



VANESSA MARIA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO
DE FUNGOS FILAMENTOSOS E OTIMIZAÇÃO
DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR
Aspergillus sulphureus (Fresen.) Wehmer**

LAVRAS – MG

2012

VANESSA MARIA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES
POR *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Sára Maria Chalfoun

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Vanessa Maria.

Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e
otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus*
(Fresen) Wehmer / Vanessa Maria Pereira. – Lavras : UFLA, 2012.
111 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Sara Maria Chalfoun.
Bibliografia.

1. Screening. 2. Exo β - 1,4 glucanase. 3. Endo β - 1,4 glucanase.
4. Bioprospecção. 5. Enzimas microbianas. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

VANESSA MARIA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES
POR *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho UFLA

Dra. Ligiane Aparecida Florentino UFLA

Dr. Luis Roberto Batista UFLA

Dra. Sára Maria Chalfoun
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

A minha Mãe, Vânia e ao meu Pai, Pedro, por dedicarem parte de suas vidas à minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz na alma e felicidade na vida.

Ao meu primeiro Amor, companheiro de todas as horas, pela grande força e ajuda nos momentos difíceis, pela confiança em mim e em meu trabalho e por estar, sempre, ao meu lado.

Ao meu irmão, Vinícius, pela compreensão, companheirismo e amizade e aos meus primos, familiares e amigos que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante esta batalha...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso.

À Dra. Sara Maria Chalfoun, por sua orientação, amizade e ensinamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Às amigas do Laboratório: Deila, Ana Paula e Vicentina, pela amizade, ensinamentos, conselhos e bons momentos de descontração.

Às laboratoristas Tina e Ivani, pela gentileza, paciência e boa vontade de me ensinar;

Ao amigo Ulysses Amâncio de Frias, pelo grande apoio e sugestões na realização dos experimentos.

Aos novos amigos, Alan e Eugênio, pela grande ajuda em estatística e a a Ligiane, pelos grandes conselhos e sempre presente nos momentos difíceis.

Ao professor Luis Roberto Batista, pela colaboração e fornecimento de alguns isolados utilizados nos experimentos.

A Rose e ao professor Eustáquio Souza Dias, pela paciência e disposição para resolver assuntos burocráticos.

Aos meus pais e familiares, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus objetivos.

Ao Henrique, pelo amor, paciência, conselhos e grande apoio nas horas boas e difíceis.

“Que nada me limite
Que nada me defina
Que nada me sujeite
Que a liberdade seja a
minha própria substância.”

RESUMO

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Diante de tal oportunidade, o presente trabalho foi realizado com o objetivo avaliar e caracterizar fungos filamentosos quanto à produção qualitativa das enzimas amilase, celulase, pectinase e protease. Avaliou-se também a produção quantitativa das enzimas exo β -1,4 glucanase e exo β -1,4 glucanase pelo fungo *Aspergillus sulphureus* (EPAMIG/FA14), sob diferentes condições de temperatura (30 °C, 35 °C e 40 °C), concentrações de substrato (0,5%, 1,0% e 1,5%) e pH (6,0; 7,0 e 8,0). Os isolados fúngicos utilizados pertencem à micoteca do Ecocentro/EPAMIG e ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos da UFLA. A partir desses, procedeu-se à qualificação das enzimas em condições laboratoriais. Quarenta isolados foram avaliados quanto à produção de celulases, proteases, pectinases e amilases. Destes, 15 produziram celulases, 13 produziram proteases, 13 produziram pectinases e não foram encontrados halos que comprovassem a produção de amilases. Além desses, mais 20 isolados foram acrescidos aos 40, para a detecção de pectinases e amilases por outra metodologia, em que 32 produziram pectinases e, novamente, não foram obtidos resultados positivos na detecção de amilases. A fim de avaliar a melhor condição de cultivo para a produção quantitativa das enzimas exo β -1,4 glucanase e endo β -1,4 glucanase pelo fungo *Aspergillus sulphureus*, procedeu-se à quantificação das mesmas sob as condições estabelecidas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância e plotados em gráficos de superfície de resposta e contorno. Entre as variáveis testadas, a condição ótima de cultivo para *A. sulphureus*, para maior produção da exo β -1,4 glucanase foi: pH = 8,0, temperatura = 40 °C e concentração de substrato = 1,5%. Para endoglucanases, verificou-se que a condição ótima de cultivo para a produção foi encontrada entre 30 °C e 35 °C, pH entre 6,0 e 7,0 e concentração de 1,5% de CMC. No presente estudo, as diferentes condições de fermentação submersa foram otimizadas para a produção de celulases por *A. sulphureus* e este se mostrou um promissor produtor de endo e exoglucanases, podendo ser futuramente utilizado em indústrias e afins.

Palavras-chave: *Screening*. Fungos. Bioprospecção. Exo β -1,4 glucanase. Endo β -1,4 glucanase.

ABSTRACT

Enzyme technology is, today, one of the most promising fields within the new technologies for the synthesis of compounds of aggregated high value. So, before such an opportunity, the present work was carried out with the purpose of evaluating and characterizing filamentous fungi as to the qualitative production of the enzymes amylase, cellulase, pectinase and protease. The quantitative production of the enzymes exo β -1,4 glucanase and exo β -1,4 glucanase by the fungus *Aspergillus sulphureus* (EPAMIG/FA14), under different temperature conditions (30 °C, 35 °C and 40 °C), concentrations of substrate (0.5%, 1.0% and 1.5%) and pH (6.0; 7.0 and 8.0). The fungal isolates utilized belong to the Ecoentro/EPAMIG mycology collection and to the UFLA Mycotoxin and Food Mycology Laboratory. From those, the qualification of the enzymes under laboratory conditions was undertaken. Forty isolates were evaluated as to the production of cellulases, proteases, pectinases and amylases. From these, 15 produced cellulases, 13 produced proteases, 13 produced pectinases and no halos which supported amylase production were found. In addition to those, further 20 isolates were added to the 40 ones for the detection of both pectinases and amylases by another methodology, in which 32 produced pectinases and, again, no positive results in the amylase detection were found. In order to evaluate the best cultivation condition for the quantitative production of the enzymes exo β -1.4 glucanase and endo β -1.4 glucanase by the fungus *Aspergillus sulphureus*, the quantification of the same ones was carried out under the conditions established. The data obtained were surveyed statistically by variance analysis and plotted on response and contour surface plots. Among the variables tested, the optimum cultivation condition for *A. sulphureus*, for increased production of exo β -1.4 glucanase was: pH = 8.0, temperature = 40 °C and concentration of substrate = 1.5%. For endoglucanases, it was found that the optimum cultivation condition for the production was found between 30 °C and 35 °C, pH between 6.0 and 7.0 and concentration of 1.5% de CMC. In the present study, the different submerge fermentation conditions were optimized for cellulose production by *A. sulphureus* and this one proved an excellent producer of endo and exoglucanases, its being able to be used in industries and alike in the future .

Keywords: *Screening*. Fungi. Bioprospection. Exo β -1.4 glucanase. Endo β -1.4 glucanase.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Relação de microrganismos utilizados para avaliação do potencial enzimático	48
Tabela 2	Produção de celulasas por fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)	61
Tabela 3	Produção de proteases por fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)	64
Tabela 4	Produção de pectinases (Poligalacturonase) por fungos filamentosos (metodologia de Hankin), avaliados pelo índice enzimático (IE)	66
Tabela 5	Produção de pectinases por fungos filamentosos (metodologia de Pereira), avaliados pelo índice enzimático (IE)	67
Tabela 6	Avaliação do potencial multienzimático de fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)	70

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Desenho experimental para produção de enzimas celulolíticas	83
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Esquema de degradação da celulose..... 27

CAPÍTULO 2

Figura 1 Teste qualitativo de produção de celulases, após revelação com lugol. Microrganismos: EPAMIG/FA9 (A); EPAMIG/FA14 (B)... 62

Figura 2 Teste qualitativo de produção de enzimas proteolíticas pelos microrganismos: UFLA/FN4 (A), UFLA/FN14 (B). O círculo indica a diferença de coloração entre o halo (pouco mais esbranquiçado) e o restante do meio..... 65

Figura 3 Teste qualitativo de produção de enzimas pectinolíticas pelos microrganismos: UFLA/FN15 metodologia Hankin (A), EPAMIG/FA6 metodologia Pereira (B)..... 69

CAPÍTULO 3

Figura 1 Teste de produção de micotoxinas por *A. sulphureus* 87

Gráfico 1 Avaliação da atividade específica da exo β - 1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*. Interação pH e concentração de substrato; A: Gráfico superfície de resposta; B: Gráfico de contorno..... 91

Gráfico 2 Avaliação da atividade específica de exo β - 1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*. Interação temperatura e concentração de substrato; A: Gráfico superfície de resposta; B: Gráfico de contorno..... 93

Gráfico 3 Avaliação da atividade específica de exo β - 1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*, em interação temperatura e pH; A: Gráfico superfície de resposta; B: Gráfico de contorno 96

Gráfico 4 Avaliação da atividade específica da endo β - 1,4 glucanase de *A. sulphureus* em gráfico de superfície de resposta para as condições de concentração de substrato, pH e temperatura 98

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	13
	INTRODUÇÃO GERAL	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Enzimas microbianas na indústria	17
3.2	Seleção de microrganismos para produção industrial	18
3.3	Enzimas de importância industrial	20
3.3.1	Amilases	20
3.3.2	Pectinases	22
3.3.3	Proteases	23
3.3.4	Celulases	24
3.3.4.1	Celulose	25
3.3.4.2	Aplicações das celulases	28
3.3.4.2.1	Meio ambiente e produção de biocombustível	28
3.3.4.2.2	Outras aplicações	29
3.3.4.2.3	Fatores que influenciam na hidrólise enzimática da celulose ... 30	
3.3.4.2.4	Efeito do pH na atividade enzimática	30
3.3.4.2.5	Efeito da temperatura na atividade enzimática	31
3.3.4.2.6	Efeito e concentrações de substrato na atividade enzimática ... 32	
	REFERÊNCIAS	34
	CAPÍTULO 2 Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes substratos	42
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1	Local	47
2.2	Obtenção dos microrganismos	47
2.3	Determinação do potencial enzimático: método qualitativo 49	
2.3.1	Teste enzimático para amilases: Dingle, Teid e Solomons (1953)	51
2.3.2	Teste enzimático para amilase: Pereira (2009)	51
2.3.3	Teste enzimático para celulases: Dingle, Teid e Solomons (1953)	52
2.3.4	Teste enzimático para proteases	53
2.3.5	Teste enzimático para pectinases Hankin, Zucker e Sands (1971):	54
2.3.6	Teste enzimático para pectinases: Pereira (2009)	55

2.4	Determinação do Índice Enzimático.....	56
2.5	Delineamento experimental e análise estatística.....	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Potencial enzimático.....	58
3.1.1	Amilases	59
3.1.2	Celulases.....	60
3.1.3	Proteases.....	63
3.1.4	Pectinases	66
3.1.5	Potencial multienzimático de fungos	69
4	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	CAPÍTULO 3 Otimização da produção de exo β- 1,4 glucanase e endo β- 1,4 glucanase por <i>Aspergillus sulphureus</i> (Fresen.) Wehmer.....	77
1	INTRODUÇÃO	80
2	MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1	O microrganismo.....	82
2.2	Teste de produção de micotoxinas por <i>A. sulphureus</i>	82
2.3	Otimização da produção de celulases pelo fungo <i>A. sulphureus</i>	82
2.3.1	Atividade de exo β - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)	84
2.3.2	Atividade de endo β - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.4).....	85
2.3.3	Dosagem de proteínas totais	85
2.4	Delineamento experimental e análise estatística.....	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1	Determinação da produção de micotoxinas	87
3.2	Produção das enzimas celulolíticas	88
3.3	Produção ótima de exo β - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.91).....	89
3.4	Produção ótima de endo β - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)	97
4	CONCLUSÕES	101
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXOS	107

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A extensa diversidade genética e a plasticidade fenotípica de microrganismos presentes na natureza, que desempenham inúmeras funções nos mais variados processos dos ecossistemas, fazem com que as fontes de estudo em busca da seleção e do melhoramento de produtores de enzimas seja inesgotável. São essenciais o conhecimento e o posterior aproveitamento desses microrganismos, isolados de diversos ecossistemas naturais, visto que, um conjunto de aplicações antes desconhecidas podem ser descobertas analisando-se suas vias metabólicas e, conseqüentemente, seus metabólitos.

É amplamente discutido que enzimas de origem microbiana apresentam maior potencial industrial em relação às suas correspondentes em animais e vegetais, devido à sua grande diversidade bioquímica, à facilidade de manipulação genética e, principalmente, ao baixo custo de produção. Além disso, as possibilidades de aplicação de enzimas microbianas são infindáveis, atuando desde processos simples, como adição em detergentes e em alimentos, à biorremediação, recuperação de petróleo e até em viagens espaciais.

Muitas enzimas microbianas são exploradas comercialmente e utilizadas com sucesso em escala industrial para catalisar os diversos processos químicos. Elas provaram ser melhores, menos dispendiosas e prejudiciais ao meio ambiente que produtos químicos. Enzimas microbianas também têm sido muito utilizadas na indústria de detergentes, alimentos, bebidas, ração animal, papel, couro, produtos químicos e biomédicos, além da biorremediação de resíduos. Assim sendo, a produção enzimática tornou-se, hoje, um negócio amplamente rentável, com rendimento anual de bilhões de dólares.

Por fim, o processo de produção de enzimas de interesse, em escala industrial, de boa qualidade e custos que possibilitem sua comercialização, requer dos microbiologistas um trabalho laborioso, dispendioso e

interdisciplinar. Assim, é de grande necessidade o conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem, meio de produção, processo de fermentação, métodos de recuperação e demanda de mercado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar e caracterizar fungos filamentosos quanto à produção semiquantitativa das enzimas amilases, celulasas, pectinases e proteases, e a produção quantitativa do fungo *Aspergillus sulphureus* em diferentes condições de temperatura, concentrações de substrato e pH.

2.2 Objetivos específicos

Encontrar fungos filamentosos potenciais produtores de enzimas de interesse industrial.

Avaliar a condição ideal de pH, temperatura e concentração de substrato para a produção de endo β -1,4 glucanases e exo β -1,4 glucanases.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzimas microbianas na indústria

Enzimas são catalisadores biológicos, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia requerida para a ativação de uma determinada reação, tornando, assim, mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas (LENINGHER, 2006). Algumas enzimas são capazes de aumentar em até 10^{14} vezes a velocidade de algumas reações, sem requerer condições extremas de pH, temperatura e pressão (GODFREY; WEST, 1996). Estas têm sua atividade determinada pelas características estruturais das proteínas, que determinam suas propriedades. Cada enzima tem seu próprio mecanismo de catálise, uma vez que elas são altamente específicas (CAMPBELL, 2000).

A tecnologia enzimática é, hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, enzimas podem ser utilizadas para substituir produtos químicos, como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam desgaste de materiais (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000). A maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida a partir de microrganismos, por processos fermentativos (RAO et al., 1998).

Muitos microrganismos já foram isolados na natureza e utilizados industrialmente (o mais conhecido destes é *Saccharomyces cerevisiae*), mas a

maioria deles, de grande potencial enzimático, ainda não foi devidamente explorada. Estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias já tenham sido avaliados e identificados como produtores de enzimas de interesse industrial (SILVA; FRANCO; GOMES, 1997) e, mesmo que muitas linhagens tenham sido melhoradas geneticamente em laboratório, há sempre a possibilidade que a natureza abrigue uma linhagem com maior potencial enzimático na forma selvagem (BRAVO et al., 2000).

Aplicações de microrganismos, como bactérias, leveduras e, principalmente, fungos filamentosos, dentro da indústria, resultam, atualmente, em uma indústria extremamente diversificada e com rendimentos econômicos consideravelmente altos. Exemplos clássicos de processos microbiológicos são as fermentações, destacando-se a produção de bebidas alcoólicas e álcool etílico, etanol combustível, laticínios, ácidos orgânicos e fármacos, incluindo os antibióticos (SOARES et al., 2010). Outros produtos de origem microbiana considerados importantes são alguns polímeros de aplicação industrial, moléculas estereoespecíficas produzidas por meio de biotransformação, aditivos alimentares (aminoácidos) e vitaminas (OMURA, 1992). Harki e Rakshist (2003) também citam como exemplo a produção de enzimas termorresistentes por microrganismos extremófilos.

3.2 Seleção de microrganismos para produção industrial

O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas etc., sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial. Trata-se de uma atividade que envolve muito trabalho experimental, o que significa que tem um custo relativamente elevado, porém, pode conduzir ao isolamento de linhagens melhor produtoras de um dado produto. Mas, mais do que isto, pode conduzir à

descoberta de novos produtos, o que confere a esta possibilidade uma relevância questionável (SCHMIDELL et al., 2001).

As enzimas de origem microbiana apresentam muitas vantagens em relação às equivalentes de origem animal ou vegetal, como, por exemplo, menor custo de produção, maior facilidade de produção em larga escala, características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas ao hábitat e à fisiologia do microrganismo produtor (por exemplo, organismos termófilos produtores de enzimas termorresistentes), possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável (OLIVEIRA et al., 2006; PASTORE, 2002). Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, torna possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Enzimas com a mesma forma de atuação sob o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer seleção de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas (PASTORE, 2002). Para produzir uma enzima comercialmente, torna-se necessário fazer a seleção de microrganismos produtores e otimizar as condições para alcançar rentabilidade e eficiência do processo (SCHMIDELL et al., 2001). Diversos fatores devem ser considerados durante a produção de enzimas, tais como a composição do meio de cultivo, o substrato para a produção da enzima, a temperatura de incubação, o pH do meio de cultivo e de produção, a aeração e o uso de indutores, dentre outros (THIRY; CINGOLANI, 2002).

