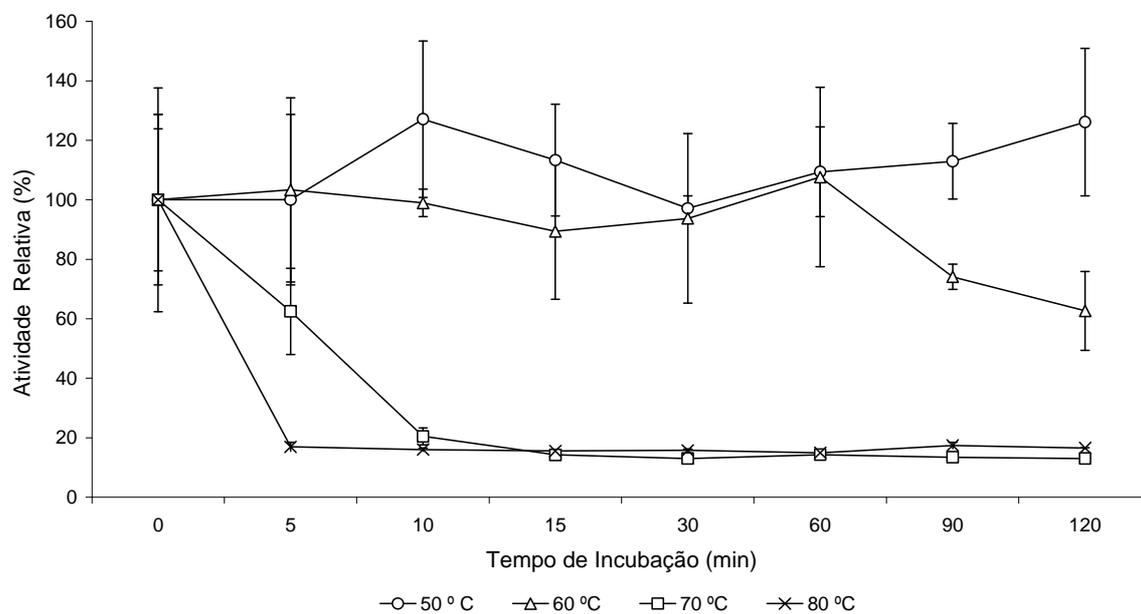
No actinomiceto *Streptomyces drozdowiczii*, o sobrenadante bruto da cultura demonstrou atividade de endoglicanses e estabilidade térmica ao longo de uma hora e meia a temperatura de 50 °C, no entanto, no mesmo período, a atividade enzimática estava reduzida a quase zero a temperatura de 60 °C (LIMA et al., 2005).



**FIGURA 18.** Efeito da incubação das enzimas provenientes do cultivo de *A. phoenicis* sobre a atividade de celulases totais em diferentes temperaturas. Experimentos realizados em triplicatas



**FIGURA 19.** Efeito da incubação das enzimas provenientes do cultivo de *A. phoenicis* sobre a atividade de endoglucanases em diferentes temperaturas. Experimentos realizados em triplicatas.



**FIGURA 20.** Efeito da incubação das enzimas provenientes do cultivo de *A. phoenicis* sobre a atividade de  $\beta$ -glicosidases em diferentes temperaturas. Experimentos realizados em triplicatas.

#### 5.5.4 Caracterização das enzimas frente a sais e reagentes

**TABELA 20.** Efeito de sais na concentração de 5 mM sobre atividade de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases.

Sais (5 mM)	Celulases totais	Endoglicanases	$\beta$ -glicosidases
Controle (sem adição de sais)*	100	100	100
Sulfato de Zinco	115	97	387
Iodeto de Potássio	89	87	290
Cloreto de Estrôncio	121	102	105
Cloreto de Sódio	122	82	108
Sulfato de Magnésio	74	74	132
Cromato de Potássio	71	78	77
Cloreto de Potássio	93	82	183
Cloreto de Lítio	127	68	115
Cloreto de Cálcio	176	71	153
Sulfato de Cobre II	4	8	132
Dicromato de Potássio	184	74	250
Cloreto de Cobalto	126	51	310
Brometo de Potássio	172	69	310
Fluoreto de Sódio	165	39	318
Cloreto de Manganês	42	56	306
Sulfato de Ferro II	149	85	265
Sulfato de Níquel	137	83	82
Cloreto de Mercúrio	38	9,6	205
Cloreto de Alumínio	137	79	123

\* Valor do Controle considerado 100%, valores do efeito dos sais são relativos à atividade do controle.

