

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do
Bioma Cerrado**

DOUGLAS ENDRIGO PEREZ PEREIRA

Goiânia, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do
Bioma Cerrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia.

Orientando: Douglas Endrigo Perez Pereira

Orientador: Prof.Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Goiânia – 2013

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás e Laboratório de Microbiologia do Instituto de Fosfatado Biológico - Goiânia – Goiás, com apoio financeiro da Capes.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Membros titulares:

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuíno

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Suplentes:

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Profa. Dr. Gabriel Luis Castioglioni

Você diz “estou exausto”.

Mas assim diz a palavra do Senhor:

“mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.” (Isaias 40:31)

Dedico este trabalho a minha
esposa e aos meus filhos,
Lorenzo†, Nicolás† e
Giovanna.

AGRADECIMENTOS

O mestrado, apesar de ser um curso individual, só consegui obter êxito devido as pessoas que estiveram ao meu redor, apoiando e orientando-me. Sendo assim, gostaria de agradecer a todos.

Agradeço à Deus, por essa graça concedida;

À minha esposa, que me mostrou a ciência e sempre me incentivou a estudar, pela sua paciência e amor nesse período e pelo belo presente que está me dando que são os meus filhos;

Aos meus pais e minha irmã que, apesar da distancia, sempre torceram e me apoiaram; assim como meus tios, tias, primos e minha vó, obrigado pelo apoio que sempre me deram na vida e como é bom saber que sempre posso contar com todos vocês. A distância não nos afasta, mas nos une cada vez mais.

Ao meu amigo Daniel Damiani, pelas orações e amizade;

Ao meu sogro, sogra, cunhados, cunhadas e sobrinha, pelo apoio e orações;

Ao senhor Helio, dona Maria e Thaís que me auxiliaram muito quando cheguei em Goiânia e me auxiliam até hoje, obrigado.

Ao Instituto de Fósforo Biológico, que apoiaram o meu projeto, fornecendo os microrganismos e o espaço no laboratório para a execução do trabalho. Agradeço a todos os colaboradores, em especial ao senhor Ronaldo Justiano, pela dedicação e disposição que sempre mostrou. Agradeço a família Parrode (Antonio, Tiago e Danilo), pelo apoio e simpatia que sempre me deram. Agradeço ao senhor Orlando Murgel que sempre me apoiou, orientou e incentivou-me, obrigado.

Ao Dr. Paulo Henrique Murgel, que me inspirou a ser um pesquisador, homem da ciência, que trouxe um grande benefício à agricultura brasileira e que tenho a honra de trabalhar ao seu lado, obrigado pelo incentivo, pela orientação e pela força que o senhor me transmite para continuar avançando na ciência;

Ao amigo Wagner que me apoiou, indicou a orientadora e a linha de pesquisa;

À minha orientadora Prof^a Fabricia, obrigado pela paciência em me ensinar e pela orientação que passou para a realização desse mestrado;

Ao meu orientador Prof. Luiz Artur, obrigado pelas orientações e pela sua atenção em todo esse processo;

À prof^a Rosália, sempre muito simpática e atenciosa, obrigado.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia de Fungos, Isadora, Carol, Guilhermar, Syd, Francielly, Ilitia, Lorena, Saulo, Amanda e Lorraine pela simpatia, amizade e auxílio que sempre me deram;

Aos colegas da minha turma, Aroldo e Leandro, pelo companheirismo e auxílio.

Ao Prof.Dr. Eduardo Ramirez Asquieri, pois foi em seu laboratório que peguei o gosto pela ciência, incentivando-me a estudar, com um sorriso sempre aberto e atencioso. Aprendi muito com o senhor, mesmo nunca tendo assistido a uma aula, obrigado.

Aos amigos Gabriel Luiz Castiglioni e Francielo Vendruscolo, pelos conselhos, orientações e força. Aos amigos Marcio Caliari, Manoel Soares Soares Junior, Flavio Alves da Silva, Terezinha Vera, Rosangela Vera e Valdirene Monteiro pelo apoio e força, obrigado.