O processo de produção industrial de enzimas de origem microbiana pode ser dividido em duas etapas: processo fermentativo e processo de separação e recuperação das enzimas a partir da fermentação (RODARTE,

2005). Dentro desse processo, espera-se que os microrganismos apresentem as seguintes características gerais (SCHMIDELL et al., 2001; STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995):

- a) não ser patogênicos e ou toxigênicos;
- b) apresentar elevada eficiência na conservação do substrato em produto;
- c) permitir o acúmulo do produto no meio;
- d) não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- e) apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- f) não exigir condições de processos laboriosas;
- g) não exigir meios de cultura dispendiosos;
- h) permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Além disso, para a célula, há sempre a tendência de otimizar o crescimento em detrimento da síntese do produto, motivo pelo qual não basta verificar se a célula cresce, mas se ela continua a acumular o produto de maneira eficaz (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

3.3 Enzimas de importância industrial

3.3.1 Amilases

Devido à característica de especificidade das enzimas, cada substrato tem uma enzima respectiva. No caso do amido, são as amilases as responsáveis pela sua quebra. O amido está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado, principalmente, em sementes de cereais, como milho, trigo e arroz,

em tubérculos ou raízes, como batata e mandioca, sendo o principal polissacarídeo de reserva das plantas superiores (MORAES, 2004).

Enzimas amilolíticas atuam na quebra das ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina (GUPTA et al., 2003; LIN; HSU; CHU, 1997). Duas enzimas realizam a conversão do amido em glicose. São elas: α -amilase, que corta grandes α -1,4-polímeros de glicose ligados, em oligômeros mais curtos e a glicoamilase, que hidrolisa os oligômeros à glicose.

A utilização de enzimas degradantes de amido foi a primeira aplicação em larga escala de enzimas microbianas na indústria (GUIMARÃES et al., 2006). Estas enzimas, as amilases, estão entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica, especialmente no processo que envolve a hidrólise do amido. Estão presentes em indústrias têxteis, cerveja e bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, ração animal, detergentes, química e farmacêutica. Apesar de as amilases serem provenientes de diferentes fontes (plantas, animais e microrganismos), amilases microbianas são mais produzidas e utilizadas na indústria, devido à sua produtividade e termoestabilidade (BURHAN et al., 2003; FOSSI; TAVEA; NDJOUENKEU, 2005; JAMES; LEE, 1997; PANDEY et al., 2000).

As enzimas amilolíticas mais utilizadas são aquelas produzidas por fungos filamentosos, principalmente os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (PANDEY et al., 1999). Na indústria, o gênero *Aspergillus* é utilizado no processamento do amido para a produção de xarope de glicose. Além disso, várias espécies desse gênero têm sido utilizadas para a produção de várias enzimas hidrolíticas, sendo a glicoamilase a mais importante (JAMES; LEE, 1997).

3.3.2 Pectinases

Enzimas capazes de consumir tecidos de plantas e matar células vegetais, por conta própria, são conhecidas como enzimas pécticas ou pectinases (ALGHISI; FAVARON, 1995; ANNIS; GOODWIN, 1997). Estas enzimas desempenham relevante papel no crescimento de plantas, no amadurecimento de frutos e também na degradação e apodrecimento de vegetais (WALSH; HEADON, 1994).

Substâncias pécticas são polissacarídeos estruturalmente complexos que ocorrem, principalmente, na lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores (MARCHI et al., 2001), compostas de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (HERRON et al., 2000; KASHYAP et al., 2001). São classificadas em: protopectina (a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais, insolúvel em água e totalmente metoxilada), ácido péctico (composto de resíduos de ácido poligalacturônico coloidal completamente desmetoxilada) e pectina e ácido pectínico (possuem um grau variável de metoxilação). Esta última, em condições adequadas, é capaz de formar géis com ácidos e açúcares (SAKAI et al., 1993).

Essas substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas produzidas naturalmente por plantas, bactérias, leveduras e, principalmente, por fungos filamentosos, as pectinases. Estas enzimas são classificadas, quanto ao seu modo de ação, em hidrolases (poligalacturonase, PG), que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico e liases (pectina liase, PMGL), também chamadas de transeliminases, que rompem ligações glicosídicas, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 (BLANCO, 1994; KASHYAP et al., 2001).

As pectinases ainda podem ser classificadas segundo a preferência ao substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina) e em ácidas ou alcalinas (KASHYAP et al., 2001; PILNIK; VORAGEN, 1993). As enzimas pécticas ácidas são utilizadas, principalmente, no processamento de sucos de frutas (para aumentar o rendimento e melhorar o processamento sem o aumento de custos), vinhos, maceração de plantas, liquefação e sacarificação de biomassa, enquanto as pertencentes ao grupo das alcalinas são aplicadas na indústria têxtil, no branqueamento de polpa e papel, na extração de óleo vegetal e na fermentação de chá e café (BHAT, 2000).

3.3.3 Proteases

Enzimas proteolíticas desempenham papel importante no metabolismo de quase todos os organismos (plantas, animais, fungos, bactérias e vírus) (RAO et al., 1998). De acordo com Rojas et al. (2009), a investigação de proteases é uma questão central em enzimologia, devido à sua imensa importância fisiológica e ampla aplicação econômica. Análise da literatura sobre enzimas microbianas proteolíticas sugere três principais linhas de investigação para proteases fúngicas: para aplicações econômicas; se elas podem atuar como patógenos causando doenças em humanos, animais ou plantas e se microrganismos produtores podem ser modelos para o estudo das características físico-químicas e biológicas do papel dessas enzimas.

As proteases executam grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes. Estas proteínas têm papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, como catabolismo de proteínas, coagulação do

sangue, crescimento e migração celular, crescimento de tumores e metástases e transporte e secreção de proteínas através da membrana (RAO et al., 1998).

As proteases de origem microbiana são importantes, pois elas atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser utilizadas em diversas áreas da bioquímica e da biotecnologia (BARATA et al., 2002). Sabe-se que microrganismos produzem maiores quantidades de enzimas proteolíticas quando estão em um meio de cultura rico, com facilidade de acesso aos nutrientes. Isto causa a diminuição da repressão catabólica e ativa a síntese e a secreção de exoenzimas (NISHIWAKI; ASANO; OHYAMA, 2009). Estas enzimas são caracterizadas por especificidade de substrato (KUDRYAVTSEVA et al., 2010).

Enzimas proteolíticas estão entre as enzimas de maior importância no mercado, sendo responsáveis por grande parte da movimentação financeira neste setor. São empregadas na indústria de detergentes e também na alimentícia, na farmacêutica, no tratamento de couro, na recuperação de prata em filme de raios X e no tratamento de resíduos industriais (DAMHUS et al., 2008).

3.3.4 Celulases

As enzimas conhecidas como celulases hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. A classificação das hidrolases *O*-glicosídicas (EC 3.2.1.-), conforme a nomenclatura enzimática IUB – MB, é feita com base na sua especificidade ao substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular. De acordo com esta nomenclatura, o 3 refere-se a hidrolases; 3.2 glicolases e 3.2.1. glicosidase, isto é, enzimas que hidrolisam compostos *o*-glicosil ou *s*-glicosil (WULFF; CARRER; PASCHOLATI, 2006). Uma classificação com base nas similaridades da sequência de aminoácidos do domínio catalítico foi proposta

por Henrissat (1991) e Henrissat e Bairoch (1993) e têm-se, atualmente, 120 famílias de hidrolases glicosídicas. A hidrólise enzimática das pontes glicosídicas ocorre por meio da catálise ácida geral, em que são necessários dois aminoácidos críticos: um doador de prótons e um nuceófilo/base. A catálise ácida é, usualmente, promovida pelos resíduos aspartato e/ou glutamato. Nessa catálise ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção, respectivamente, da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado (DAVIES; WILSON; HENRISSAT, 1997; GILKES et al., 1991).

3.3.4.1 Celulose

A celulose é o polímero orgânico mais comumente encontrado no mundo, sendo o componente mais importante da parede celular das plantas. Representando $1,5 \times 10^{12}$ do total anual de produção de biomassa através da fotossíntese, especialmente nos trópicos, é considerada uma fonte quase inesgotável de matéria-prima para diferentes produtos (GUO et al., 2008; KLEMM et al., 2005). Sua composição química é simples, consistindo de cadeias lineares de D-glicose (mais de 10.000) unidas por ligações β -1,4 com alto grau de polimerização e elevado peso molecular (GIGER-REVERDIN, 1995; KLEMM et al., 2005). Em sua forma cristalina, apresenta-se altamente ordenada, o que confere alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas, enquanto as regiões menos ordenadas são denominadas regiões amorfas. Esta heterogeneidade faz com que as fibrilas capazes de inchar quando parcialmente hidratadas tenham como resultado microporos e cavidades suficientemente grandes para permitir a penetração de moléculas maiores, incluindo enzimas (FAN; LEE; BEARDMORE, 1980).

A celulose é um polímero incomum entre os biopolímeros. Suas cadeias podem ser reforçadas inter e intra por meio de pontes de hidrogênio, formando as microfibrilas de celulose. O grau de cristalinidade destas fibrilas ou a presença de outros polímeros associados à matriz celulósica são de grande importância na avaliação, pois esta interação pode influenciar na suscetibilidade da molécula de celulose a hidrólise enzimática microbiana (MARCHESSAULT; SUNDARARAJAN, 1993; SOEST, 1994).

Nas etapas envolvidas em uma degradação microbiana da celulose, é produzido um complexo multienzimático, formado por três componentes enzimáticos básicos que agem sinergicamente na hidrólise da celulose (WULFF, 2006). São eles

- a) **endoglucanases** (EC 3.2.1.4) [EG] são enzimas que catalisam, ao acaso, a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglicanases são também conhecidas como celulases, endo β -1,4 glucanases e carboximetil celulases (CMCases). Seus substratos naturais são a celulose e a xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose microcristalina), β -glicana e xilana;
- b) **celulose β -1,4-celobiosidases** (EC 3.2.1.91), [CBH] conhecidas também como exoglicanases, celobio-hidrolases, β -1,4-celobio-hidrolases ou avicelases. Catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e na celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias;
- c) **β -glicosidases** (EC 3.2.1.21), conhecidas como gentobiasas, celobiasas e amigdalases. Catalisam a hidrólise de resíduos β -D-

glicose terminais não redutores, liberando β -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos.

De acordo com o modelo de “endo-exo” sinergismo (Figura 1), endoglucanases (CMCases) decompõem celulose aleatoriamente, mudando rapidamente o seu grau de polimerização, produzindo novos sítios de ação para a exoglucanases, que agem hidrolisando o terminal não-redutor do polímerom liberando celobiose como produto principal, enquanto s β glicosidases são responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celuloligossacarídeos e celobiose em glicose, que pode, então, ser usadas em várias vias metabólicas dos microrganismos (CAO; TAN, 2002).

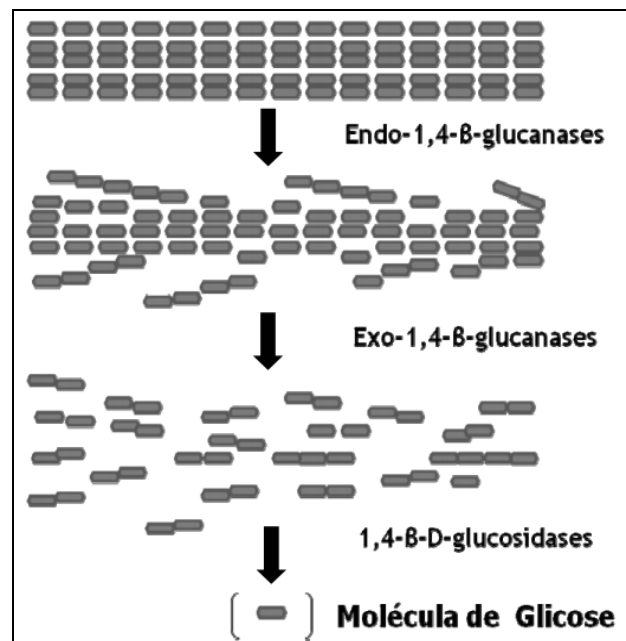


Figura 1 Esquema de degradação da celulose
Fonte: Oliveira (2010)

3.3.4.2 Aplicações das celulases

3.3.4.2.1 Meio ambiente e produção de biocombustível

Atualmente, os problemas de energia e meio ambiente são grandes obstáculos para o desenvolvimento da civilização humana. A demanda mundial de energia está aumentando de forma constante, assim como a população e o desenvolvimento econômico cresce. No entanto, o recurso energético predominante, o combustível fóssil, é limitado e, além disso, causa grandes prejuízos à camada de ozônio (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Assim, existe um interesse crescente e esforços contínuos são realizados para se encontrar fontes alternativas de energia, como a biomassa agrícola, para substituir formas de energia baseadas em combustíveis fósseis. O uso de biomassa para a geração de energia pode completar outras fontes renováveis, como a eólica e a solar e reduzir as emissões de gases do efeito estufa, assim como contribuir para o desenvolvimento sustentável (XING-HUA et al., 2009).

A cada ano, a fixação fotossintética de CO₂ produz mais de 10¹² toneladas de material vegetal seco em todo o mundo e quase a metade desse material é composta de celulose (LESCHINE, 1995). Na realidade, a biomassa vegetal terrestre armazenada tem uma energia total equivalente de, aproximadamente, 640 bilhões de toneladas de petróleo, o que é igual ao total das reservas de combustíveis fósseis existentes (COUGHLAN, 1985). Nesse contexto, toda celulose e hemicelulose abundante poderiam ser convertidas em etanol combustível por meio da fermentação da biomassa celulósica. No entanto, grande parte do etanol produzido no mundo é originária da fermentação do milho ou, como no Brasil, da cana-de-açúcar, o que consome, além do próprio alimento, áreas de cultivo, gerando uma competição séria com a alimentação humana (LIN; TANAKA, 2006). Este conflito necessita de uma solução, que

pode ser encontrada no campo da biotecnologia das enzimas celulolíticas que podem hidrolisar a biomassa com alta eficiência (XING-HUA et al., 2009).

3.3.4.2.2 Outras aplicações

As celulasas se tornaram o terceiro grupo de enzimas mais utilizadas na indústria, desde sua introdução (XIA; CEN, 1999). Na indústria têxtil, de jeans, são utilizadas em substituição à pedra-pomes para dar maciez e adornar peças (BELGHITH; ELLOUZ-CHAABOUNI; GARGOURI, 2001). Também são utilizadas no acabamento, digerindo as pequenas extremidades de fibras salientes de tecido (CORTEZ; ELLIS; BISHOP, 2001).

Além de serem amplamente utilizadas nas indústrias de detergente, as celulasas são utilizadas nas indústrias de alimento, assim como as pectinases, na extração e na clarificação de sucos de frutas e vegetais, na produção de néctares de frutas e purês e na extração de óleo de oliva. Glucanases são adicionadas em cervejarias para melhorar o malte na fabricação de cervejas (GALANTE; CONTI; MONTEVERDI, 1999). Nas indústrias de vinho, a melhor maceração e coloração são conseguidas por meio da utilização de hemicelulasas exógenas e glucanases. Estas enzimas celulolíticas também são utilizadas na extração de carotenoides, na produção de corantes alimentícios (CINAR, 2005).

A adição de celulasas é utilizada para melhorar a qualidade nutricional de forragens, o que, comprovadamente, trouxe melhorias na digestibilidade e no desempenho animal (KUNG JUNIOR et al., 1997; LEWIS et al., 1996).

Na indústria de polpa e papel, celulasas e hemicelulasas têm sido empregadas na polpação biomecânica (AKHTAR, 1994), na descoloração de fibras recicladas, na preparação do papelão biodegradável (PERE et al., 1995) e também na fabricação de papéis toalha e higiênico (HSU; LAKHANI, 2002).

3.3.4.2.3 Fatores que influenciam na hidrólise enzimática da celulose

Tanto fatores físicos quanto químicos podem influenciar a produção de celulases por microrganismos celulolíticos (FURLANETO, 1989).

As reações enzimáticas são amplamente afetadas por variações na temperatura e no pH, no tamanho do inóculo, nas fontes de carbono, na presença de indutores e ou inibidores, na aeração e no tempo de crescimento (MUKHOPADHYAY; MALIK, 1980). Além desses, outros fatores influenciam a velocidade das reações enzimáticas de degradação de celulose, como multiplicidade de substrato, cristalinidade, estrutura molecular área de superfície, grau de polimerização, acessibilidade a ligações glicosídicas e sistema de multienzimas (COUGHLAN, 1985).

3.3.4.2.4 Efeito do pH na atividade enzimática

Todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração de H^+ do meio. Existe uma zona de pH para qual a atividade enzimática é máxima. Usualmente, cada enzima possui um pH ótimo porque, como outras proteínas, estas possuem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácido da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Isto pode levar a uma troca na velocidade máxima de reação (V_{\max}), uma troca na afinidade da enzima pelo substrato (K_m) ou uma alteração na estabilidade da enzima, sendo esta dependente, exclusivamente, do tempo em que a enzima se mantém exposta ao pH desfavorável. De forma similar, os grupos ionizáveis do substrato podem ser afetados pelo pH, já que possuem estados de ionização diferentes, de acordo com o pH, influenciando a formação do complexo enzima-substrato (THYS, 2004).