Os efeitos dos diferentes sais sobre a atividade das enzimas celulásicas provindas do cultivo de *A. phoenicis* foram testadas para três atividades: celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases.

Os resultados demonstraram que embora fossem mensuradas as atividades presentes na degradação da celulose, não foi possível criar uma regra para explicar os efeitos endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. Os sais podem ter efeitos na atividade de exoglicanases, que não puderam ser mensurados individualmente. Somado a isto, foi avaliada a atividade presente no sobrenadante bruto e não de

uma enzima isoladamente, sendo que em fungos estão descritas a presença de mais de uma enzima para uma atividade específica. Em *A. nidulans*, foram purificados 2 exoglicanases, 2 endoglicanases e duas  $\beta$ -glicosidases (BAGGA et al., 1990). ONSORI et al. (2005), demonstraram a presença de 3 endoglicanases com pesos moleculares diferentes em um isolado de *Aspergillus*. Em outro fungo, *Chrysosporium lucknowense*, foram descritas a existência de seis endoglicanases e duas exoglicanases (BUKHTOJAROV et al., 2004). Assim, um sal poderia influenciar positivamente uma enzima e reprimir outra com o mesmo tipo de atividade enzimática.

Para atividade de celulases totais, os sais Sulfato de Zinco, Cloreto de Estrôncio, Cloreto de Sódio, Cloreto de Lítio, Cloreto de Cálcio, Dicromato de Potássio, Cloreto de Cobalto, Brometo de Potássio, Fluoreto de Sódio, Sulfato de Ferro, Sulfato de Níquel e Cloreto de Alumino tiveram efeito positivo sobre a atividade enzimática. Os sais Iodeto de Potássio, Sulfato de Magnésio, Cromato de Potássio, Cloreto de Potássio, Sulfato de Cobre II e Cloreto de Mercúrio causaram diminuição na atividade de celulases totais.

Em endoglicanases, com exceção do cloreto de estrôncio, todos os sais levaram a uma perda na atividade enzimática. Para o sulfato de cobre II e o cloreto de mercúrio, a perda da atividade enzimática foi mais elevada, reduzindo em pouco mais de 90% a atividade enzimática.

Diversas endoglicanases já foram purificadas e caracterizadas na literatura. Duas endoglicanases de *Melanocarpus sp* foram purificadas e caracterizadas quanto à presença de sais. Os ensaios demonstram reações diferentes das enzimas frente a um mesmo sal, com um sal inibindo a atividade em relação à

outra enzima (KAUR et al., 2007). A ação inibitória do íon  $\text{Hg}^{2+}$  tem amparo na literatura, como em *A. nidulans*, em que o íon inibiu a atividade enzimática exoglicanases, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases (BAGGA et al., 1990). O  $\text{Hg}^{2+}$  também trouxe efeitos inibitórios sobre enzimas xilanolíticas, presente no sobrenadante bruto do cultivo de *Aspergillus giganteus* (COELHO & CARMONA, 2003).

A forte inibição do cobre sobre a atividade de endoglicanases contrasta com a purificação de uma endoglicanase do fungo *Mucor circinelloides*, que não sofreu efeitos em sua atividade na presença de cobre (SAHA, 2004). Contudo, o íon  $\text{Cu}^{2+}$  causou perdas na atividade enzimática de endoglicanases purificadas de *Gloeophyllum sepiarium* e de *Gloeophyllum trabeum* (MANSFIELD et al., 1998). No sobrenadante bruto de *Streptomyces drozdowiczii*, o  $\text{Cu}^{2+}$  causou perdas de 30% na atividade, enquanto os íons  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  estimularam a atividade enzimática (LIMA et al., 2005).