Ao prof.Dr. Elson Alves Costa e seu aluno de mestrado José Luiz, por ter aberto o laboratório e auxiliado em meu experimento;

À Gleice, secretaria do programa de Pós-Graduação, pela atenção e presteza;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, colaboraram com esse trabalho e caminharam juntos comigo. A vocês, meus sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomassa	1
1.2 Constituintes da parede celular	1
1.2.1 Celulose	1
1.2.2 Hemicelulose	2
1.2.3 Lignina	4
1.3 Enzimas degradadoras da parede celular	4
1.3.1 Celulases	4
1.3.2 Xilanases	6
1.3.2.1 Endoxilanases	7
1.4 Produção de celulases e xilanases fúngicas	8
1.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	11
1.6 Produção de celulases e xilanases pelo fungo <i>Aspergillus niger</i>	12
1.7 Aplicação Biotecnológica de xilanases e celulases	14
1.8 Isolamento de fungos do solo produtores de celulases e xilanases	16
2. OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Linhagens utilizadas	20
3.2 Manutenção e cultivo dos fungos	20
3.3 Substratos lignocelulósicos	20
3.4 Preparo dos substratos lignocelulósicos	20
3.5 Meios de Cultura	20
3.5.1 Meio Ágar Aveia – AA	20
3.5.2 Meio Mínimo– MM	21
3.5.3 Meio Celulose Asparagina Agar – CAA	21

3.5.4	Meio Czapek	21
3.5.5	Meio Extrato de Malte - MEA	22
3.6	Substratos para Determinação das Atividades Enzimáticas	22
3.7	Soluções	22
3.7.1	Soluções para a Determinação da Atividade Enzimática	23
3.7.1.1	Solução de ácido dinitrosalicílico – ADNS	23
3.7.1.2	Tampão Citrato de Sódio 0,05 M	23
3.7.1.3	Tampão Fosfato 0,05 M	23
3.7.1.4	Tampão Tris-HCl 0,05M	23
3.7.1.5	Tampão Carbonato 0,05 M	24
3.7.1.6	Solução de Xilana “Beechwood” 1% (p/v)	24
3.7.1.7	Xilose	24
3.7.1.8	Solução de Carboximetilcelulose (CMC)	24
3.7.1.9	Solução de Avicel	24
3.7.1.10	Solução pNP- β -D- glicopiranosideo	24
3.8	Seleção dos fungos produtores de enzimas celulolíticas por atividade em placa	25
3.9	Produção de celulasas e xilanases por fungos cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos	25
3.10	Determinação das atividades xilanolítica e celulolíticas pelo método dos açúcares redutores	25
3.11	Determinação da atividade de β -glicosidase	27
3.12	Determinação do pH em que há maior atividade	27
3.13	Determinação da temperatura em que há maior atividade	27
3.14	Avaliação da estabilidade da enzima em diferentes faixas de pH	27
3.15	Avaliação da termoestabilidade	28
3.16	Influência de íons, glicose, xilose e celobiose na atividade de β -glicosidase	28
3.17	Análise do perfil de proteínas presentes no sobrenadante de cultura por SDS-PAGE	28
3.18	Análise do perfil de enzimas secretadas por Zimograma	29
3.19	Marcador de massa molecular para proteínas	29
3.20	Identificação taxonômica	30