Em geral, todos os efeitos ocorrem simultaneamente, assim como podem ser produzidos de forma desejada. A presença de uma grande amplitude da faixa de pH ótimo se deve ao fato de o substrato em questão ser não ionizável (WISEMAN, 1991).

Dado que o pH afeta a taxa de crescimento dos microrganismos, as variações de pH podem causar importantes alterações na constituição microbiana. Para que o pH se mantenha num valor ótimo para atividade biológica e produção enzimática, é essencial que exista uma suficiente capacidade tampão que permita neutralizar possíveis alterações durante o crescimento (FONSECA; TEIXEIRA, 2007).

3.3.4.2.5 Efeito da temperatura na atividade enzimática

A taxa específica máxima de crescimento varia com a temperatura de forma análoga à observada com a velocidade de uma reação enzimática, aumenta com a temperatura até um determinado valor, observando-se, a partir daí, um decréscimo acentuado, decorrente da desativação térmica das proteínas. A temperatura ótima para uma estirpe, quando cultivada num meio com uma determinada composição e a um valor controlado de pH, resulta da interação entre estes dois efeitos (FONSECA; TEIXEIRA, 2007).

Como já descrito, de maneira análoga ao pH, existe uma zona de temperatura para qual a atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é resultado de duas tendências antagônicas. De um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e de outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A desnaturação da proteína leva tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade de reação se produza de maneira instantânea. Dessa forma, a uma

temperatura determinada, a atividade real, medida em unidades, irá diminuindo, à medida que se aumenta o tempo de incubação (SCRIBAN, 1985; TREVAN et al., 1990).

Esta desnaturação vai modificar a estrutura terciária e a quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De maneira geral, as baixas temperaturas não têm efeito desnaturante, entretanto, a repetição de transições sólido-líquido e congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas de atividade (SCRIBAN, 1985; THYS, 2004).

3.3.4.2.6 Efeito e concentrações de substrato na atividade enzimática

Os substratos têm de ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e à finalidade de sua atividade, que é produzir enzimas. Além de uma composição capaz de suprir as exigências do microrganismo, para seu melhor desempenho, devem estar devidamente condicionados, em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (SCHMIDELL, 2001).

Diversos têm sido os substratos utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos, bem como diferentes concentrações desses. A eficácia de materiais celulolíticos como indutores parece depender de sua susceptibilidade ao ataque pelo fungo (VITTI, 1988).

A concentração de substrato afeta diretamente a velocidade das reações enzimáticas. A velocidade de uma reação catalisada por enzima aumenta conforme aumenta a concentração de substrato, até a velocidade máxima ser atingida (LENNINGER, 2007).

Em concentrações baixas, a taxa de reação é estritamente proporcional à concentração de substrato, mas, uma vez que a concentração de substrato

aumenta para além de certo nível, não existem sítios disponíveis para estes. Isso é chamado saturação, quando as enzimas catalisam o máximo que podem em menos tempo e a taxa de reação atinge o seu máximo potencial (SILVERTHORN, 2010).

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. **Holzforschung**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 199-202, Jan. 1994.
- ALGHISI, P.; FAVARON, F. Pectin degrading enzymes and plant-parasite interactions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, n. 4, p. 365-375, July 1995.
- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 225-230, July/Aug. 2002.
- ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell-wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 1-14, Mar. 1997.
- BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, Aug. 2002.
- BELGHITH, H.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 257-262, Aug. 2001.
- BHAT, M. K. Cellulases related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, May 2000.
- BLANCO, P. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 11, p. 974-977, Nov. 1994.
- BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 137-152, jan./fev. 2000.
- BURHAN, A. et al. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 10, p. 1397-1403, May 2003.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CINAR, I. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 945-949, Feb. 2005.

CORTEZ, J. M.; ELLIS, J.; BISHOP, D. P. Cellulase finishing of woven, cotton fabrics in jet and winch machines. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 239-245, Aug. 2001.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle Upon Tyne, v. 3, n. 1, p. 39-109, 1985.

DAMHUS, T. et al. **All of Novozymes S/A**. 3rd ed. Bagsvaerd: Novozymes, 2008. 62 p.

DAVIES, G. J.; WILSON, K. S.; HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, London, v. 321, n. 2, p. 557-559, Apr. 1997.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 22, p. 177-199, 1980.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reatores biológicos: fundamentos e aplicações**. Lisboa: Lidel, 2007. 483 p.

FOSSI, B. T.; TAVEA, F.; NDJOUENKEU, R. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 4, n. 1, p. 14-18, 2005.

FURLANETO, M. C. **Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai***. 1989. 152 f. Dissertação (Mestrado em Agranomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1989.

GALANTE, Y. M.; CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK, C. P. (Ed.). *Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications*. London: Taylor & Francis, 1998. v. 2, p. 327-342.

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 295-334, Aug. 1995.

GILKES, N. R. et al. Domains in microbial β -1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 55, n. 2, p. 303-315, Apr. 1991.

GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T. (Ed.). **Industrial enzymology**. 2nd ed. London: Macmillan, 1996. p. 120-138.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, Oct./Dec. 2006.

GUO, R. et al. Molecular cloning and characterization of two novel cellulase genes from the mollusc *Ampullaria crosseana*. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 178, n. 2, p. 209-215, Apr. 2008.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, June 2003.

HARKI, G. D.; RAKSHIST, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 89, n. 1, p. 17-34, Feb. 2003.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, London, v. 280, n. 2, p. 309-316, Dec. 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, London, v. 293, n. 3, p. 781-788, June 1993.

HERRON, S. H. et al. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 97, n. 16, p. 8762-8769, 2000.

HSU, J. C.; LAKHANI, N. N. **Method of making absorbent tissue from recycled waste paper**. US PI n. 6413363. 2 July 2002.

JAMES, J. A.; LEE, B. H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 21, n. 1, p. 1-52, Feb. 1997.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 215-227, June 2001.

KLEMM, D. et al. Cellulose, chemistry and application. **Angewadte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, Apr. 2005.

KUDRYAVTSEVA, N. N. et al. The influence of cultural medium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Clifton, v. 46, n. 3, p. 324-330, Mar. 2010.

KUNG JUNIOR, L. et al. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 10, p. 2045-2051, Oct. 1997.

LENNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 1232 p.

LEHNINGER, A. L. et al. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LESCHINE, S. B. Cellulose degradation in anaerobic environments. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 399-426, 1995.

LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.74, n. 12, p. 3020-3028, Dec. 1996.

LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 325-334, June 1997.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 6, p. 627-642, Dec. 2006.

MARCHESSAULT, R. H.; SUNDARARAJAN, P. R. **Cellulose, in the polysaccharides**. New York: Academic, 1993. v. 2, 379 p.

MARCHI, G. et al. Pectic enzymes production by *Phaeomonilla chlamydospora*. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 40, n. 3, p. 407-416, 2001.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, New York, v. 68, n. 16, p. 61-138, 2000.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

MUKHOPADHYAY, S. N.; MALIK, R. K. Increased production of cellulase of *Trichoderma* species by pH cycling and temperature profiling. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 22, n. 11, p. 2237-2249, Nov. 1980.

NISHIWAKI, T.; ASANO, S.; OHYAMA, T. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 6, p. 605-609, June 2009.

OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez. 2006.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OMURA, S. The expanded horizon for microbial metabolites: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, n. 1/2, p. 141-149, 1992.

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Clifton, v. 31, n. 2, p. 135-152, Apr. 2000.

_____. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Columbus, v. 77, n. 1, p. 149-162, Jan. 1999.

PASTORE, G. M. Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Anais...** Brasília: UnB, 2002. 1 CD-ROM.

PERE, J. et al. Effects of purified *T. reesei* cellulases on the fibre properties of kraft pulp. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 78, n. 1, p. 71-78, Apr. 1995.

PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture. In: NAGODAWITHAMA, T.; REED, G. (Ed.). **Enzymes in food processing**. New York: Academic, 1993. p. 79-82.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Victoria, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ROJAS, J. A. et al. Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 63, n. 2, p. 169-175, Feb. 2009.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, n. 1, p. 213-294, Jan. 1993.

SCHIMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 54 p.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985. 489 p.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SILVERTHORN, D. U. **Human physiology: an integrated approach**. 5th ed. Addison: Pearson, 2010. 867 p.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, maio/jun. 2010.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. New York: Cornell University, 1994. 476 p.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. London: Elsevier Science, 1995. 357 p.

THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 103-105, Mar. 2002.

THYS, R. C. S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10**. 2004. 102 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TREVAN, M. D. et al. **Biotecnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990. 284 p.

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e de seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 1988. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

WALSH, G.; HEADON, D. **Protein biotechnology**. London: Wiley, 1994. 371 p.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de las enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991. 444 p.

WULFF, N. A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F. Expression and purification of cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 3, p. 198-203, Sept. 2006.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, London, v. 34, n. 9, p. 909-912, Oct. 1999.

XING-HUA, L. et al. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 11, p. 2418-2422, Nov. 2009.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 2, p. 17-34, Feb. 2001.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES SUBSTRATOS

RESUMO

Enzimas de origem microbiana são mais eficientes que as extraídas de plantas e animais. Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são particularmente interessantes, devido à produção de enzimas extracelulares, que são de grande potencial industrial. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de enzimas por fungos filamentosos de diferentes gêneros, a fim de encontrar microrganismos potenciais produtores de amilases, pectinases, celulasas e proteases. Os microrganismos foram obtidos da micoteca do Ecocentro/EPAMIG e no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos da UFLA. A partir desses, procedeu-se à qualificação das enzimas. A determinação enzimática foi expressa em índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. Quarenta isolados fúngicos foram avaliados como potenciais produtores de celulasas, proteases, pectinases e amilases. Destes, 15 produziram celulasas, 13 produziram proteases, 13 produziram pectinases e não foram encontrados halos que comprovassem a produção de amilases. Além desses, mais 20 isolados foram acrescidos aos 40, para a detecção de pectinases e amilases pela segunda metodologia, em que 32 produziram pectinases e, assim como verificado anteriormente, nenhum isolado apresentou halos de produção de amilases. Dos microrganismos testados, 37,5% produziram celulasas. Destes, apenas o isolado EPAMIG/FA10, com 1,6, teve índice enzimático menor que 2,0. O isolado EPAMIG/FA14 obteve maior índice enzimático, com 28,3. Dos 40 isolados analisados para a produção de proteases, 13 apresentaram halos indicativos de produção, contudo, apenas o isolado UFLA/FN16 apresentou IE = 2,0, não havendo valores maiores. Treze fungos foram capazes de produzir pectinases pela primeira metodologia, entretanto, nenhum obteve índice enzimático maior que 2,0. Já na segunda metodologia testada, 53% produziram pectinases e, destes, apenas 6 tiveram IE < 2,0. O maior halo apresentado para esta enzima foi 8,8. Dos isolados testados, não foram encontrados fungos que produzissem todas as enzimas acima do índice enzimático, entretanto, os isolados EPAMIG/FA 10, EPAMIG/FA12 e EPAMIG/FA14, das espécies *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor* e *A. sulphureus*, respectivamente, produziram as três enzimas.

Palavras-chave: Método Qualitativo. Amilases. Celulasas. Proteases. Pectinases.

ABSTRACT

Enzymes of microbial origin are more efficient than the ones extracted from plants and animals. Out of microorganisms, filamentous fungi are particularly interesting due to the production of extracellular enzymes, which are of great industrial potential. In this way, his work was conducted with the purpose of evaluating the production of enzymes by filamentous fungi of different genera in order to find potential microorganisms producing of amylases, pectinases, cellulases and proteases. The microorganisms were obtained from the Ecocentro/EPAMIG mycology collection and in the UFLA Mycotoxin and Food Mycology Laboratory. From those, the qualification of the enzymes was conducted. The enzymatic determination was expressed in enzymatic index (IE) by means of the ratio average diameter of the degradation halo and the colony average diameter. Forty fungal isolates were evaluated as potential producers of cellulases, proteases, pectinases and amylases. From those, 15 produced cellulases, 13 produced proteases, 13 produced pectinases and no haloes which supported amylase production were found. In addition to those, further 20 isolates were added to the 40 ones for the detection of both pectinases and amylases by the second methodology, in which 32 produced pectinases and, as verified previously, no isolate presented amylase-producing halos. From the microorganisms tested, 37.5% produced cellulases. Out of these, only isolate EPAMIG/FA10, with 1.6, presented an enzymatic index lower than 2.0. The isolate EPAMIG/FA14 obtained the greatest enzymatic index, with 28.3. Out of the 40 isolates surveyed for protease production, 13 presented production-indicting halos, however, the isolate UFLA/FN16 presented IE = 2.0, there being no higher values. Thirteen fungi were capable of producing pectinases by the first methodology, nevertheless, none obtained enzymatic index greater than 2.0. But in the second methodology tested, 53% produced pectinases and, of those, only 6 had IE < 2.0. The largest halo presented for this enzyme was 8.8. From the isolates tested, fungi which produced the enzyme above the enzymatic index were not found, however, the isolates EPAMIG/FA 10, EPAMIG/FA12 and EPAMIG/FA14, of the species *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor* and *A. sulphureus*, respectively, produced the three enzymes.

Keywords: Qualitative Method. Amylases. Cellulases. Proteases. Pectinases.

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática, hoje, é empregada em diversos setores. A busca por produtos biodegradáveis, que não agridam o meio ambiente, impulsionou o crescimento do emprego de enzimas na indústria. Associadas à proteção do meio ambiente, outras características justificam o grande interesse pelo uso de enzimas, como sua alta especificidade e seu processo de obtenção mais econômico. Áreas de atuação de enzimas na indústria vêm sendo gradativamente ampliadas, uma vez que a preocupação em preservar o meio ambiente trouxe a busca por novas tecnologias (RAO et al., 1998; RODARTE, 2005).

Enzimas microbianas são, muitas vezes, mais úteis do que enzimas derivadas de plantas ou animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas, alto rendimento, facilidade de manipulação genética, crescimento rápido de microrganismos e baixo custo. Estas enzimas também são mais estáveis que suas correspondentes em plantas e animais e sua produção é mais conveniente e segura. Entre o grande número de microrganismos capazes de produzir enzimas úteis, fungos filamentosos são particularmente interessantes, devido à alta produção de enzimas extracelulares de grande potencial industrial. Essas enzimas são aplicadas na industrialização de detergentes, amido, bebidas, alimentos, ração animal, fermento, polpa e papel, couro, produtos químicos e biomédicos (GUIMARÃES et al., 2006).

Além disso, fungos estão ecologicamente envolvidos na degradação de uma variedade de materiais complexos, uma propriedade que é atribuída a uma variedade de enzimas produzidas por esses microrganismos (SOHAIL et al., 2009). A biotecnologia de enzimas de origem fúngica tem sido utilizada em indústrias há décadas (DALBOGE, 1997), todavia, há uma demanda cada vez maior para o isolamento e a seleção de novos isolados fúngicos. Estes

microrganismos têm sido extensivamente requeridos como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides (BRAGA; MORAIS; LINARDI, 1998) e, apesar de a tecnologia de DNA recombinante ter proporcionado alguns novos métodos para obter e desenvolver microrganismos de importância industrial, técnicas clássicas ainda estão em uso (KUZNETSOVA et al., 2005).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Ecocentro/EPAMIG, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

2.2 Obtenção dos microrganismos

Sessenta isolados fúngicos foram utilizados no estudo (Tabela 1), dos quais 16 foram obtidos da micoteca do Ecocentro/EPAMIG; 24, dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, foram obtidos no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do DCA da UFLA, sendo estes isolados recentes de uva e solo e, além desses, foram isolados fungos epifíticos de batata, inhame, batata doce e grãos de café. A descrição dos isolados e feita na Tabela 1.

Tabela 1 Relação de microrganismos utilizados para a avaliação do potencial enzimático

Código	Local	Espécie
EPAMIG/FA1	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus foetidus</i>
EPAMIG/FA2	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium verrucosum</i>
EPAMIG/FA3	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus clavatus</i>
EPAMIG/FA4	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
EPAMIG/FA5	Micoteca EPAMIG	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
EPAMIG/FA6	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium roqueforti</i>
EPAMIG/FA7	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus fumigatus</i>
EPAMIG/FA8	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium solitum</i>
EPAMIG/FA9	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium crustosum</i>
EPAMIG/FA10	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium brevicompactum</i>
EPAMIG/FA11	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium comune</i>
EPAMIG/FA12	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus versicolor</i>
EPAMIG/FA13	Micoteca EPAMIG	<i>Trichoderma</i> sp.
EPAMIG/FA14	Micoteca EPAMIG	<i>Aspergillus sulphureus</i>
EPAMIG/FA15	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
EPAMIG/FA16	Micoteca EPAMIG	<i>Penicillium pinoplulum</i>
UFLA/FN1	Batata-doce	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN2	Batata	<i>Fusarium</i> sp.
UFLA/FN3	Batata-doce	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN4	Batata-doce	<i>Fusarium</i> sp.
UFLA/FN5	Inhame	<i>Trichoderma</i> sp.
UFLA/FN6	Inhame	<i>Trichoderma</i> sp.
UFLA/FN7	Batata-doce	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN8	Batata	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN9	Inhame	<i>Penicillium</i> sp.

Tabela 1, continuação

Código	Local	Espécie
UFLA/FN10	Inhame	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN11	Café	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN12	Café	<i>Cladosporium</i> sp.
UFLA/FN13	Café	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/FN14	Café	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/FN15	Café	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/FN16	Café	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/FN17	Café	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/FN18	Batata-doce	<i>Fusarium</i> sp.
UFLA/FN19	Café	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/FN20	Café	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F1	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F2	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F3	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F4	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F5	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F6	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F7	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F8	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F9	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F10	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F11	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F12	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F13	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F14	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F15	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.