Para atividade de  $\beta$ -glicosidases, o sulfato de níquel e o cromato de potássio parcialmente inibiram a atividade, enquanto os demais íons colaboram com o incremento da atividade. O efeito estimulante da atividade do mercúrio e do alumínio contrastou com a literatura, já que a purificação de uma  $\beta$ -glicosidase de *A. phoenicis* revelou o  $\text{Hg}^{2+}$  e o  $\text{Al}^{2+}$  como inibidores da atividade (ZENG & ZHANG, 1989). Este resultado pode sugerir a presença de mais de uma enzima com atividade  $\beta$ -glicosídica, contudo mais estudos são necessários para confirmar está hipótese. Contudo, existe a descrição de  $\beta$ -glicosidases purificadas em que o  $\text{Hg}^{2+}$  age como estimulante da atividade, com no caso da levedura *Debaryomyces vanriijiae* (BELANCIC et al., 2003).

A estimulação de atividade  $\beta$ -glicosídica por  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , conforme a tabela 20 foi descrita em *Trichoderma harzianum* (YUN et al., 2001). Entretanto, o  $Zn^{2+}$  teve caráter inibitório alto na  $\beta$ -glicosidase heteróloga de *Volvariella volvacea* expressa em *Escherichia coli*, assim como o  $Cu^{2+}$  e o  $Hg^{2+}$  (LI et al, 2005).

**TABELA 21.** Efeito de detergentes e reagentes sobre atividade de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases.

Detergente ou Reagente	Celulases totais	Endoglicanases	$\beta$ -glicosidases
Controle (sem adição de detergentes e reagentes) *	100	100	100
EDTA 1Mm	61	112	114
EDTA 5Mm	57	107	31
$\beta$ - mercaptoetanol 1mM	70	98	38
$\beta$ - mercaptoetanol 5mM	58	65	26
SDS 0,1%	n.d.	90	36
SDS 0,5%	n.d.	75	21
Triton X-100 0,1%	42	83	34
Triton X-100 0,5%	41	89	42
Tween 20 0,1%	76	82	39
Tween 20 0,5%	98	83	43
Tween 80 0,1%	112	80	43
Tween 80 0,5%	68	66	39

\* Valor do Controle considerado 100%, valores do efeito dos sais são relativos à atividade do controle.

A presença de detergentes prejudicou a atividade enzimática de modo geral. Um caso particular foi a presença de SDS no ensaio de celulases totais, em que não foi possível verificar atividade enzimática devido a interação entre o detergente e o reagente de DNS, sendo necessário o descarte do ensaio. O acréscimo de EDTA permitiu uma melhor atividade de endoglicanases, o que já foi relatado em *M. circinelloides* (SAHA, 2004). A presença de EDTA fez com que as atividades de exoglicanases e endoglicanases purificadas *A. nidulans* de aumentassem (BAGGA et al, 1990). Em *G. sepiarium* e *G. trabeum*, o EDTA

provocou uma baixa inibição na atividade de endoglicanases purificadas (MANSFIELD ET AL., 1998).

A inibição de  $\beta$ -glicosidases pelo detergente aniônico SDS é descrita na literatura. Uma  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* foi purificada e perdeu metade da atividade enzimática na concentração de 1% de SDS. A mesma enzima não sofreu efeitos inibitórios quanto à presença de EDTA e 2-mercapetanol (YUN et al., 2001). Na  $\beta$ -glicosidase recombinante de *V. voluacea*, a enzima purificada sofreu inativação de atividade a SDS 0,1%, mas foi fortemente estimulada por Triton X-100 0,05% (LI et al., 2005).

A perda da atividade enzimática na presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol sugere a presença de pontes de sulfeto na estrutura das enzimas celulásicas, sobretudo para atividade de  $\beta$ -glicosidases.