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Seleção dos fungos produtores de enzimas celulolíticas por atividade em placa	31
4.2	Seleção dos isolados produtores de enzimas celulolíticas por fermentação submersa	35
4.3	Identificação taxonômica do isolado IFBMD01	38
4.4	Produção de enzimas pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01	41
4.4.1	Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade das celulases e xilanases produzidas por <i>A.niger</i> IFBMD01	44
4.4.1.1	FPASE	44
4.4.1.2	CMCASE	47
4.4.1.3	AVICELASE	51
4.4.1.4	XILANASE	53
4.4.1.5	β -GLICOSIDASE	56
4.5	Influência de íons, glicose, xilose e celobiose na atividade de β -glicosidase	60
4.6	Perfil eletroforético das proteínas secretadas pelo isolado IFBMD01	62
5.	CONCLUSÕES	66
6	PERSPECTIVAS	68
7.	BIBLIOGRAFIA	69
	ANEXO I	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da celulose.	2
Figura 2	Estrutura molecular de carboidratos constituintes da hemicelulose.	3
Figura 3	Representação da xilana.	4
Figura 4	Representação esquemática da hidrólise da celulose.	6
Figura 5	Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana.	7
Figura 6	Imagem representativa de uma placa contendo os meios sólidos, MM, CAA ou CZ, com CMC ou Avicel no experimento de atividade em placa.	31
Figura 7	Índice de produção de celulase por fungos do grupo MD cultivados em meio contendo CMC.	34
Figura 8	Índice de produção de celulase por fungos do grupo MD cultivados em meio contendo Avicel.	35
Figura 9	Produção de enzimas com atividade de Avicelase, FPase, Xilanase, CMCase e β -Glicosidase pelos fungos cultivados em BCA, CMC e FT.	36
Figura 10	Sequência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do RNA ribossomal do isolado IFBMD01, <i>A. tubingensis</i> , <i>A. phoenicis</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. costaricensis</i> , <i>A. vadensis</i> , <i>A. niger</i> WHAT2, <i>Phanerochaeta chrysosporium</i> e <i>Hypocrea lixi</i>	38
Figura 11	Árvore filogenética construída por <i>Neighbour –Joining</i> .	39
Figura 12	Colônias de <i>A. niger</i> IFBMD01 cultivadas em meio MEA.	40
Figura 13	Microscopia do fungo <i>A. niger</i> IFBMD01.	41
Figura 14	Análise da produção de enzimas com atividade de FPase, Xilanase, CMCase, Avicelase e β -Glicosidase pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01.	42
Figura 15	Comportamento das enzimas com atividade de FPase secretadas pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01 em diferentes valores de pH.	45
Figura 16	Comportamento das enzimas com atividade de FPase secretadas pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.	46
Figura 17	Estabilidade das enzimas com atividade de FPase presentes no MM/FT/FP em pH 4,5 a 6,5 por 48h.	47

Figura 18	Estabilidade da atividade das FPases presentes no MM/FT/FP nas temperaturas de 50, 60 e 70°C por 48 horas.	47
Figura 19	Comportamento das enzimas com atividade de CMCase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01(MM/FT/CMC) em diferentes valores de pH.	48
Figura 20	Comportamento das enzimas com atividade de CMCase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01(MM/FT/CMC) em diferentes faixas de temperatura.	49
Figura 21	Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase presentes no MM/FT/CMC em de pH 4,0 a 6,0 por 48h.	49
Figura 22	Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase presentes no MM/FT/CMC nas temperaturas de 60, 70 e 80°C..	50
Figura 23	Comportamento das enzimas com atividade de Avicelase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01(MM/FT/AVI) em diferentes valores de pH.	51
Figura 24	Comportamento das enzimas com atividade de Avicelase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01(MM/FT/AVI) em diferentes faixas de temperatura.	52
Figura 25	Estabilidade das enzimas com atividade de Avicelases presentes no MM/FT/AVI em pH de 4,5 a 6,5 por 48h.	52
Figura 26	Estabilidade das enzimas com atividade de Avicelases presentes no MM/FT/AVI nas temperaturas de 50, 60 e 70°C.	53
Figura 27	Comportamento das enzimas com atividade de xilanase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01 em diferentes valores de pH.	54
Figura 28	Comportamento das enzimas com atividade de xilanase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.	54
Figura 29	Estabilidade das enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL nos pHs de 4 a 6.	55
Figura 30	Estabilidade das enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL nas temperaturas de 40, 50 e 60°C.	56
Figura 31	Comportamento das enzimas com atividade de β -glicosidase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01 em diferentes valores de pH.	57