Tabela 1, conclusão

Código	Local	Espécie
UFLA/F16	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F17	Lab. Micologia DCA	<i>Penicillium</i> sp.
UFLA/F18	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F19	Lab. Micologia DCA	<i>Trichoderma</i> sp.
UFLA/F20	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F21	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F22	Lab. Micologia DCA	<i>Aspergillus</i> sp.
UFLA/F23	Lab. Micologia DCA	<i>Botrytis cinerea</i>
UFLA/F24	Lab. Micologia DCA	<i>Rhizopus</i> sp.

2.3 Determinação do potencial enzimático: método qualitativo

Para a determinação do potencial enzimático dos fungos analisados, utilizou-se o método qualitativo que consiste em cultivar os fungos em meios específicos para a produção de cada enzima e avaliar o halo produzido.

Para a produção das enzimas, os fungos foram previamente cultivados em meio de cultura MA 2% (extrato de malte 2%, ágar 2% e 1 L de água destilada), por sete dias. Após o crescimento, com o auxílio de um palito estéril, os fungos foram repicados para o centro das placas com os meios específicos para cada enzima. Foram feitas três repetições (por enzima) e as placas foram incubadas, de três a cinco dias, a 25 °C, em câmara de germinação tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas, antes da revelação, de acordo com o crescimento do fungo.

Na determinação da produção das amilases foram utilizadas as metodologias de Dingle, Teid e Solomons (1953) e Pereira (2009). Para celulasas e proteases, foi seguida a metodologia proposta por Dingle, Teid e

Solomons (1953) e, para pectinases, as metodologias de Hankin, Zucker e Sands (1971) e Pereira (2009).

2.3.1 Teste enzimático para amilases: Dingle, Teid e Solomons (1953)

O meio de cultura para determinar a atividade de amilases foi ágar-amido, composto por

Ágar.....	1,8%
Amido.....	1,0%
Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0.....	0,5 L

O amido e o ágar foram dissolvidos em 0,5 L de tampão citrato-fosfato e homogeneizados. Após esse procedimento, o meio de cultura foi acondicionado em recipientes de vidro e esterilizado, em autoclave, a 120 °C, durante 15 minutos.

Como revelador da reação, foi aplicada, sobre as placas, uma solução de iodo 0,1M, por 10 minutos. Para este experimento, os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo translúcido ao redor do inóculo.

2.3.2 Teste enzimático para amilase (Pereira, 2009)

No segundo método para a determinação da atividade amilolítica, utilizou-se meio mínimo (MM) com a substituição de glicose por amido, sendo

Ágar.....	15 g
Amido.....	10 g

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl.....	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Água destilada.....	1 L

Os reagentes foram homogeneizados e o pH do meio foi aferido a 6,8. Após isto, o meio foi acondicionado em frascos de vidro e esterilizado em autoclave, a 120 °C, durante 15 minutos.

Para a revelação, foi utilizada solução de lugol sobre as placas, por 10 minutos. A atividade amilolítica positiva foi detectada pela formação de um halo claro ao redor do fungo.

2.3.3 Teste enzimático para celulasas (Dingle, Teid e Solomons, 1953)

Para a determinação da atividade de celulasas, utilizou-se ágar-carboximetilcelulose (CMC), preparado com

Ágar.....	1,8%
CMC.....	1,0
Tampão Acetato de sódio 0,1 M pH 5,0.....	0,5L

A carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), em agitador magnético. Após a dissolução do CMC, foi adicionado o restante do tampão (600 mL) e, em seguida, o ágar. O

meio de cultura foi homogeneizado e, posteriormente, esterilizado, a 120 °C, durante 15 minutos.

Para a verificação da atividade celulolítica, utilizou-se o lugol como solução reveladora. Os resultados das reações enzimáticas foram identificados pela formação de um halo claro após a adição da solução reveladora.

2.3.4 Teste enzimático para proteases

O meio para a avaliação da atividade proteolítica dos microrganismos consistiu de

Ágar.....	1,8%
Gelatina.....	1,0%
Leite desnatado.....	1,0%
Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0.....	400 mL

O ágar foi adicionado em 400 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0), homogeneizado com bastão de vidro e esterilizado, a 120 °C, durante 15 minutos.

Solução de gelatina a 10%: foram adicionados 5 g de gelatina em 50 mL de solução tampão citrato-fosfato, deixando em repouso durante 3 minutos e, em seguida, homogeneizando-se. A solução foi aquecida em banho-maria para a dissolução completa da gelatina e, posteriormente, esterilizada, a 120 °C, durante 15 minutos.

Solução de leite desnatado a 10%: foram dissolvidos 5 g de leite desnatado em 50 mL de água destilada. A solução foi esterilizada sob vapor fluente (autoclave com válvulas abertas), durante 30 minutos, por dois dias consecutivos.

Para a obtenção do ágar-gelatina-leite, as soluções esterilizadas de ágar, leite e gelatina foram misturadas com cuidado asséptico, obtendo-se um volume final de 0,5 L.

A reação enzimática para protease foi detectada pela modificação química no meio de cultura sólido, em que a reação positiva foi visualizada com a formação de um halo translúcido ou esbranquiçado, não sendo necessária a adição de solução reveladora na superfície do ágar.

2.3.5 Teste enzimático para pectinases (Hankin, Zucker e Sands, 1971)

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado o meio contendo

Ágar.....	15 g
Pectina cítrica.....	5 g
Extrato de levedura.....	1 g
Água destilada.....	0,5 L
Solução de sais.....	0,5 L

sendo que a solução de sais contém, por litro,

(NH ₄)SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
CaCl ₂	1 mg
H ₃ BO ₃	10 µg
MnSO ₄	10 µg
ZnSO ₄	70 µg

CuSO ₄	50 µg
MoO ₃	10 µg

O meio de cultura foi homogeneizado, o pH foi ajustado para 7,0 e, posteriormente, esterilizado a 120 °C, durante 15 minutos. Utilizou-se uma solução de bromide hexadeciltrimetilamônio 1% (cetrimida) como solução reveladora. Este reagente precipita pectina intacta no meio e zonas claras ao redor da colônia indicam a degradação da pectina.

2.3.6 Teste enzimático para pectinases (Pereira, 2009)

A atividade pectinolítica foi avaliada por meio de dois meios de cultura, sendo primeiramente utilizado meio mineral tamponado (MMT), composto por

Ágar.....	15 g
KH ₂ PO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	7 g
(NH ₄)SO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1 g
Pectina cítrica.....	3 g
Extrato de levedura.....	0,6 g
Água destilada.....	1 L

O meio foi homogeneizado e esterilizado, a 120 °C, por 15 minutos, em autoclave. Foram preparadas três réplicas por isolado, as quais permaneceram em estufa de germinação BOD, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante quatro dias. Em seguida, a partir de cada repetição, os fungos foram repicados para novas placas de Petri contendo o meio Mac Ilvaine, composto por

Ágar.....	15 g
Ácido cítrico.....	7,74 g
Na ₂ PO ₄	17,93 g
Pectina cítrica.....	2,5 g
Água destilada.....	1 L

O meio foi homogeneizado e o pH aferido a 6,0 e, posteriormente, esterilizado, a 120 °C, por 15 minutos. Os fungos repicados neste meio foram acondicionados em BOD, a 40 °C, por 24 horas e, decorrido este período, foi adicionado, como solução reveladora, o lugol. Após 10 minutos, o lugol foi descartado e a atividade foi visualizada, observando-se um halo claro ao redor da colônia.

2.4 Determinação do índice enzimático

A determinação enzimática foi expressa em índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (medidos com régua) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975), segundo a fórmula:

$$\text{IE} = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Dessa forma, os maiores IE representarão a maior atividade enzimática.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para a análise estatística foram utilizados somente os tratamentos que produziram algum halo. Dessa forma, para celulases utilizaram-se 15 tratamentos; para pectinases metodologia de Hankin, Zucker e Sands (1971), 13 tratamentos; metodologia de Pereira (2009), 32 tratamentos e, para proteases, utilizaram-se 13 tratamentos. Após a pré-seleção quanto à produção de enzimas, realizou-se o ranqueamento dos melhores isolados produtores utilizados nos testes anteriores de cada enzima, para a avaliação do potencial multienzimático, utilizando-se 19 tratamentos.

Todos os testes foram realizados com três repetições por isolado, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri, de acordo com o número de tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial enzimático

A composição dos complexos enzimáticos de origem microbiana varia de acordo com a espécie do microrganismo produtor e, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas com propriedades adequadas a cada processo é fundamental para a utilização industrial das mesmas (MARTINS, 2006). Bactérias, leveduras e, em especial, fungos filamentosos são de grande interesse na produção de enzimas, em virtude das inúmeras vantagens apresentadas por estes microrganismos.

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos (CESKA, 1971; LIN; CHANG; SHEN, 1991). Para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, Lealem e Gashe (1994) estabeleceram um índice enzimático (IE) maior ou igual a 2,0.

Nesse contexto, quarenta isolados de fungos filamentosos de seis gêneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Rhizopus*) foram avaliados em condições laboratoriais como potenciais produtores de celulases, proteases, pectinases (metodologia de Hankin) e amilases (metodologia de Dingle). Destes, 15 produziram celulases, 13 produziram proteases, 13 produziram pectinases e não foram observados halos que comprovassem a produção de amilases, em condições laboratoriais. Além desses, mais 20 isolados foram acrescentados aos 40, para a detecção de pectinases e amilases por outra metodologia, em que 32 produziram pectinases e, novamente, não foram obtidos resultados positivos na detecção de amilases.

3.1.1 Amilases

Neste estudo foram testadas duas formulações diferentes para amilases, porém, ambas utilizaram amido solúvel (de duas marcas diferentes) como substrato para a produção das amilases, entretanto, em nenhuma das formulações foram observados halos de quaisquer tamanhos. Soares et al. (2010), analisando linhagens mutantes do fungo *Aspergillus nidulans*, observaram halos pequenos, menores que 2,0. Contudo, analisaram que as linhagens testadas, quando mantidas refrigeradas a 4 °C, durante 10 dias, continuaram retirando do meio de cultivo os nutrientes de que necessitavam, quebrando, então, o amido ainda disponível. Podem-se considerar, portanto, segundo os autores, as hipóteses de que a refrigeração pode melhorar a ação das amilases ou, então, proporcionar uma condição estressante para o fungo, de forma que ele degrada e consome mais compostos do que o normal. Os fungos analisados em ambas as formulações foram mantidos à temperatura de 25 °C, não representando condição de estresse para os mesmos. Assim, tal fato pode ter influência para a produção de amilases.

Das 34 espécies testadas por Gopinath, Anbu e Hilda (2005) para a produção de amilase, 22 não apresentaram nenhuma atividade enzimática, 9 apresentaram baixa atividade e 3 apresentaram atividade de moderada a alta. Silva et al. (2006) também não encontraram atividade amilolítica em nenhum dos 29 isolados analisados. Desse modo, estes trabalhos corroboram com os resultados já apresentados, indicando que a produção de amilases por fungos, em determinados meios de cultura sólidos, não é de ocorrência comum.

Além dos 40 isolados analisados na metodologia proposta por Dingle, Teid e Solomons (1953), foram realizados isolamentos de fungos presentes em batata-doce, inhame, batata comum e grãos de café, substratos ricos em amido (exceto café), a fim de obter fungos produtores de amilase, considerando-se o

fato destes fungos necessitarem de amilases para se estabelecer nesses substratos. Vinte fungos foram isolados e testados em outra metodologia de detecção de amilases, juntamente com os fungos anteriores, entretanto, novamente não foram observados halos característicos de produção de amilases.

Pandey et al. (2005) descrevem que espécies como *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *A. awamori*, são espécies produtoras de α -amilase, e *A. niger*, *A. fumigatus*, *A.saitri*, *A. terreus* e *A. foetidus* são espécies de fungos utilizadas para a produção de amiloglucosidase, assim como Soccol et al. (2005) destacam que a amiloglucosidase (glucoamilase), na maioria das vezes, é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Endomyces* sp. O gênero *Aspergillus* foi amplamente utilizado no presente estudo, entretanto, não foram produtores de amilases pelas metodologias testadas. Entretanto, diversos autores afirmam que a avaliação qualitativa da produção de enzimas, muitas vezes, não corresponde à produção real, sendo necessária a análise quantitativa para a avaliação correta.

3.1.2 Celulases

Sendo a celulose o polímero orgânico mais comumente encontrado no mundo e o componente mais importante da parede celular das plantas, prevê-se que enzimas celulolíticas sejam sintetizadas por diversas espécies de fungos (GOYAL; GHOSH; EVELEIGH, 1991; KLEMM et al., 2005). Em geral, fungos celulolíticos produzem um grande número de celulases e muitos as usam para degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal (DEHORITY, 1991). As enzimas celulolíticas de fungos têm sido estudadas devido ao seu potencial em biotecnologia, incluindo uso em alimentos e bebidas, detergente, indústria têxtil, polpa e papel. Sua função nutricional é evidente para a degradação da

fibra vegetal, servindo como fonte de carbono (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Celulases extracelulares, particularmente, são produzidas em níveis elevados por várias espécies de fungos, inclusive *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; SIQUEIRA et al., 2010).

Dos 40 microrganismos testados, 37,5% produziram celulases e os resultados encontram-se na Tabela 2. Destes, apenas o isolado EPAMIG/FA10, com 1,6, teve índice enzimático menor que 2,0. O isolado EPAMIG/FA14 obteve maior índice enzimático, 28,3.

Tabela 2 Produção de celulases por fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)

ISOLADO	GENÊRO	ORÍGEM	IE	MÉDIA
EPAMIG/FA14	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	28,3	a*
UFLA/FN19	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	14,3	b
UFLA/FN15	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	11,0	b c
EPAMIG/FA4	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	7,7	c d
EPAMIG/FA11	<i>Penicillium</i>	Micoteca	7,2	c d e
UFLA/FN9	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	5,7	c d e f
UFLA/FN20	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	5,3	d e f
EPAMIG/FA13	<i>Trichoderma</i>	Micoteca	4,3	d e f
UFLA/FN18	<i>Fusarium</i>	Lab. Micologia	3,7	d e f
UFLA/FN17	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	3,0	d e f
EPAMIG/FA8	<i>Penicillium</i>	Micoteca	2,5	d e f
EPAMIG/FA9	<i>Penicillium</i>	Micoteca	2,1	e f
EPAMIG/FA2	<i>Penicillium</i>	Micoteca	2,1	e f
EPAMIG/FA12	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	2,0	e f
EPAMIG/FA10	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,6	f

**CV (%) = 25,40

* Médias seguidas por letras iguais não se diferenciam estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

**CV = Coeficiente de variação: mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética; quanto menor, melhor a precisão dos dados

Na Figura 1, encontram-se ilustrados os resultados de testes positivos para celulasas, referentes a dois isolados estudados. A avaliação positiva pode ser observada pela formação de halos translúcidos ao redor da colônia, indicativos da degradação do substrato, no caso, a derivada da celulose, a carboximetilcelulose (CMC).

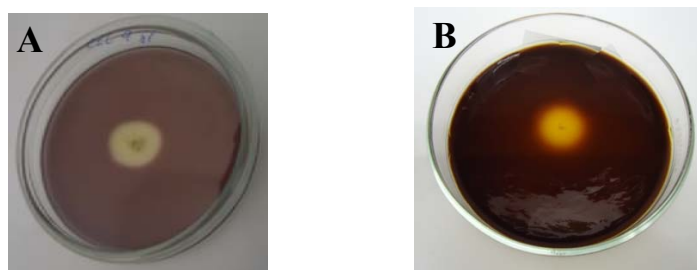


Figura 1 Teste qualitativo de produção de celulasas, após revelação com lugol. Microorganismos: EPAMIG/FA9 (A); EPAMIG/FA14 (B)

Herculano et al. (2011) encontraram 56 fungos produtores de celulasas, dos 189 obtidos de mamona (*Ricinus communis* L.), representando 30% dos isolados. Destes, 15 apresentaram IE maior que 2,0, entretanto, o maior índice enzimático foi 6,0. Fernandes (2009) testou 24 fungos isolados de diversas fontes para a detecção de celulasas, desses, 6 apresentaram IE > 2,0, no entanto, o maior valor observado foi 5,83. Valores próximos aos índices enzimáticos máximos encontrados nesses trabalhos foram encontrados por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), em fungos de solo, onde os valores máximos foram 5,0 e 6,0. Neste trabalho, os autores testaram 80 fungos como potenciais produtores de celulasas termoestáveis, sendo que, destes, 45% apresentaram IE \geq 2,0. Em um estudo com fungos encontrados na Antártica, Duncan et al. (2008) encontraram um isolado com índice enzimático para celulasas igual a 11,0, porém, dos 39 fungos avaliados 79% não tiveram IE superiores a 2,0.

Nesse contexto, de acordo com a literatura, é notório que grande parte das espécies testadas para produção de celulases, apresenta atividade enzimática, principalmente basidiomicetos (grande produtores) e espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, devido ao fato de terem, frequentemente, como hábitat, materiais lignocelulolíticos. Entretanto, poucos microrganismos apresentam grande atividade celulolítica como os avaliados neste estudo, em que 33% dos fungos avaliados apresentaram $IE > 7,0$.

A atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre na mesma condição em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos (FELLOWS, 1994). Todos os fungos avaliados nesse trabalho foram mantidos, durante o crescimento, nos meios para a produção das enzimas, na temperatura de 25 °C. Todavia, sabe-se que espécies do gênero *Aspergillus* têm sua temperatura ótima entre 30 °C e 40 °C e, desse modo, a produção enzimática nessas espécies pode ser mais elevada.