## 6 CONCLUSÕES

Dentre os seis fungos filamentosos presentes na coleção do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, o fungo *A. phoenicis* foi o mais adequado para a produção de celulases, em especial de  $\beta$ -glicosidases.

Dos resíduos agroindustriais testados na seleção de meios de cultivo, o resíduo de uva, o bagaço de cana de açúcar e a casca de acácia negra tratada foram os mais promissores. Neste trabalho, buscamos utilizar o resíduo de uva para a produção de enzimas celulásicas por ser um resíduo agroindustrial que não necessita de um tratamento químico para ser utilizado, fácil acondicionamento e relacionado à indústria vinícola, representativa no estado do Rio Grande do Sul.

O planejamento fatorial demonstrou que o meio de cultivo composto por 1% Resíduo de Uva e 0,5% Peptona foi adequado para a obtenção das três atividades enzimáticas mensuradas (celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases).

A caracterização das enzimas brutas demonstrou que as atividades enzimáticas máximas de celulases totais, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases foram mais elevadas nos pHs entre os valores de 3,0 e 5,0. A temperatura de 60 °C foi considerada ótima para os três ensaios enzimáticos. Quanto a termoestabilidade,

a 50 °C no período de duas horas de incubação não aconteceram perdas na atividade. A atividade de endoglicanases manteve-se estável a 70 °C mesmo até 90 minutos de incubação.

Para a caracterização frente à presença de sais, os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  causaram perdas significativas nas atividades de celulases totais e endoglicanases. Para atividade de  $\beta$ -glicosidases a atividade manteve-se para  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Al}^{2+}$ , o que contrastou com a literatura e deve ser melhor investigado.

Frente à presença de detergentes, de modo geral as atividades enzimáticas mensuradas tiveram perdas significativas. A adição do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol prejudicou a atividade celulásica. O EDTA estimulou a atividade de endoglicanases nas concentrações de 1 e 5 mM e de  $\beta$ -glicosidases a 1 mM, porém a 5 mM acarretou perdas na atividade. Para atividade de celulases totais, o EDTA prejudicou as atividades em ambas as concentrações testadas.

## 7 PERSPECTIVAS

- Estabelecer protocolo para géis de atividade de endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, buscando caracterizar melhor as diferentes enzimas responsáveis pela degradação da celulose e o peso molecular das celulasas das mesmas. A degradação da celulose é efetuada por enzimas com diferentes atividades enzimáticas, exoglicanases, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, com mais de uma enzima atuando com as atividades citadas. A realização dos géis de atividade permitirá elucidar o número de enzimas com as atividades de endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases secretadas pelo *A. phoenicis*, bem como o peso molecular das mesmas.
- Verificar a utilização dos resíduos casca de acácia negra com tratamento alcalino e bagaço de cana de açúcar para a produção de enzimas celulásicas, bem como hemicelulasas e pectinases;
- Escalonamento para a produção em bioreator de enzimas celulásicas utilizando como meio de cultivo resíduo de uva e caracterização do processo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 57, p. 67 - 72, 2004.

AGUILAR, C.N.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; RODRIGUEZ, R.; PRADO, L. A.; LOERA, O. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 13 (1), p. 109 -113, 2004.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, p. 1298-1303, 2007.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 719 –739, 2005.

ARVANITTOYANNIS, I. S., LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford v. 41, p. 1117–1151, 2006.

BACKES, P.; IRGANG, B. Árvores cultivadas no sul do Brasil. 1ª edição, 2004. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Editora: Paisagem do Sul ISBN:85-904247-1-5 p.96-97.

BAGGA, P. S.; SANDHU, D. K.; SHARMA, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 61-68, 1990.

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M.; AGOSIN, E.  $\beta$ -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 1453-1459, 2003.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 66, p. 101-107, 1998.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, (3/4) p. 583-620, 1997.

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

BHUMIBHAMON, O. Effect of some surfactants on the production of acid proteases by *Aspergillus phoenicis* and *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v., 60 (2), p. 167-169, 1982.

BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus*  $\beta$ -Glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35 (4), p. 750-755, 1978.

BORRERO, M.A.V.; PEREIRA, J.T.V.; MIRANDA, E.E. An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford v. 25, p. 287 - 299, 2003.

BOTELLA, C.; DE ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 26, p. 100 -106, 2005.

BRUMBAUER, A.; RÉCZEY, K.  $\beta$ -glucosidase production of two different *Aspergillus* strains. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 28 (4), p. 361-370, 1999.

BUKHTOJAROV, F. E.; USTINOV, B. B.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: Isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. **Biochemistry** (Moscow), v. 69 (5), p. 542-551, 2004.

CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L.R.; SHENEM, N.T.; ANDREAUS, J DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, London, v. 22 (5-6), p. 391-396, 2004.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium* **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, p., 413–433, 2006.

CHEN, S.; WAYMAN, M. Cellulase Production induced by carbon sources derived from waste newspaper. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 93-100, 1991.

CHEN, J.; WANG, Q.; HUA, Z.; DU, G. Research and application of biotechnology in textile industries in China. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40 (7), p. 1651-1655, 2007.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 438-443, 2003.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam v. 21, p. 53–58, 2004.

COELHO, G. D.; CARMONA, E. C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43 (4), p. 269-277, (2003).

DAROIT, D. J.; SILVEIRA, S.T.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI A. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42 (5), p. 904-908, 2007.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P.  $\beta$ -glucosidases from five black *Aspergillus* species: Study of their physico-chemical and biocatalytic properties **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 4929-4936, 2000.

DESCHAMPS, F.; HUET, M. C.  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus phoenicis* in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 6 (1), p., 55-60, 1984.

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.37, p. 373-385, 2005.

DILLON, A. J. P.; PAESI-TORESAN, S. O.; BARP, L. P. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp strain denominated 3 MUV24. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto v. 15 (3), p. 491-498, 1992.

DUFF, S. J. B.; COOPER, D. G. & FULLER, O. M. Evaluation of the hydrolytic potential of a crude cellulases from mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis*. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v. 8, p. 305-308, 1986.

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M.; KVESITADZ, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 998 -1004, 2006

EMPRAPA. Site das EMPRAPA FLORESTAS, acessado em Janeiro de 2008 [www.cnpf.embrapa.br](http://www.cnpf.embrapa.br)

ESPOSITO, E. AZEVEDO, J. L. (Orgs) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, Editora: EDUCS 2004.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and Immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 85–93, 2004.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K.  $\beta$ -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Zagreb, v. 18 (3), p. 303-307, 2004.

FRANCIS, F. ; SABU, A.; MADHAVEN, N.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.15, p. 107-115, 2003.

GARCIA-KIRCHNER, O.; MUNOZ-AGUILAR, M.; PEREZ-VILLALVA, R.; HUITRON-VARGAS, C. Mixed submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98 -100 (1-9), p. 1105-1114, 2002.

GEIMBA, M. P.; RIFFEL, A.; AGOSTINI, V. BRANDELLI, A. Characterisation of cellulose-hydrolysing enzymes from the fungus *Bipolaris sorokiniana* **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79., p.1849-1854, 1999.

GEIMBA, M. P.; BRANDELLI, A. Extracellular enzymatic activities of *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 42, (4), p. 246 - 253, 2002.

GIBBS, P. A.; SEIVOUR, R. J.; SCHIMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 20, (1), p. 17–48, 2000.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, doi:10.1016/j.enpol.2008.02.028, 2008.

GOMES, I.; GOMES, J.; GOMES, D. J.; STEINER, W. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and  $\beta$ -Glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 461-468, 2000.

GOMES, J.; KUMAR, D. Production of L-methionine by submerged fermentation: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 3-18, 2005.

GOMES, J.; ESTERBRAUER, H.; GOMES, I; STEINER, W. Screening of Some wild fungal isolates cellulolytic activities. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 67-70, 1989.