Figura 32	Comportamento das enzimas com atividade de β -glicosidase secretadas pelo fungo <i>A.niger</i> IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.	58
Figura 33	Estabilidade das enzimas com atividade de β -glicosidase presentes no MM/FT/BGL nos pHs de 4 a 6.	59
Figura 34	Estabilidade das enzimas com atividade de β -glicosidase presentes no MM/FT/BGL nas temperaturas de 50, 60 e 70°C.	60
Figura 35	Influência de glicose, xilose e celobiose na atividade das β -glicosidases secretadas pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01 (MM/FT/BGL).	61
Figura 36	Análise eletroforética das proteínas presentes no MM/FT/XIL e MM/FT/CMC por SDS-PAGE e Zimograma para atividade de CMCase.	63
Figura 37	Análise eletroforética das proteínas presentes no MM/FT/XIL e MM/FT/CMC por SDS-PAGE e Zimograma para atividade de xilanase.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre os microrganismos em relação aos diferentes tipos de meios de cultura e fonte de carbono, quanto ao índice de produção celulase por meio de halo de hidrólise em placas.	34
Tabela 2	Composição da parede celular dos substratos BCA e FT.	36
Tabela 3	Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por diferentes fungos filamentosos.	37
Tabela 4	Influência de íons na atividade da enzima β -Glicosidase, produzida pelo fungo <i>A. niger</i> IFBMD01.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Avicel - Celulose microcristalina

Avicelase - Atividade enzimática contra avicel

BCA - Bagaço de cana-de-açúcar

BGL - β -glicosidase

CBH - Celobiohidrolase

CMC - Carboximetilcelulose

CMCase - Atividade enzimática contra CMC

ADNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FPase - Atividade enzimática contra papel de filtro

FT- Farelo de trigo

g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

Kb - kilobase

MES - Ácido N-morfolino etanolsulfônico

MM - Meio mínimo

q.s.p. - Quantidade suficiente para

SDS - Sódio dodecil sulfato

SDS- PAGE - Gel desnaturante de poliacrilamida

TEMED - N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

U - Unidade enzimática (quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de produto por minuto nas condições do experimento)

RESUMO

A biomassa lignocelulósica é constituída pela celulose, hemicelulose e lignina, presentes na parede das células vegetais. A xilana é o principal componente da fração de hemicelulose da lignocelulose. A conversão da lignocelulose à açúcares fermentáveis é realizada por um complexo de celulasas e xilanases: enzimas que hidrolisam as frações de celulose e xilana. O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de celulasas e xilanases por fungos isolados a partir de solo e material em decomposição do Bioma Cerrado. Inicialmente, os fungos foram analisados quanto à capacidade de produção de celulasas por atividade em placa, neste experimento, os fungos produtores de maiores níveis de celulasas foram selecionados para os experimentos de produção de celulasas e xilanases por fermentação submersa utilizando meio suplementado com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono. Dentre os fungos analisados, o isolado IFBMD01 apresentou maior atividade de celulasas e xilanases no sobrenadante de cultura do fungo cultivado em meio com farelo de trigo, sendo que o pico de produção FPases, CMCase, Avicelases e xilanases foram obtidos após 7, 6, 9 e 3 dias de cultivo respectivamente. A caracterização bioquímica das celulasas e xilanases produzidas pelo isolado IFBMD01 demonstrou que: as enzimas com atividade de FPase apresentaram atividade de 0,10 U/mL, pH e temperatura ótimos de 5,5 e 60°C; as CMCase apresentaram atividade de 8,19 U/mL, pH ótimo de 5 e temperatura ótima de 70°C; as Avicelases apresentaram atividade de 0,01 U/mL, pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 60°C; as xilanase apresentaram atividade de 35,5 U/mL, sendo o pH ótimo de 5 e a temperatura ótima de 50°C e as β -glicosidases apresentaram atividade de 0,98 U/mL, com o pH ótimo de 5 e temperatura ótima de 60°C. A atividade de β -glicosidase presente no sobrenadante de cultura foi influenciada pelos íons Mn^{2+} , NH_4 , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na^+ e Co^{2+} , assim como por EDTA, glicose, xilose e celobiose. No sobrenadante de cultura do isolado IFBMD01 cultivado em FT por 3 e 6 dias foram visualizadas bandas de proteínas com atividade contra xilana e CMC, com massa molecular aproximada de 30 a 66 kDa. A identificação morfológica e molecular do isolado IFBMD01 demonstrou que é um isolado de *Aspergillus cf niger*.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is constituted by cellulose, hemicellulose and lignin in the plant cell walls. The conversion of lignocellulose to fermentable sugars mainly depends on the action of a complex of enzymes that hydrolyze cellulose and hemicellulose. This study was to analyze the production of cellulases and xylanases by fungi isolated from soil and decaying material in Cerrado. Initially, the fungi were analyzed for cellulase production capacity among the fungal cellulase-producing fungus capable of producing the highest levels of cellulase was selected for the experiments of xylanase and cellulase production by submerged fermentation and biochemical analysis of the enzyme secreted. Among the isolated fungi, fungus called IFBMD01 was that higher activity of cellulase in the supernatant when cultivated with wheat bran as carbon source. This was identified as *Aspergillus cf niger*. The enzymes studied with their respective results were: FPase with better production time of 7 days, showing activity of 0.10 U / mL, optimum pH 5.5, optimum temperature of 60 ° C; CMCase with better time production 6 days, showing activity of 8.19 U / mL, pH optimum of 5, optimum temperature of 70 ° C; Avicelase with better production time of 9 days, showing activity of 0.01 U / mL, pH optimum of 5.5 and optimum temperature of 60 ° C; xylanase, with better production time 3 days, showing activity of 35.5 U / mL, and the optimum pH of 5 and the optimum temperature of 50 ° C, the β -Glycosidase, with higher production on the sixth day showing activity of 0.98 U / mL, with the optimum pH 5 and optimum temperature of 60 ° C. The activity of β -glucosidase showing in the culture supernatant was influenced by the ions Mn^{2+} , NH_4 , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na^+ , and Co^{2+} , as well as EDTA, glucose, xylose and cellobiose. In the culture supernatant of the fungus *A. niger* IFBMD01 grown on FT for 3 and 6 days protein bands were visualized with activity against xylan and CMC molecular weight be 30 to be 66 kDa.