3.1.3 Proteases

Proteases são produzidas por vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários e fungos. As proteases de origem microbiana correspondem a 40% da venda total mundial de enzimas. Elas têm a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia e seu custo de produção é menor do que para enzimas de origem vegetal ou animal (SAID; PIETRO, 2002). Dentre as proteases produzidas por microrganismos, as bacterianas têm sido largamente utilizadas na indústria, entretanto, requerem custo intensivo na metodologia de filtração para obter a preparação enzimática livre do microrganismo. As proteases de origem fúngica oferecem a vantagem de o micélio ser facilmente removido por filtração (PHADATARE; DESHPANDE; SRINIVASAN, 1993).

Na Tabela 3 mostram-se os resultados encontrados para a produção de proteases. Dos 40 isolados analisados, 13 apresentaram halos indicativos de produção de enzimas proteolíticas. Contudo, apenas o isolado UFLA/FN16 apresentou IE = 2,0, não havendo valores maiores. Na Figura 2, estão ilustrados os testes efetuados para proteases.

Tabela 3 Produção de proteases por fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)

ISOLADO	GENÊRO	ORÍGEM	IE	MÉDIA
UFLA/FN16	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	2,0	a*
UFLA/FN4	<i>Fusarium</i>	Lab. Micologia	1,9	a b
UFLA/FN14	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	1,9	b c d
EPAMIG/FA12	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	1,8	b c d
EPAMIG/FA14	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	1,7	b c d
EPAMIG/FA3	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	1,7	b c d
EPAMIG/FA7	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	1,6	b c d
EPAMIG/FA9	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,6	b c d
EPAMIG/FA10	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,6	b c d
EPAMIG/FA15	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,5	b c d
EPAMIG/FA16	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,5	b c d
EPAMIG/FA5	<i>Cladosporium</i>	Micoteca	1,3	c d
EPAMIG/FA2	<i>Penicillium</i>	Micoteca	1,3	d

**CV (%) = 13,11

* Médias seguidas por letras iguais não se diferenciam, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação: mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética; quanto menor, melhor a precisão dos dados

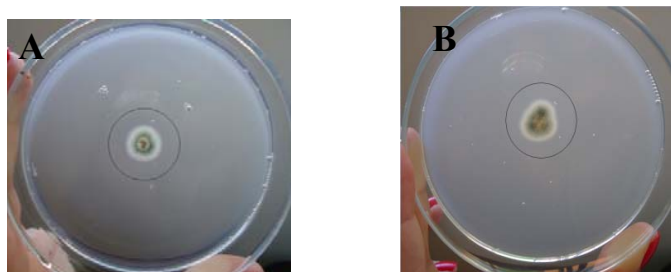


Figura 2 Teste qualitativo de produção de enzimas proteolíticas pelos microrganismos: UFLA/FN4 (A), UFLA/FN14 (B). O círculo indica a diferença de coloração entre o halo (pouco mais esbranquiçado) e o restante do meio

Sohail et al. (2009) obtiveram 81% de fungos produtores de proteases dos 160 fungos analisados, desses 14 isolados de *A. niger*, *A. flavus*, *Alternaria* sp. *Curvularia* sp. e *Trichoderma* sp. foram considerados pelos autores com potenciais produtores de enzimas proteolíticas. Bueno et al. (2009) avaliaram a produção de proteases por nove fungos da espécie *Fusarium solani* isolados de maracujazeiro-amarelo, tendo todos os microrganismos apresentado atividade enzimática entre 0,4 e 1,0.

Existem determinadas características envolvendo fungos, indicativas de patogenicidade. Entre elas pode ser mencionada a produção de enzimas, como urease, protease, fosfolipase e outras (HAGLER; AHEARN, 1987; LOUREIRO, 2002). Nesse âmbito, os fungos avaliados no presente estudo foram testados, em trabalhos anteriores, quanto à produção de micotoxinas (e, conseqüentemente, patogenicidade) e apenas os não produtores foram selecionados, o que pode justificar a baixa produção de proteases.

3.1.4 Pectinases

Na determinação da produção de pectinases foram utilizadas duas metodologias distintas e ambas obtiveram resultados diferentes para os fungos avaliados. A primeira metodologia testada foi proposta por Hankin, Zucker e Sands (1971) e avaliava semiquantitativamente a produção de duas enzimas específicas do complexo de enzimas pectinolíticas: a pectato liase (pH do meio igual a 5,0) e a poligalacturonase (pH do meio igual a 7,0). Entretanto, quando o pH era ajustado para 5,0, o meio não se solidificava corretamente e ficava semissólido, o que não permitia a adição da solução reveladora e posterior medição. Dessa forma, os resultados apresentados para essa metodologia (Tabela 4) referem-se à enzima poligalacturonase.

Tabela 4 Produção de pectinases (poligalacturonase) por fungos filamentosos (metodologia de Hankin), avaliados pelo índice enzimático (IE)

ISOLADO	GENÉRO	ORÍGEM	IE	MÉDIA
UFLA/FN12	<i>Cladosporium</i>	Lab. Micologia	1,8	a*
UFLA/FN20	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,6	a b
UFLA/FN11	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,6	a b
UFLA/FN13	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	1,6	a b
UFLA/FN1	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,5	a b
UFLA/FN15	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	1,4	a b
UFLA/FN16	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	1,4	a b
UFLA/FN3	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,4	a b
UFLA/FN14	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	1,3	a b
UFLA/FN18	<i>Fusarium</i>	Lab. Micologia	1,3	a b
UFLA/FN8	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,2	b
UFLA/FN7	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,2	b
UFLA/FN10	<i>Penicillium</i>	Lab. Micologia	1,2	b

**CV (%) = 13.04

* Médias seguidas por letras iguais não se diferenciam estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação: mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética; quanto menor, melhor a precisão dos dados

McKay (1988) desenvolveu uma metodologia para a detecção da produção de poligalacturonase com concentração de pectina cítrica, similar à metodologia descrita por Hankin, Zucker e Sands (1971), porém, utilizou uma solução de vermelho rutênio 0,05% como revelador. Bezerra et al. (2012) e Uenojo e Pastore (2006) utilizaram a metodologia de McKay (1988) para avaliação de pectinases em seus trabalhos. No entanto, assim como os resultados obtidos no presente estudo, ambos mostraram baixa ou nenhuma atividade de poligalacturonase.

Avaliando a segunda metodologia, assim como os resultados mostrados neste estudo (Tabela 5), Marchi, Borges e Mizubuti (2009) encontraram vários isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* bons produtores de pectinases.

Tabela 5 Produção de pectinases por fungos filamentosos (metodologia de Pereira), avaliados pelo índice enzimático (IE)

ISOLADO	GENÉRO	ORÍGEM	IE	MÉDIA
UFLA/F24	<i>Rhizopus</i>	Lab. Micologia	8,8	a*
EPAMIG/FA5	<i>Cladosporium</i>	Micoteca	7,1	a
EPAMIG/FA6	<i>Penicilium</i>	Micoteca	5,3	a b
UFLA/FN20	<i>Penicilium</i>	Café	5,22	a b
EPAMIG/FA16	<i>Penicilium</i>	Micoteca	4,9	a b
UFLA/FN16	<i>Aspergillus</i>	Café	4,8	a b
UFLA/F6	<i>Penicilium</i>	Lab. Micologia	4,7	a b
EPAMIG/FA15	<i>Penicilium</i>	Micoteca	4,5	a b
EPAMIG/FA3	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	4,5	a b
EPAMIG/FA8	<i>Penicilium</i>	Micoteca	4,5	a b
EPAMIG/FA9	<i>Penicilium</i>	Micoteca	4,4	a b
UFLA/FN12	<i>Cladosporium</i>	Café	4,4	a b
EPAMIG/FA7	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	3,7	a b
EPAMIG/FA12	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	3,6	a b
UFLA/F2	<i>Penicilium</i>	Lab. Micologia	3,6	a b
EPAMIG/FA10	<i>Penicilium</i>	Micoteca	3,6	a b
UFLA/FN9	<i>Penicilium</i>	Inhame	3,6	a b
UFLA/F12	<i>Aspergillus</i>	Lab. Micologia	3,4	a b
UFLA/FN17	<i>Aspergillus</i>	Café	3,2	a b
UFLA/FN10	<i>Penicilium</i>	Inhame	2,8	a b
UFLA/F19	<i>Trichoderma</i>	Lab. Micologia	2,4	a b

Tabela 5, conclusão

ISOLADO	GENÊRO	ORÍGEM	IE	MÉDIA
EPAMIG/FA11	<i>Penicilium</i>	Micoteca	2,3	a b
UFLA/F13	<i>Penicilium</i>	Lab. Micologia	2,3	a b
UFLA/FN6	<i>Trichoderma</i>	Inhame	2,2	b
EPAMIG/FA14	<i>Aspergillus</i>	Micoteca	2,1	b
UFLA/FN14	<i>Aspergillus</i>	Café	1,7	b
UFLA/FN3	<i>Penicilium</i>	Batata-doce	1,6	b
UFLA/FN15	<i>Aspergillus</i>	Café	1,6	b
UFLA/FN18	<i>Fusarium</i>	Batata-doce	1,6	b
UFLA/FN7	<i>Penicilium</i>	Batata-doce	1,6	b
UFLA/FN8	<i>Penicilium</i>	Batata	1,5	b

**CV(%) = 27,57

* Médias seguidas por letras iguais não se diferenciam estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação: mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética; quanto menor, melhor a precisão dos dados

A utilização de um microrganismo em um processo biotecnológico envolve, geralmente, a produção de algum composto de interesse. No entanto, as espécies que são encontradas na natureza, normalmente, não produzem grandes quantidades de metabólitos, somente o necessário para a sobrevivência e, para atingir esse objetivo, ou seja, a obtenção de enzimas de interesse, utiliza-se como recurso a otimização das condições fisiológicas e nutricionais do meio de cultivo em que o microrganismo cresce (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000). Desse modo, nessa metodologia, a utilização do meio mineral tamponado (MMT) suplementado com pectina cítrica antes do plaqueamento em meio específico contribuiu para o aumento da produção pectinolítica, quando comparado à metodologia anterior sem a indução prévia.

Além da baixa sensibilidade à detecção da enzima e baixos resultados obtidos pela metodologia de Hankin; quando comparados à segunda metodologia, a confecção do meio também foi mais laboriosa. Na Figura 3 estão ilustrados os resultados para ambas as metodologias:

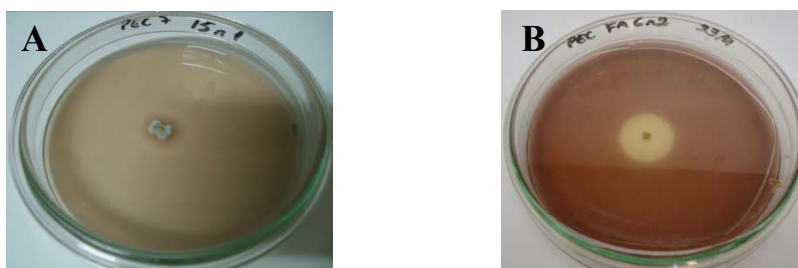


Figura 3 Teste qualitativo de produção de enzimas pectinolíticas pelos microrganismos UFLA/FN15 metodologia Hankin (A), EPAMIG/FA6 metodologia Pereira (B)

3.1.5 Potencial multienzimático de fungos

Com o avanço no conhecimento das enzimas, os fungos vêm adquirindo um status de destaque para vários tipos de indústrias uma vez que existe a possibilidade de utilizá-las para melhorar vários aspectos do produto final (SOARES et al., 2010). Além disso, microrganismos são particularmente mais vantajosos, pois apresentam um sistema multienzimático de fácil formação, que pode ser amplamente explorado em diversos processos, como a biocatálise e a biorremediação, nos quais são necessários complexos com diferentes enzimas para a degradação de resíduos e de outras substâncias (VIEIRA, 2006).

Com a finalidade de avaliar o melhor produtor de todas as enzimas testadas, foi feita uma comparação entre os resultados obtidos nas mesmas, em que os fungos encontrados estão representados na Tabela 6. Não foram observados isolados que produzissem todas as enzimas acima do índice enzimático, entretanto, os isolados EPAMIG/FA10, EPAMIG/FA12 e EPAMIG/FA14, das espécies *P. brevicompactum*, *A. versicolor*, *A. sulphureus*, respectivamente, produziram as três enzimas. Vários trabalhos na literatura citam os gêneros *Penicillium* e, principalmente, *Aspergillus* como bons produtores de enzimas, corroborando os dados apresentados no presente estudo.

Avaliando a produção de celulases e pectinases em separado, o isolado UFLA/FN20 obteve IE > 5,0, sendo considerado excelente produtor de ambas. Além deste, os isolados UFLA/FN9 e UFLA/FN17 apresentaram IE \geq 3,0, também considerados bons produtores.

Tabela 6 Avaliação do potencial multienzimático de fungos filamentosos, avaliados pelo índice enzimático (IE)

Isolado	Gênero	Celulases	Proteases	Pectinases
EPAMIG/FA5	<i>Cladosporium</i>	ND	1,3	7,1
UFLA/FN20	<i>Penicillium</i>	5,3	ND	5,2
UFLA/FN16	<i>Aspergillus</i>	ND	2,0	4,8
EPAMIG/FA16	<i>Penicillium</i>	ND	1,5	4,9
EPAMIG/FA15	<i>Penicillium</i>	ND	1,5	4,5
EPAMIG/FA3	<i>Aspergillus</i>	ND	1,7	4,5
EPAMIG/FA8	<i>Penicillium</i>	2,5	ND	4,5
EPAMIG/FA9	<i>Penicillium</i>	2,1	ND	4,4
EPAMIG/FA7	<i>Aspergillus</i>	ND	1,6	3,7
EPAMIG/FA12	<i>Aspergillus</i>	2,0	1,8	3,6
EPAMIG/FA10	<i>Penicillium</i>	1,6	1,6	3,6
UFLA/FN9	<i>Penicillium</i>	5,7	ND	3,6
UFLA/FN17	<i>Aspergillus</i>	3,0	ND	3,2
EPAMIG/FA11	<i>Penicillium</i>	7,2	ND	2,3
EPAMIG/FA14	<i>Aspergillus</i>	28,3	1,7	2,1
UFLA/FN14	<i>Aspergillus</i>	ND	1,9	1,7
UFLA/FN15	<i>Aspergillus</i>	11,0	ND	1,6
EPAMIG/FA2	<i>Penicillium</i>	2,1	1,3	ND
UFLA/FN18	<i>Fusarium</i>	3,7	ND	1,6

ND: Não houve produção

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos quanto à caracterização enzimática dos isolados concluiu-se que:

- a) nenhum dos isolados fúngicos testados secretou enzimas amilolíticas;
- b) a análise qualitativa das enzimas pectinases, proteases e celulasas revelou uma grande variação na produção pelos fungos testados;
- c) dos isolados fúngicos investigados para produção de celulasas, 14 apresentaram excelente atividade celulolítica;
- d) todos os isolados testados para produção multienzimática diferiram quanto à capacidade de produzir mais de uma enzima.

REFERÊNCIAS

- BEZERRA, J. D. P. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 1-7, Jan. 2012.
- BRAGA, A. A.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R. Screening of yeast from Brazilian Amazon Rain Forest for extracellular proteinases production. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, n. 3, p. 353-359, Mar. 1998.
- BUENO, C. J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.
- CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 22, p. 186-192, 1971.
- DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 29-42, Feb. 1997.
- DEHORITY, B. A. Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 50, n. 2, p. 149-159, 1991.
- DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 4, n. 8, p. 149-155, 1953.
- DUNCAN, S. M. et al. Screening fungi isolated from historic *Discovery* Hut on Ross Island, Antarctica for cellulose degradation. **Antarctic Science**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 463-470, Feb. 2008.
- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios e prácticas**. Zaragoza: Acribia, 1994. 549 p.
- FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 119-126, June 2005.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 36, n. 1, p. 37-50, Mar. 1991.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, Oct./Dec. 2006.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. **Aquatic yeasts**. 2nd ed. London: Academic, 1987. 236 p.

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

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 205-209, 1971.

HERCULANO, P. N. et al. Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 5, p. 1416-1422, May 2011.

KLEMM, D. et al. Cellulose, chemistry and application. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 44, n. 12, p. 3358-3393, May 2005.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 7, p. 377-391, July 2008.

KUZNETSOVA, E. M. et al. Enzyme genomics: application of general enzymatic screens to discover new enzymes. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 29, n. 2, p. 263-279, Apr. 2005.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v. 77, n. 3, p. 348-352, Sept. 1994.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechniques**, Natick, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.

LOUREIRO, S. T. A. **Caracterização de leveduras isoladas das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda, Pernambuco quanto a fatores de patogenicidade**. 2002. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Olinda, 2002.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

PANDEY, A. et al. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2005. 742 p.

PAREKH, S.; VINCI, V. A.; STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, n. 3, p. 287-301, Sept. 2000.

MCKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 355-358, Dec. 1988.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86. 8. 20). **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 15, n. 1, p. 72-76, Apr. 1993.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, mar./abr. 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121 p.

SILVA, R. L. de O. et al. Endophytic fungi of *Annona* spp.: isolation, enzymatic characterization of isolates and plant growth promotion in *Annona squamosa* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SIQUEIRA, F. G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 64, n. 1, p. 20-26, Feb. 2010.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, maio/jun. 2010.

SOCCOL, C. R. et al. Glucoamylase. In: _____. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatec, 2005. p. 221-230.