GOULART, A. J.; CARMONA E. C.; MONTI, R. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48 (3), p. 327-333, 2005.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, p. 1-6, 2006.

GRIMM L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, Heildberg, v. 69, p. 375-384, 2005.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 89, p., 17–34, 2003.

HAN, S. O.; CHO, H.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H. Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186 (13), p. 4218–4227, 2004.

HANG, Y. D. & WOODAMS, E. E. Apple Pomace: A potential substrate for production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus foetidus*. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 27, p. 587-589, 1994.

HANIF, A.; YASMEEN, A. RAJOKA, M.I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus Niger*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 94, p. 311–319, 2004.

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

HAO, X.-C.; YU, X.-B.; YAN, Z.-L. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, Zagreb, v. 44 (1), p. 89–94, 2006.

HECK, J. X.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, F. P.; AYUB M. A. Z. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, p. 1902-1906, 2006.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER P.; DENNING D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology** v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 77f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2005.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 301–306, 2005.

HOPE, W. W.; WALSH, T. J.; DENNING, D. W. Laboratory diagnosis of invasive Aspergillosis. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 5, p. 609–22, 2005.

IKEDA, Y.; HAYASHI, H.; OKUDA, N.; PARK, E. Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23 (2), p. 333-338, 2007.

JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHÉR, E.; RÉCZEY, K.; KISS, L. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 17, p. 455-461, 2001.

JATINDER, K.; CHADHA, B.S.; SAINI, H.S. Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using Response Surface Methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 22, p. 169 -176, 2006.

JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A Review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p., 3519-3525, 2005.

JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BORJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p., 851–861, 2003.

KANG, S. W.; KO, E.H.; LEE, J. S.; KIM, S. W. Over-production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, p. 647–650, 1999.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p., 153-156, 2004.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a Review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 215-227, 2001.

KAUR, J.; CHADHA, B. S., KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, p. 74–81, 2007.

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

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8 (6), p. 713–722, 2007.

KUMAR, J.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTRUSCHAT, H.; STEIN, E.; NAGARAJAN, S.; KOGEL, K. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3 (4), p. 185-195, 2002.

LI, X.; PEI, J.; WU, G.; SHAO W. Expression, purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Volvariella volvacea*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 1369 -1373, 2005.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-Industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p., 272–277, 2005.

LIMA, U. A.; AUQRONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Coordenadores) *Biotecnologia Industrial V. 3. 1ª edição*, Ed. EDGARD BLÜCHER LTDA. 2001.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p. 259 -262, 2004.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 66 (3), p. 506-577, 2002.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66 (3), p. 506-577, 2002.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, Oxford, doi:10.1016/j.biortech.2007.05.018, 2007.

MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N.; GUBITZ, G. M. Characterization of Endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 23, p. 133–140, 1998.

MIRITZ, L. **Diferenciação e diversificação na agroindústria arrozeira do Rio Grande do Sul**. 2007. 83f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, p. 1217–1224, 2006.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; BUDDOLLA, V.; SUBHOSH, C. M.; RAJASEKHAR, R. B. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5 (5), p. 472-476, 2006.

NG, T.B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, New York, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 711-729, 1999.

NOUT, M.J.R.; KIERS, J.L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 789-805, 2005.

ONSORI, H.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M.; ZARGHAMI, N. Identification of over producer strain of endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *Aspergillus* species: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4 (1), p. 26-30, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: Sugarcane Bagasse. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDEY., P.; PANDEY, A.K. Production of cellulase-free thermostable xylanases by an isolated strain of *Aspergillus niger* PPI, utilizing various lignocellulosic wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 18, 281-283, 2002.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, p. 189–259, 2004.

PELACH, M.A.; PASTOR, F.J.; PUIG, J.; VILASECA, F.; MUTJE, P. Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1063-1067, 2003.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 452–481, 2006.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, p. 577–591, 2005.