SOHAIL, M. et al. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. **Pakistan Journal Botany**, Lahore, v. 41, n. 5, p. 2567-2582, Oct. 2009.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 116-124, dez. 2008. Suplemento.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 509-515, jul./set. 2006.

VIEIRA, M. G. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXO β -1,4 GLUCANASE E ENDO β -1,4 GLUCANASE POR *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer

RESUMO

Atualmente, a seleção de novos microrganismos produtores enzimáticos é, talvez, o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, pode levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos. Dessa forma, em processos fermentativos, em que cada variável pode interagir e influenciar o efeito de outras variáveis é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais. Desse modo, com este estudo buscou-se avaliar a melhor produção quantitativa das enzimas exo β -1,4 glucanase e endo β -1,4 glucanase em fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus sulphureus* (EPAMIG/FA14) em diferentes condições de temperatura, concentrações de substrato e pH. Para tal, primeiramente, foi avaliada a produção de micotoxinas pelo método do meio de cultivo CAM (LIN; DIANESE, 1976) e o crescimento de *A. sulphureus* em fermentação submersa e, posteriormente, procedeu-se à quantificação das enzimas nas concentrações de substrato 0,5; 1,0 e 1,5; temperaturas 30 °C, 35 °C e 40 °C e pH 6,0; 7,0; 8,0, em condições laboratoriais. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância e plotados em gráficos de superfície de resposta e contorno. No teste para a produção de micotoxinas, *A. sulphureus* obteve resultado negativo, sendo este confirmado como não produtor de ocratoxina A. A forma de crescimento mais comumente encontrada foi a peletizada, entretanto, foi observado um crescimento diferenciado em alguns frascos das incubações a 40 °C, nos quais o fungo produzia um micélio semelhante ao das membranas. A avaliação ótima da produção da exo β -1,4 glucanase foi feita a partir dos três fatores analisados. Estes, segundo a análise de variância, obtiveram interação tripla significativa, havendo então, dependência entre os fatores. Entre as variáveis testadas, a condição ótima de cultivo para *A. sulphureus*, para maior produção da exo β -1,4 glucanase foi pH = 8, temperatura = 40 °C e concentração de substrato = 1,5%. Para endoglucanases, verificou-se que a condição ótima de cultivo para a produção foi encontrada entre 30 e 35 °C, pH entre 6,0 e 7,0 e 1,5% de CMC. *A. sulphureus* se mostrou um promissor produtor de endo e exoglucanases, podendo ser futuramente utilizado em indústrias e afins.

Palavras-chave: Endo β - 1,4 glucanase. Exo β - 1,4 glucanase. Fermentação submersa. Cultivo.

ABSTRACT

Currently, the selection of new enzyme-producing microorganisms is, perhaps, the greatest hindrance in the commercialization of new enzymes. Nevertheless, the optimization of the cultivation conditions allied to the choice of appropriate microorganism strains, can lead to a better enzyme production, in addition to reducing the costs. In that way, in fermentative processes, in which each variable can interact and influence the effect of other variables, it is essential to utilize an optimization method that allows us to detect the possible interactions so that an optimum point would be chosen under the experimental conditions. Thus, with this study, it was sought to evaluate the best quantitative production of both the enzymes exo β -1.4 glucanase and endo β -1.4 glucanase in submerge fermentation by the fungus *Aspergillus sulphureus* (EPAMIG/FA14) under different conditions of temperature, concentrations of substrate and pH. For such purpose, first of all, the mycotoxin production was evaluated by the cultivation medium method CAM (LIN; DIANESE, 1976) and the growth of *A. sulphureus* under submerge fermentation and afterwards, the quantification of the enzymes at the concentrations of substrate 0.5; 1.0 and 15; temperatures 30 °C, 35 °C and 40 °C and pH 6.0; 7.0; 8.0 under laboratory conditions were conducted. The data obtained were surveyed statistically by analysis of variance and plotted on response and contour surface plots. In the test for mycotoxin production, *A. sulphureus* obtained negative result, this being confirmed as a non-producer of ochratoxin A. The most commonly found form was the pelleted one, however, a distinct growth was found in some flasks of the incubations at 40 °C, in which the fungus produced a mycelium similar to that of the membranes. The optimum evaluation of the production of exo β -1.4 glucanase was done from the three factors surveyed. These, according to the analysis of variance, obtained significant triple interaction, there being then, dependence among the factors. Among the variables tested, the optimum cultivation condition for *A. sulphureus* for increased production of exo β -1.4 glucanase was pH = 8, temperature = 40 °C and substrate concentration = 1.5%. For endoglucanases, it was found that the optimum cultivation condition for the production was found between 30 and 35 °C, pH between 6.0 and 7.0 and 1.5% of CMC. *Sulphureus* proved a promising producer of both endo-and-exoglucanases, its being able to be used in industries and alike, in the future.

Keywords: Endo β - 1.4 glucanase. Exo β -1.4glucanase. Submerge fermentation.Cultivation.

1 INTRODUÇÃO

A celulose tem atraído a atenção mundial como um recurso renovável que pode ser convertido com base biológica em produtos e energia (XING-HUA et al., 2009). Entretanto, atualmente, principalmente no Brasil, enormes quantidades de resíduos celulolíticos agrícolas, industriais e municipais são descartadas ou utilizadas de forma ineficiente, devido ao alto custo dos processos de sua utilização. Portanto, tornou-se considerável e de interesse econômico desenvolver processos de aproveitamento e tratamento de resíduos celulósicos.

Celulose é utilizada como fonte energética por grande parte dos organismos, incluindo invertebrados, protistas, fungos e bactérias. Estes possuem celulasas em seus sistemas enzimáticos, de três diferentes tipos: endo β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.4), exo β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.91) e β glicosidades (EC 3.2.1.21) (WILSON; IRWIN, 1999). Esses componentes enzimáticos agem, sequencialmente, em um sistema sinérgico para facilitar a decomposição e a subsequente conversão biológica da celulose em uma fonte de energia utilizável aos organismos, a glicose (CAO; TAN, 2002).

A capacidade para secretar grandes quantidades de proteína extracelular é característica de certas linhagens de fungos e estes são os mais adequados para a produção de níveis mais elevados de celulasas extracelulares. Um dos fungos mais estudados é *Trichoderma reesei*, que converte celulose nativa, assim como derivados da mesma, em glicose. Os organismos celulolíticos mais comumente estudados incluem espécies fúngicas de *Trichoderma*, *Hemicola*, *Penicillium*, *Aspergillus* e as bactérias *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Actinomicetes-Streptomyces*, *Actinomucor* e *Streptomyces*.

Atualmente, a seleção de novos microrganismos produtores enzimáticos é, talvez, o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a

otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, pode levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos (CARVALHO, 2007). Dessa forma, em processos fermentativos, em que cada variável pode interagir e influenciar o efeito de outras variáveis, é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais (OLIVEIRA, 2010).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 O microrganismo

A escolha do microrganismo foi feita com base nos testes de atividade celulolítica anteriores, em que o isolado EPAMIG/FA14 da espécie *Aspegillus sulphureus* obtido da micoteca do Ecocentro /EPAMIG foi o melhor produtor de celulases, qualitativamente.

2.2 Teste de produção de micotoxinas por *A. sulphureus*

Para a determinação da produção de micotoxinas pelo fungo *A. sulphureus* foi utilizado o meio de cultura à base de leite de coco, o CAM (LIN; DIANESE, 1976) (200 mL de leite de coco comercial, 600 mL de água destilada, 16 g de ágar). O fungo foi inoculado no centro da placa de Petri contendo o meio especificado e acondicionado em estufa do tipo BOD, por cinco dias, com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C. Após este período, foi verificada, em cromatovisor, a presença/ausência de um halo fluorescente ao redor da colônia, característico de produtores de micotoxinas. O teste foi realizado em triplicata.

2.3 Otimização da produção de celulases pelo fungo *A. sulphureus*

Para a determinação da produção ótima de celulases por *A. sulphureus* foram avaliadas três variáveis que influenciam a produção de celulases: concentração de substrato, pH e temperatura de cultivo. A seleção destas variáveis foi realizada com base em dados já descritos na literatura (ALAM;

MUYIBI; WAHID, 2008; SALES et al., 2010; VITTI, 1988) e, desse modo, os ensaios foram distribuídos como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Desenho experimental para a produção de enzimas celulolíticas

Ensaio	Concentração de substrato (% p/v)	pH	Temperatura (°C)
1	0,5	6,0	30
2	0,5	7,0	30
3	0,5	8,0	30
4	0,5	6,0	35
5	0,5	7,0	35
6	0,5	8,0	35
7	0,5	6,0	40
8	0,5	7,0	40
9	0,5	8,0	40
10	1,0	6,0	30
11	1,0	7,0	30
12	1,0	8,0	30
13	1,0	6,0	35
14	1,0	7,0	35
15	1,0	8,0	35
16	1,0	6,0	40
17	1,0	7,0	40
18	1,0	8,0	40
19	1,5	6,0	30
20	1,5	7,0	30
21	1,5	8,0	30
22	1,5	6,0	35
23	1,5	7,0	35
24	1,5	8,0	35
25	1,5	6,0	40
26	1,5	7,0	40
27	1,5	8,0	40

2.3.1 Atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

Uma suspensão de esporos de *A. sulphureus* a 10^6 esporos por mL foi inoculada em frascos (tipo Gatorade®) contendo 50 mL de meio M₃M líquido modificado (sacarose; KH₂PO₄ 0,2%; MgSO₄.7 H₂O 0,1%; peptona 0,6%; extrato de levedura 0,6%), substituindo-se a sacarose pelo indutor Avicel® (celulose microcristalina) (SILVA, 2004), nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5%. O pH foi aferido a 6,0; 7,0 e 8,0 unidades e os frascos ficaram sob agitação, a 90 rpm, em estufa incubadora refrigerada tipo Shaker, durante cinco dias, nas temperaturas 30 °C, 35 °C e 40 °C, como mostrado na Tabela 1.

Após o crescimento do fungo, os meios de cultivo foram filtrados em um sistema de filtração contendo membrana estéril de celulose Millipore® (45 μ m, 47 mm), com auxílio de uma bomba a vácuo, os quais foram considerados como fonte enzimática (extrato bruto). Posteriormente, as amostras foram congeladas para posterior dosagem da atividade enzimática.

A atividade de exo glucanase foi mensurada por método espectrofotométrico indireto, utilizando hidrazida do ácido ρ -hidroxibenzoico 1% (PAHBAH) para a dosagem de glicose liberada pela ação da enzima (LEVER, 1972). Para a reação, foram utilizados 100 μ L da fonte enzimática e 900 μ L de Avicel® 1%, em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) como substrato. Após trinta minutos de incubação a 50 °C, a reação foi paralisada com a adição de 3,0 mL de hidrazida do ácido ρ -hidroxibenzoico 1% (PAHBAH). Em seguida, a mistura foi aquecida, a 100 °C, por 5 minutos e, logo depois, resfriada em gelo e água.

A medição da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (3,0 mL de PAHBAH mais 1,0 mL de tampão acetato de sódio 0,05M). Para cada amostra, foram realizadas três repetições. As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados plotados

em curva padrão de glicose, representando a produção em atividade específica (μg glicose/min/mg proteína).

2.3.2 Atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Para a determinação da atividade de endo β -1,4 glucanase foi realizado o cultivo dos isolados, como descrito no item anterior, tendo como indutor carboximetilcelulose (CMC).

Para a reação, foram utilizados 100 μL da fonte enzimática e 900 μL de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) como substrato. A mistura foi incubada, a 50 °C, por 30 minutos e a reação foi paralisada com a adição de 3 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroximenzoico 1% (PAHBAH). Em seguida, a mistura foi aquecida, a 100 °C, por 5 minutos e, logo após, esfriada em gelo e água.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra o branco (3 mL de PAHBAH + 1 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M). As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados plotados em curva padrão de glicose, representando a produção em atividade específica, μg glicose/min/mg proteína.

2.3.3 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas foi obtida segundo o método de Bradford (1976), que consistiu em reação com 2400 μL de amostra e 600 μL de reagente de Bradford concentrado, aquecido sob agitação. Após 5 minutos, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro, a 595 nm. O aparelho foram calibrados em 2.400 μL do meio M₃M em 600 μL do reagente concentrado de Bradford. A

concentração de proteínas foi expressa em μg de proteína/2400 μL e obtida pela plotagem em curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que, para cada enzima, utilizou-se esquema fatorial $3 \times 3 \times 3$, resultando em 27 tratamentos descritos na Tabela 1. Cada tratamento foi feito em três repetições e, posteriormente, na leitura dos tubos, para cada repetição, foram feitas mais três repetições, totalizando nove. Para análise dos dados, utilizaram-se três repetições obtidas a partir das médias dos nove tubos analisados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008) e utilizou-se o software SigmaPlot v.11 para plotar os gráficos superfície de resposta e contorno.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da produção de micotoxinas

Das sete ocratoxinas existentes, a ocratoxina A (OTA) é o composto mais tóxico deste grupo. É, principalmente, produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, embora também a produzam *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. ostianus*, *P. verrucosum* e, também, *A. sulphureus*, entre outros (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Entretanto, apesar de a espécie *A. sulphureus* produzir ocratoxina A usualmente, nem todos isolados são produtores (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002). Nasser, Chalfoun e Batista (2001) avaliaram 34 isolados de *A. sulphureus* como produtores de ocratoxinas e apenas 35% dos isolados apresentaram características de fungos produtores.

Dessa forma, o fungo *A. sulphureus* utilizado nesse estudo para a produção de celulases foi confirmado quanto ao potencial de produção de micotoxinas e obteve resultado negativo para tal, pelo método do meio de cultivo CAM, como mostrado na Figura 1.

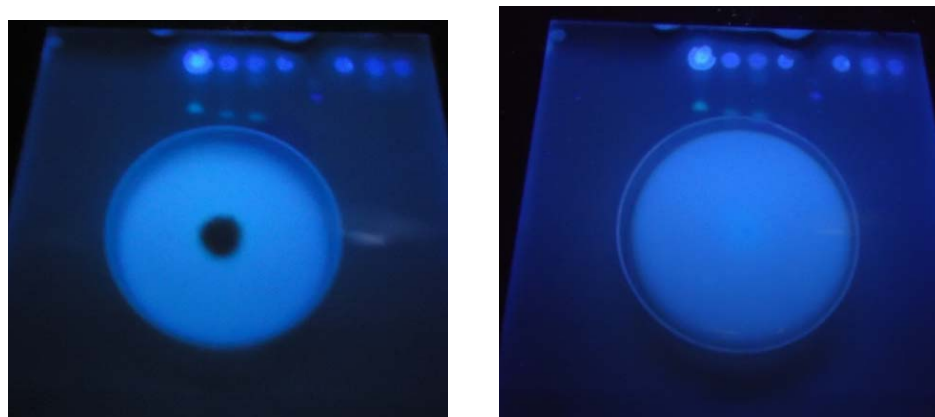


Figura 1 Teste de produção de micotoxinas por *A. sulphureus*

3.2 Produção das enzimas celulolíticas

Vários grupos de microrganismos conhecidos como lignocelulolíticos apresentam seus sistemas enzimáticos bem caracterizados e alguns deles, inclusive, estão sendo utilizados em escala industrial. Entretanto, pesquisas em todo o mundo têm demonstrado que atividades de novos isolados têm sido semelhantes ou superiores à das estirpes tradicionais (BRAVO et al., 2000).

A natureza representa uma fonte interminável de microrganismos celulolíticos e países tropicais, como o Brasil, apresentam uma flora microbiana muito diversificada que, certamente, abriga espécies de microrganismos desconhecidos, de interesse industrial. Neste contexto, a exploração de novas estirpes isoladas é muito importante para fornecer microrganismos com propriedades que correspondem às condições existentes no ambiente industrial (SILVA et al., 2005).

Enzimas e outros produtos comercialmente importantes produzidos por fungos filamentosos em fermentação submersa têm sido amplamente estudados. Entretanto, recentemente, estudos em fermentação estado sólido (SSF) aumentaram significativamente. A escolha do tipo de fermentação depende da adaptação fisiológica do organismo. Geralmente, no cultivo submerso, a forma de crescimento de fungos filamentosos varia entre peletizada e filamentosa; cada forma tem suas características próprias, que podem afetar a taxa de produção da enzima por influenciar a taxa de transferência de massa (MITCHELL; LONSANE, 1992), enquanto, em fermentação submersa (SmF), o fungo é exposto a forças hidrodinâmicas, em SSF, o crescimento restringe-se à superfície da matriz sólida (SILVA et al., 2005).

Neste âmbito, a forma de crescimento mais comumente encontrada para o fungo *A. sulphureus* utilizado nesse estudo foi a peletizada. Entretanto, foi observado um crescimento diferenciado em alguns frascos das incubações a 40

°C, em que o fungo produzia um micélio semelhante a membranas. A filtração a partir desses frascos era dificultada.

3.3 Produção ótima de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

A avaliação das condições ótimas para a produção da exo β -1,4 glucanase foi feita a partir dos três fatores analisados (pH, concentração de substrato e temperatura). Estes, segundo a análise de variância (Tabela 2 anexo), apresentaram interação tripla significativa, havendo, então, dependência entre os fatores de produção da enzima. Sales et al. (2010), avaliando a produção de exoglucanases em *A. aculeatus*, também verificaram significância para estas mesmas variáveis. Assim, a fim de identificar a melhor condição de cultivo para a produção desta enzima, foram plotados gráficos de superfície de resposta.

Pode-se observar, na Figura 2A, que as concentrações de substrato na faixa estudada, entre 0,5% e 1,5% apresentaram efeitos diferentes em interação com a faixa de pH avaliada. O ótimo de atividade foi atingido quando foi utilizada a concentração 1,5% e pH igual a 8,0, obtendo 44,47 μ g glicose/min/mg proteína. Observa-se também (Gráfico 1B) uma progressão positiva da atividade à medida que pH e concentração de substrato (em conjunto) aumentam.

Silva (2004) avaliou a concentração de 1% de Avicel® para a produção da exo β -1,4 glucanase em diversos fungos, entretanto, apenas dois obtiveram alta atividade, *A. flavus* e *A. dimorphicus*, apresentando 142,0 e 145,5 μ g glicose/min/mg proteína, respectivamente. Contudo, esses valores foram encontrados no décimo quinto dia de incubação, sugerindo que a produção de esta enzima por *A. sulphureus* pode ser aumentada com maiores períodos de incubação, necessitando ser mais bem investigado em estudos futuros. O autor também verificou que, durante o cultivo, o pH médio foi igual a 8,0, no entanto,

o pH inicial foi 5,0, inferindo-se que, assim como no presente estudo, o pH = 8,0, foi o melhor para a produção da exo β -1,4 glucanase.

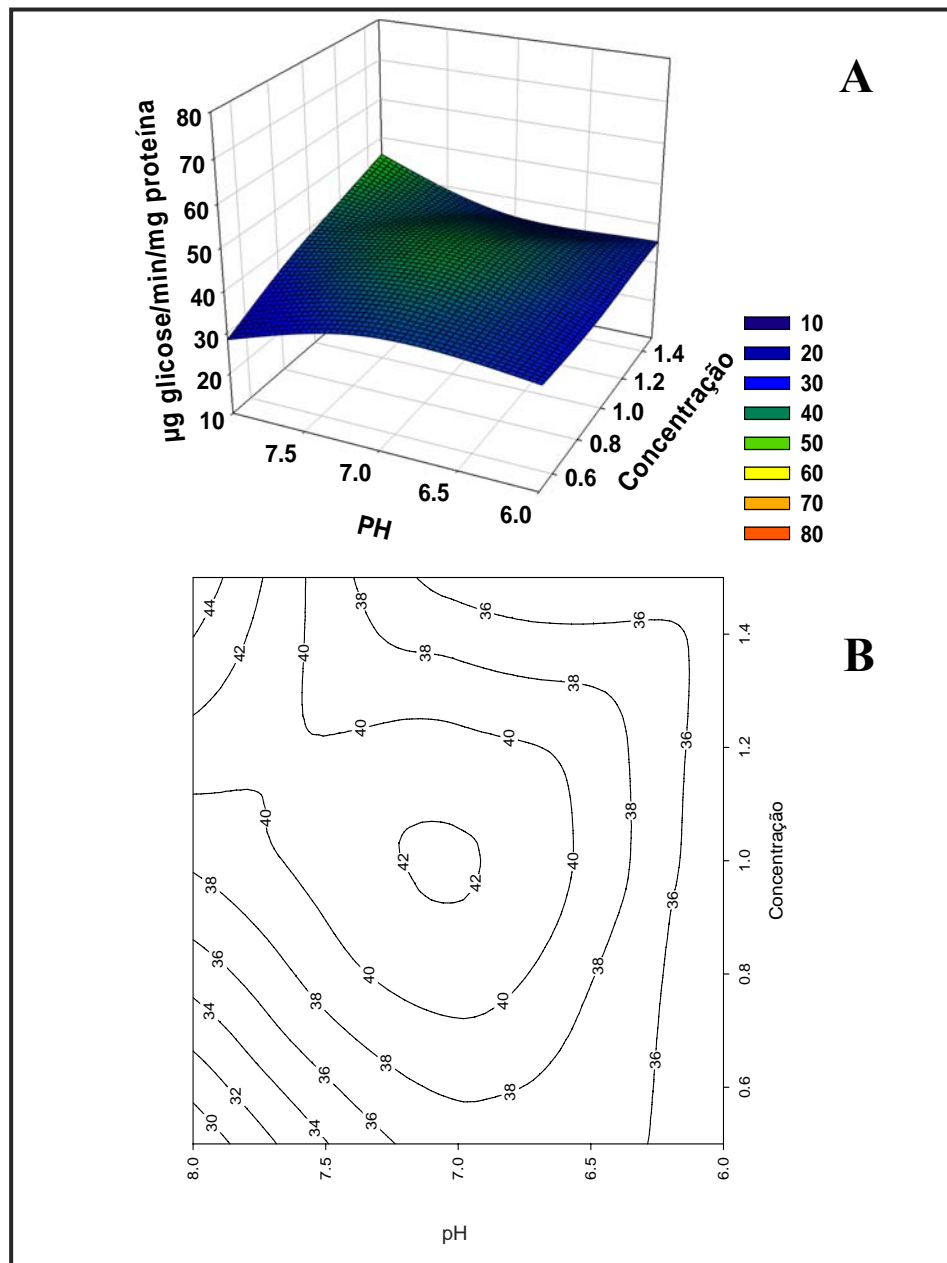


Gráfico 1 Avaliação da atividade específica da exo β -1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*. Interação pH e concentração de substrato; A: gráfico superfície de resposta; B: gráfico de contorno

A maior atividade enzimática na interação concentração de substrato e temperatura ocorreu na concentração 1,5%, a 40 °C, obtendo-se 72,45 µg glicose/min/mg proteína (Gráfico 2A). Sales et al. (2010) apresentaram resultados semelhantes, nos quais as duas variáveis tiveram efeito positivo, ou seja, nesta interação, os valores de 1,5% de substrato e temperatura de 40 °C apresentaram a maior atividade enzimática; somente o pH teve efeito diferente do observado no presente estudo, apresentando melhor atividade em pH = 6,0.

No Gráfico 2B mostra-se que atividade enzimática foi menor a 35 °C, quando comparada a 30 °C e a 40 °C. Isso pode ser justificado considerando-se o fato de esta temperatura ser próxima à temperatura ótima de crescimento de *A. sulphureus*, em torno de 33 °C a 37 °C (CHALFOUN; BATISTA, 2003; LU; YUBO WU, 2003). Soares et al. (2010), assim como diversos autores, sugerem que a produção enzimática em microrganismos pode ocorrer, em maior escala, quando estes estão em condições diferentes das ideais.

Ghori et al. (2011) avaliaram o efeito da temperatura em SSF sobre a atividade da exo β-1,4 glucanase no isolado *A. niger* NRRL e observaram a maior atividade da enzima a 30 °C. Temperaturas superiores, diferentemente do presente estudo, diminuíram a atividade da enzima.

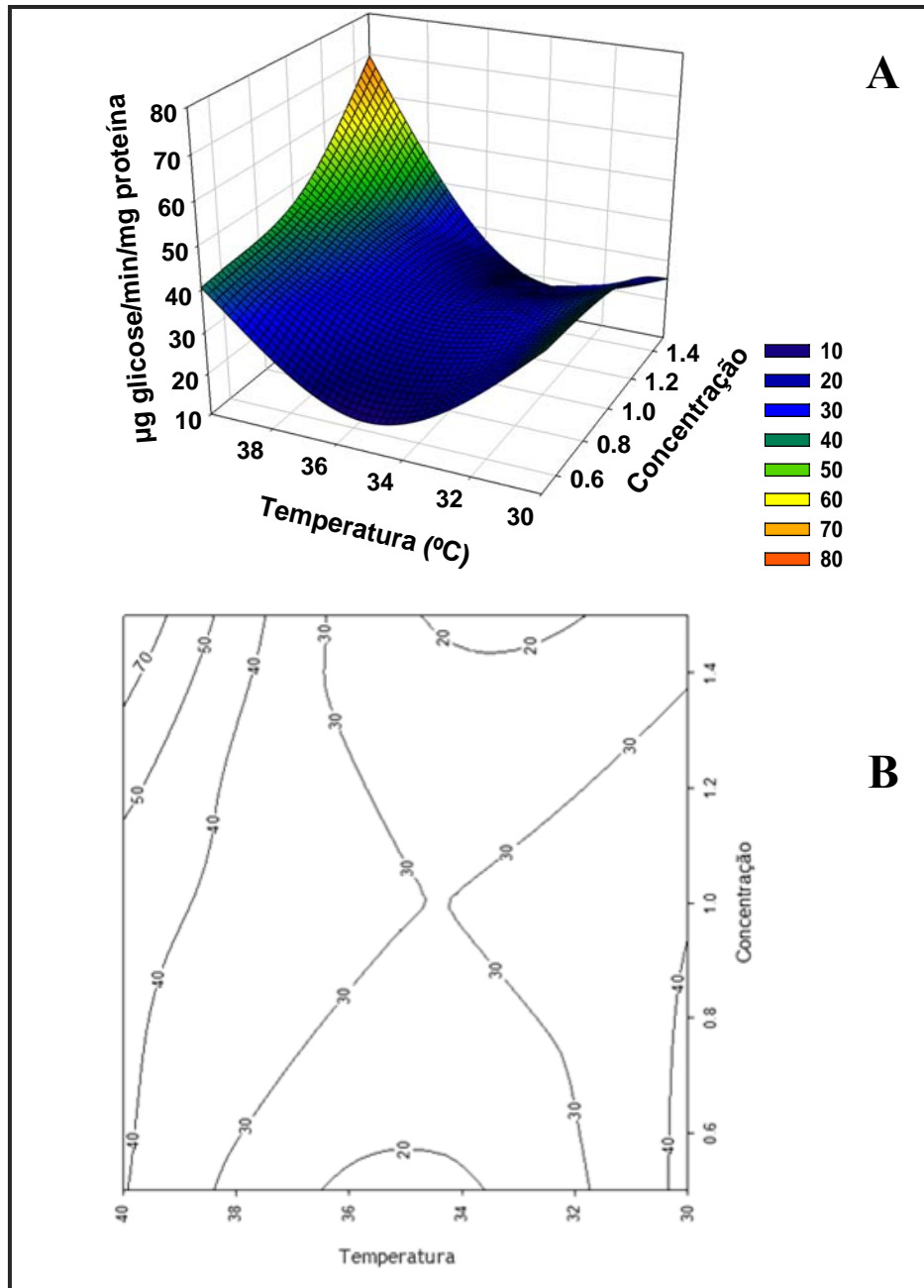


Gráfico 2 Avaliação da atividade específica de exo β -1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*. Interação temperatura e concentração de substrato; A: gráfico superfície de resposta; B: gráfico de contorno

A temperatura do meio de fermentação para a produção de enzimas é um dos os fatores mais críticos e tem grande influência sobre o produto final (GHORI et al., 2011). Assim como a temperatura, o valor do pH pode ser considerado a pedra angular do processo de produção de enzimas, sendo as celulasas muito influenciadas por diferentes valores de pH.

Com relação à interação pH e temperatura, o maior valor da atividade (55,0 μg glicose/min/mg proteína) foi encontrado novamente na temperatura de 40 °C e pH igual a 8 (Gráfico 3). Desse modo, é possível inferir que, entre as variáveis testadas, a condição ótima de cultivo para *A. sulphureus*, para maior produção da exo β -1,4 glucanase, foi pH 8, temperatura de 40 °C e concentração de substrato de 1,5%. Entretanto, as três variáveis encontradas como condição melhor de produção são os limites superiores da análise. Tal fato demonstra a necessidade de novos estudos com valores superiores de pH, temperatura e concentração de substrato, visando verificar se a produção aumentaria com o aumento de algum desses fatores.

Vale ressaltar que a maior produção da exo β -1,4 glucanase nessas condições pode ser também explicada, pelo fato de esses fatores terem se tornado limitantes para o desenvolvimento do fungo. Como já descrito anteriormente, muitos autores indicam que a produção enzimática pode ser aumentada em condições de estresse. Na temperatura de 40 °C, a forma de crescimento do microrganismo variou das demais temperaturas, como descrito no item 3.2. Isto, associado aos outros fatores avaliados, pode ter contribuído para melhor atividade enzimática.

Outros trabalhos nesta área observaram resultados diferenciados para a atividade mesma enzima. Tal fato se justifica, pois a produção de enzimas é diferenciada não somente em nível de espécies microbianas, mas também difere entre isolados da mesma espécie (EIDA et al., 2011). Hanif, Yasmeen e Rajoka (2004), avaliando a produção da exo β -1,4 glucanase em *A. Níger*, observaram a

melhor produção da enzima em pH igual a 6,0 e temperatura de 30 °C. Entretanto, esta avaliação foi feita com apenas 3 dias de incubação. Avaliando o microrganismo CZ01, Oliveira (2010) observou, na temperatura de 60 °C e na faixa de pH compreendida entre 6,0 e 6,5, a máxima atividade enzimática de celulasas.

O aumento da atividade das celulasas e a redução de seu custo de produção são duas questões-chave na hidrólise de materiais celulolíticos. Desse modo, o resultado encontrado no presente estudo é muito promissor, uma vez que a produção de enzimas em temperaturas mais altas é vantajosa do ponto de vista industrial, pois minimiza a contaminação por microrganismos que crescem em temperatura ambiente. Além disso, segundo Oliveira (2010), o pH próximo da neutralidade favorece o processo industrial, pois, além de evitar a corrosão nas tubulações, já que o pH não é ácido, os efluentes provenientes das indústrias não precisam de onerosos tratamentos de correção de pH.

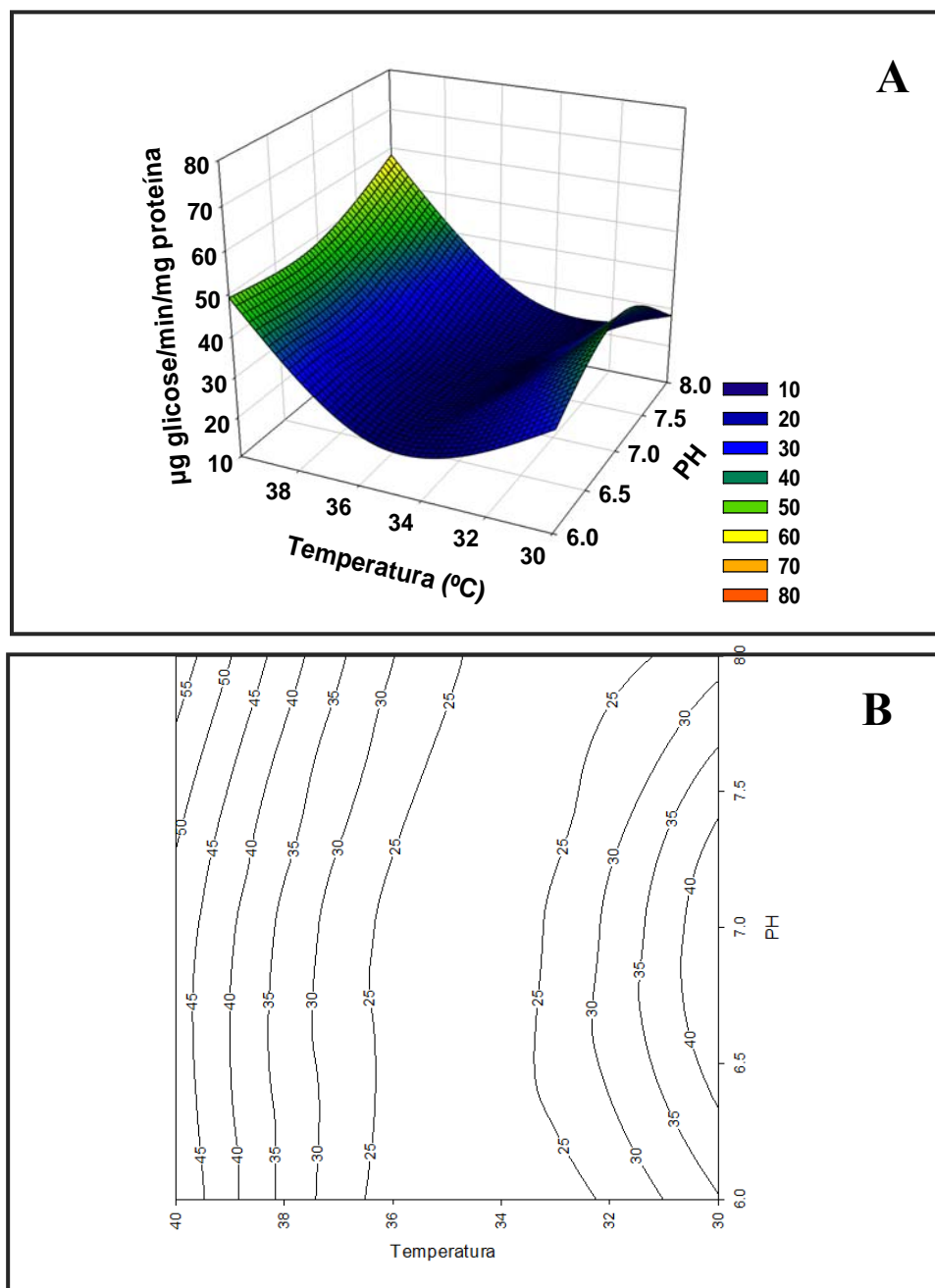


Gráfico 3 Avaliação da atividade específica de exo β -1,4 glucanase produzida por *A. sulphureus*, em interação temperatura e pH; A: gráfico superfície de resposta; B: gráfico de contorno

3.4 Produção ótima de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Para a atividade da endoglucanase, foi observado um comportamento diferenciado ao da exoglucanase (Gráfico 4). Para esta enzima, segundo a análise de variância (Tabela 3 anexo), também foi verificada interação tripla significativa, havendo, então, dependência entre os fatores. Houve grande variação entre os tratamentos, que resultou em gráficos diferentes entre as interações.