RAJOKA, M. I.; AKHTAR, M. W.; HANIF, A.; KHALID, A. M. Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, p. 991–998, 2006.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1749–1754, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal* 6ª edição. Editora Guanabara Hoogan, Rio de Janeiro 2001.

RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 31, p., 88–93, 2004.

ROSA, C. A.; GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; BADOTTI, F.; VIANA, C. R.; ARAUJO, R. A. C. Cachaça: os segredos da fermentação. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, (243), p. 67-69, 2007.

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

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1871-1876, 2004.

SCAZZOCCHIO, C. *Aspergillus* genomes: secret sex and the secrets of sex. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 22 (10), p. 521-525, 2006.

SHEWALE, J. G.; SADANA, J. C. Cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by a basidiomycete species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 1204-1216, 1978.

SILVA, L. A. D.; BRANDELLI, A. Produção de queratinase por *Aspergillus phoenicis* em diferentes meios de cultivo. In: Resumo SINAFERM 2007. CD. Curitiba.

SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial desing. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41 (1), p. 170-174, 2008.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 40, p. 1-44, 1995.

SOCCOL, C. R. & VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 205–218, 2003.

STENBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P.; RESSE E. T.  $\beta$ -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 23, p. 139-147, 1976.

STEWART, J. C.; PARRY, J. C. Factors influencing the productions of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). **Journal of General Microbiology**, London, v. 125, p. 33-39, 1981.

STRULLU-DERRIEN, C.; DÉSIÉ-GEORGES, S. Mycorrhization of fossil and living plants **Comptes Rendus Palevol**, Paris. v. 6 (6-7), p. 483-494, 2007.

SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49 (5), p. 843-851, 2006.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials forethanol production: a Review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 83, p. 1–11, 2002.

TEUNISSEN, M. J.; OP DEN CAMP, H. J. M. Anaerobic fungi and their cellulotica and xylanolytic enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 63, p. 63-76, 1993.

THOMSEN, M. H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, p. 598–606, 2005.

THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B.; SCHMIDT A. S.; JØRGENSEN, H. AHRING, B, K. OLSSON, L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 606–615, 2003.

TREMACOLDI, C.R.; WATANABE, N.K.; CARMONA, E.C. Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 20, p. 639–642, 2004.

TUOMELA, M. VIKMAN, M. HATAKKA, A. ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 72, p. 169-183, 2000.

VAILLANT, F.; MILAN, P.; O' BRIEN, G.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 42, p. 215 -254, 1999.

VON POSER, G. L.; GOSMANN, G.; D'AVILA, R. R. P.; HORN, M. A. Acácia Negra. **Ciência Hoje**, São Paulo, v 11, (63), p. 68-70, 1990.

YAMANE, Y, et al. Properties of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus oryzae* and their contribution to material utilization and alcohol yield in sake mash fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93 (5), p. 479-484, 2002.

YUN, S.; JEONG, C.; CHUNG, D.; CHOI, H. Purification and some properties of a  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 65 (9), p. 2028-2032, 2001.

VARZAKAS, T. *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33 (7), p. 741-747, 1998.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, New York, 23, p. 115 -129, 2005.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 58., p. 1-75, 2006.

WEN, Z.; LIAO, W. CHEN, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3087-3094, 2005.

WHITE, S.; MCINTYRE, M.; BERRY, D. R.; MCNEIL, B. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22 (1), p. 1-14, 2002.

ZENG, Y.; ZHANG, S. Purification and properties of  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus phoenicis*. **Acta Microbiologica Sinica**, Beijing, v. 29, p. 195-199, 1989.

ZMEILI, O. S.; SOUBANI, A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. **QJM: An International Journal of Medicine**, Oxford, v. 100, p. 317-334, 2007.

## 9 APÊNDICES

## 9.1 Apêndice 1

### Análise centesimal do Resíduo de Uva

Componentes	Composição (%)
Proteínas	10,98
Glicose	1,88
Sacarose	2,60
Amido	21,44
Fibras Totais	32,98
Gorsduras/Lipídeos	9,10
Cinzas	4,30
Umidade	8,13
Outros	8,59