A partir das análises dos dados e dos gráficos plotados, verificou-se que a condição ótima de cultivo para a produção da endo β -1,4 glucanase foi encontrada entre 30 °C e 35 °C, pH entre 6,0 e 7,0 e 1,5% de CMC, e a maior produção encontrada foi de 38,57 μ g glicose/min/mg proteína.

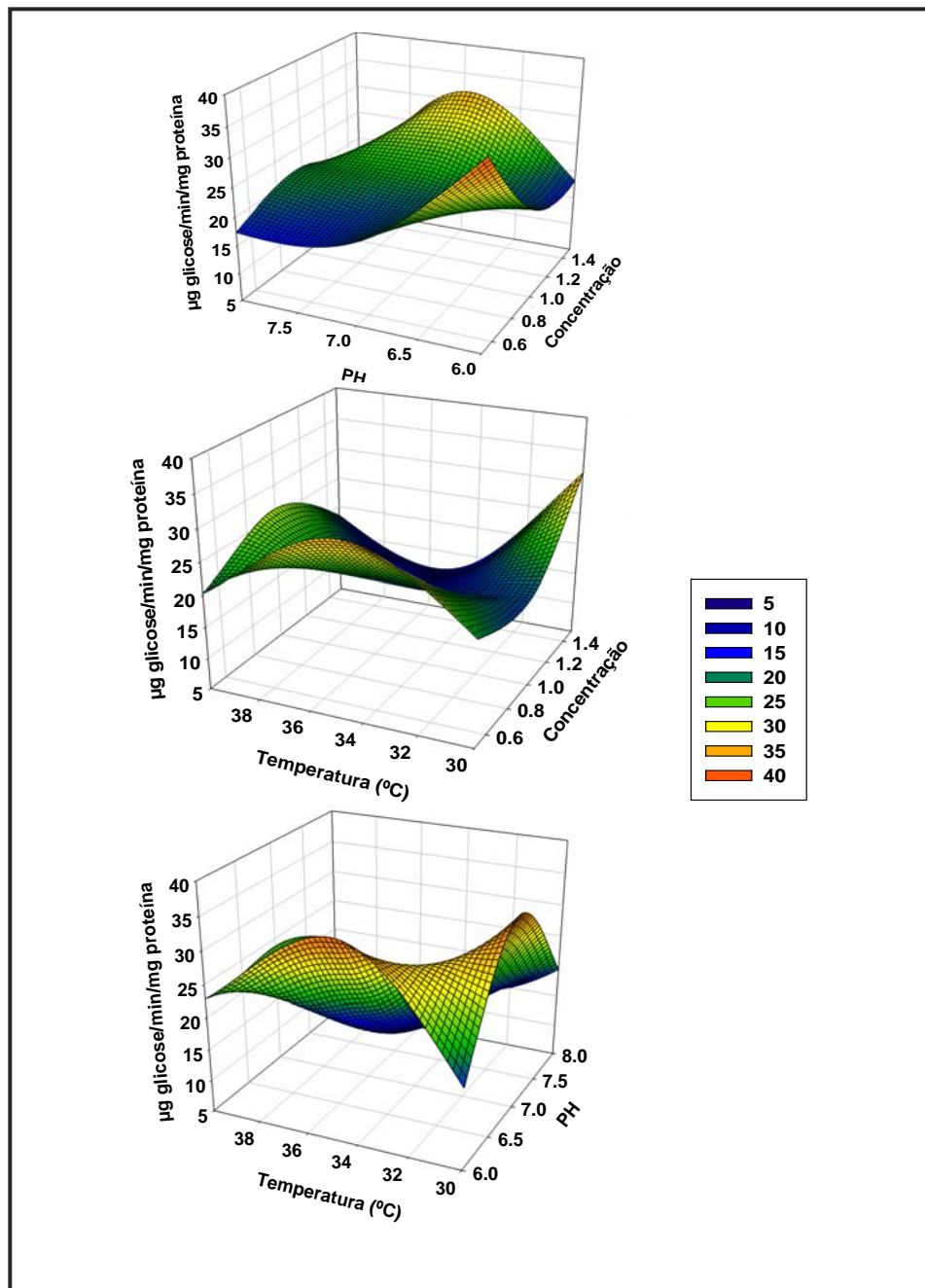


Gráfico 4 Avaliação da atividade específica da endo β - 1,4 glucanase de *A. sulphureus* em gráfico de superfície de resposta para as condições de concentração de substrato, pH e temperatura

Singh, Singh e Bishnoi (2009), analisando a produção de celulases em *A. heteromorphus*, assim como diversos trabalhos com *Aspergillus* em fermentação submersa (LYND et al., 2002), verificaram que a condição ótima de pH e temperatura para a melhor produção de endoglucanases encontra-se em pH compreendido entre 4,0 e 5,0 e temperatura a cerca de 30 °C. Sherief, El-Tanash e Atia (2010) encontraram condição ótima a 40 °C e pH igual a 6,0, para produção em *A. fumigatus*. Gautam et al. (2011) observaram a melhor produção de endoglucanases em pH 6,5 e temperatura entre 40 °C e 50 °C no cultivo dos fungos *Trichoderma* sp. e *A. Niger*, utilizando resíduos urbanos como substrato.

Comparações dos resultados obtidos neste estudo com os obtidos por outros pesquisadores são difíceis, uma vez que não foram encontrados trabalhos disponíveis utilizando *Aspergillus sulphureus* para a produção de celulases. Entretanto, condições semelhantes às do presente estudo (pH 6,0 a 28 °C) foram observadas por Chen et al. (2009), avaliando a produção de β -mannanase em *A. sulphureus*.

A concentração de substrato é pouco avaliada em fermentações submersas no cultivo do microrganismo, contudo, esse fator é muito importante, pois a produção da enzima se dá em função do substrato e a quantificação deste pode gerar uma economia para indústria, uma vez que será utilizada a quantidade exata do substrato, não havendo desperdício. Silva et al. (2009) observaram efeito positivo significativo da concentração de substrato sobre a produção de celulases totais por *Aspergillus phoenicis*, com uso de resíduo de uva como substrato a 1,5% (p/v). Resultado similar foi encontrado por Salles et al. (2010) para a produção de endoglucanases por *A. aculeatus* URM4953 em concentração do substrato de 1,5% p/v.

No presente estudo, as diferentes condições de fermentação submersa foram otimizadas para a produção de celulases por *A. sulphureus*, entretanto, apesar de o microrganismo apresentar alta atividade enzimática, as condições

propostas não foram suficientes para avaliar a máxima produção das enzimas endo β -1,4 glucanase e exo β -1,4 glucanase. Para estudos futuros, seria necessário ampliar o limite inferior e superior dos ensaios (fatorial), a fim de determinar com maior precisão a produção máxima. Além disso, outros fatores devem ser também avaliados, tais como concentração do inóculo, agitação, diferentes substratos e, principalmente, tempo de cultivo. Além disso, técnicas genéticas também seriam apropriadas, pois estão sendo cada vez mais utilizadas em bactérias, leveduras, fungos filamentosos, plantas e animais, para criar novas celulasas e sistemas de produção com possíveis melhoras na atividade e produção das mesmas (LI et al., 2009).

Dessa forma, *A. sulphureus* se mostrou um promissor produtor de endo e exoglucanases, podendo ser futuramente utilizado em indústrias e afins.

4 CONCLUSÕES

- a) O isolado EAPMIG/FA14, da espécie *A. sulphureus* apresentou grande potencial de produção das enzimas endo β -1,4 glucanase e exo β -1,4 glucanase.
- b) Fatores como temperatura, pH e concentração de substrato influenciaram a produção das enzimas endo β -1,4 glucanase e exo β -1,4 glucanase.
- c) O presente estudo representou a execução das primeiras etapas de um bioprocesso, por meio de um microrganismo selecionado de acordo com seu potencial celulolítico e a otimização de seu cultivo.
- d) A análise dos fatores condicionadores da atividade celulolítica demonstrou a interação entre as variáveis pH, temperatura e concentração de substrato.
- e) Considerando-se que o microrganismo selecionado, *A. sulphureus*, apresentou-se como potencial produtor de enzimas celulolíticas. Trabalhos futuros podem ser realizados, visando uma aplicação industrial.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) Os resultados obtidos demonstraram a importância da diversidade microbiana, inclusive da diversidade genética quanto à produção enzimática.
- b) Devido à importância das enzimas microbianas para indústrias e afins, existe uma grande necessidade da triagem de microrganismos potenciais produtores de enzimas.
- c) A partir dos microrganismos bons produtores encontrados, pode-se utilizar a manipulação genética para o desenvolvimento de um isolado completo e capaz de degradar substratos comercialmente.
- d) Considerando-se os resultados positivos obtidos, sugere-se a continuidade do presente estudo, avaliando mais fatores industrialmente importantes, além de experimentos em biorreatores de laboratório, avaliação em escala piloto e, posteriormente, estudos de ampliação de escala.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. Z.; MUYIBI, S. A.; WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4709-4716, July 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 137-152, jan./fev. 2000.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CARVALHO, S. **Pectinases produzida pelo agente biológico G088: extração e purificação**. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CHAUFON, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a grãos de frutos do café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 69 p.

CHEN, X. et al. Overexpression of an optimized *Aspergillus sulphureus* β -mannanase gene in *Pichia pastoris*. **Biologia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 235-238, 2009.

EIDA, M. F. et al. Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 220-227, Mar. 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

GAUTAM, S. P. et al. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. **Biotechnology Research International**, Cairo, 2011. In press.

GHORI, M. I. et al. Corn stover-enhanced cellulose production by *Aspergillus niger* NRRL 567. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 10, n. 31, p. 5878-5886, June 2011.

HANIF, A.; YASMEEN, A.; RAJOKA, M. I. Induction, production, repression and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, n. 1, p. 311-319, Aug. 2004.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, p. 273-279, 1972.

LI, X. et al. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization: a review. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 11, p. 2418-2422, Nov. 2009.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LU, W.; YUBO WU, D. L. Influence of water and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 32, n. 2, p. 305-311, 2003.

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

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characteristics and potential in solid substrate cultivation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. (Ed.). **Solid state fermentation**. New York: Applied Science, 1992. p. 455-467.

NASSER, P. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Avaliação do potencial ocratogenico de espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) separados em peneiras. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: UFES, 2001. p. 771-776.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, nov. 2010.

SHERIEF, A. A.; EL-TANASH, A. B.; ATIA, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 5, n. 3, p. 1-13, 2010.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras, MG**. 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVA, L. D. et al. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 152, n. 2, p. 295-305, Feb. 2009.

SILVA, R. et al. Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 235-241, Sept. 2005.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. **International Journal of Civil and Environmental Engineering**, Davis, v. 1, n. 1, p. 23-26, Jan. 2009.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, maio/jun. 2010.

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e de seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 1988. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

WILSON, D. B.; IRWIN, D. C. Genetics and properties of cellulases. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 1-21, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Executive board EB110/6**: report on meetings of expert committees and study groups. Geneva, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 11 nov. 2011.

XING-HUA, L. et al. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 11, p. 2418-2422, Nov. 2009.

ANEXOS

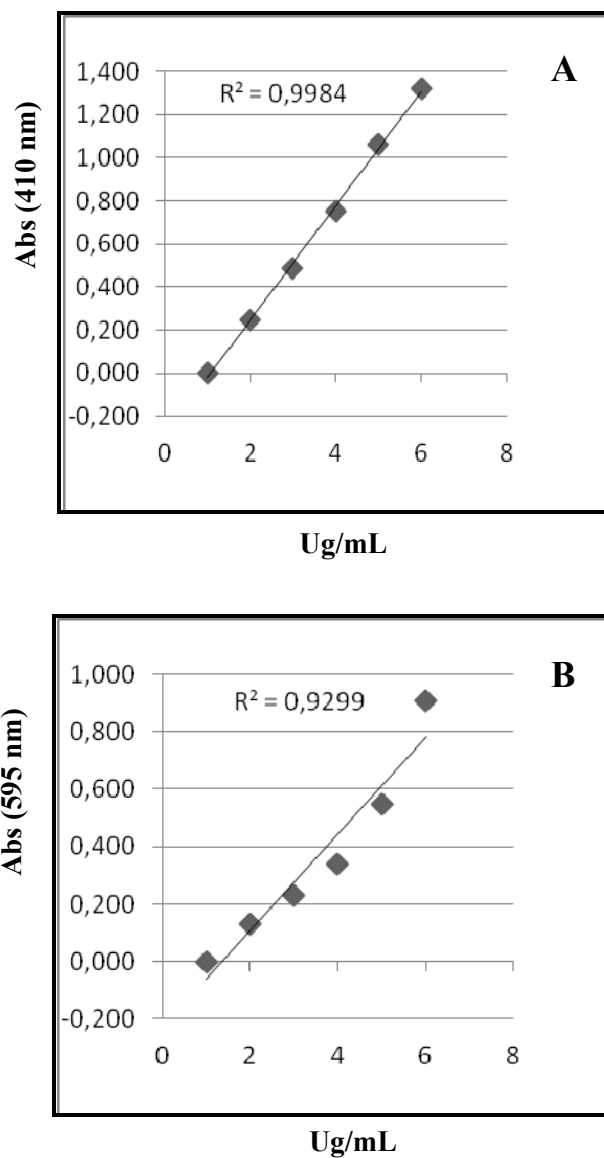


Figura 1 Curvas padrões. (A) de glicose; (B) albumina de soro bovino (BSA)

Tabela 1 Resultados obtidos de produção em atividade específica nos diferentes tratamentos, expressos em μg glicose/min/mg proteína

Tratamento	Avicel 30 °C	Avicel 35 °C	Avicel 40 °C	CMC 30 °C	CMC 35 °C	CMC 40 °C
0,5/6 R1	43,87723	18,308	43,9811	23,04224	49,62602	29,66275
0,5/6 R2	41,70139	18,556	44,4543	22,43211	49,65423	34,23659
0,5/6 R3	42,52001	18,698	41,18186	25,95453	61,54651	33,98192
0,5/7 R1	38,77687	17,612	53,77204	22,13077	23,93146	13,8196
0,5/7 R2	42,72201	13,992	53,33811	20,43283	21,44559	13,57873
0,5/7 R3	44,93011	17,925	50,16003	21,78941	25,08547	14,01476
0,5/8 R1	42,92976	18,457	27,86428	20,76372	17,18582	14,03382
0,5/8 R2	42,89256	14,003	26,57368	20,95507	18,66276	14,50811
0,5/8 R3	42,7741	16,74	23,30243	15,42677	19,73008	14,87916
1,0/6 R1	33,54732	24,12	32,50461	14,9343	32,86708	12,05267
1,0/6 R2	52,68434	27,331	29,51343	16,50483	31,26714	13,34747
1,0/6 R3	47,18078	27,271	33,49004	19,96502	31,7288	13,7805
1,0/7 R1	43,54994	37,045	50,10933	16,16238	7,739831	38,57213
1,0/7 R2	41,41078	31,597	51,16332	16,23857	8,851584	36,29731
1,0/7 R3	43,49638	32,894	48,21059	16,63687	9,336192	36,17287
1,0/8 R1	32,47927	31,49	53,80032	25,6116	9,956673	28,55783
1,0/8 R2	30,02062	33,676	52,46886	25,61826	12,68424	29,27709
1,0/8 R3	29,10176	26,118	55,65407	20,17841	12,1561	27,72655

Tabela 1, conclusão

1,5/6 R1	14,50034	18,033	72,22148	11,6089	20,08563	25,24485
1,5/6 R2	21,98506	16,819	70,67271	10,79715	19,77336	23,77904
1,5/6 R3	13,98015	16,263	74,47473	12,72081	20,20787	19,4044
1,5/7 R1	56,13205	15,324	42,50278	59,8565	7,39177	19,58388
1,5/7 R2	52,67914	14,422	41,93221	66,29781	7,35984	21,73155
1,5/7 R3	36,88668	15,785	40,91327	74,92467	7,357204	20,19831
1,5/8 R1	11,16307	33,686	97,8268	13,42892	9,555712	11,44776
1,5/8 R2	11,15431	28,861	84,39788	18,14954	9,02478	12, 63044
1,5/8 R3	11,27044	30,103	101,1671	15,19938	9,414584	11,70494

Tabela 2 Análise de variância (ANOVA) para a produção da exo β -1,4 glucanase

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
C	2	463-292007	231-646004	16-178	0,0000*
Ph	2	164-029622	82-014811	5-728	0,0055*
T	2	11377-710541	5688-855270	397-305	0,0000*
C*pH	4	1110-426104	277-606526	19-388	0,0000*
C*T	4	6190-811407	1547-702852	108-090	0,0000*
T*pH	4	1740-065570	435-016393	30-381	0,0000*
C*Ph*T	8	6427-389748	803-423719	56-110	0,0000*
erro	54	773-204400	14-318600		
Total corrigido	80	28246-929400			
Cv (%)	10,29				
Média geral	36,7788889			Número de observações	81

Tabela 3 Análise de variância (ANOVA) para a produção da endo β - 1,4 glucanase

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
C	2	252-159252	126-079626	19-870	0.0000*
Ph	2	1058-950052	529-475026	83-445	0.0000*
T	2	170-722822	85-361411	13-453	0.0000*
C*pH	4	2726-969274	681-742319	107-443	0.0000*
C*T	4	2684-124015	671-031004	105-755	0.0000*
T*pH	4	3643-818815	910-954704	143-567	0.0000*
C*Ph*T	8	3599-321859	449-915232	70-907	0.0000*
erro	54	342-638933	6-345165		
Total corrigido	80	14478-705022			
Cv (%)	11,43				
Média geral	22.0448148			Número de observações	81