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O principal componente da biomassa vegetal é a lignocelulose, constituída pela celulose, hemicelulose e lignina, presentes na parede das células vegetais; compreendendo metade do peso seco das plantas. Somente uma pequena porcentagem destes polímeros, gerados como subprodutos da atividade agrícola é aproveitada. Muitos microrganismos produzem um complexo de enzimas extracelulares que degradam a fração de celulose e hemicelulose da lignocelulose possibilitando o aproveitamento da celulose e hemicelulose como fonte de carbono e energia (SANCHEZ, 2009). A biomassa lignocelulósica representa um abundante e renovável recurso que pode ser usado para produzir biocombustíveis ecológicos e produtos químicos (KOVÁCS *et al.*, 2009). A celulose e a hemicelulose, dentre os materiais naturais, são os biopolímeros mais abundantes (BAYER & LAMED 1992).

1.2 CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR

1.2.1 CELULOSE

A celulose é o principal constituinte estrutural das células vegetais, representando 35 a 50% do peso seco das mesmas. Seu papel é exclusivamente estrutural, conferindo à célula proteção osmótica e resistência mecânica (BAYER & LAMED, 1992).

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Cada resíduo de glicose tem orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando, assim, a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero. A extremidade da cadeia de celulose, em que se encontra um carbono anomérico livre, é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não está disponível é chamada de não redutora (Figura 01) (SANDGREN *et al.*, 2005).

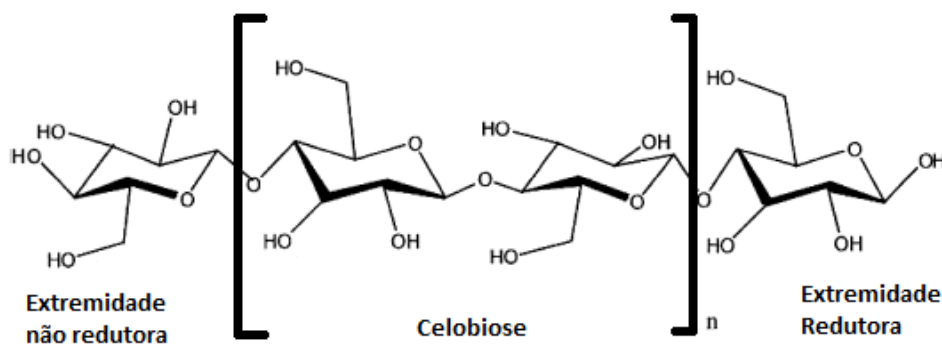


Figura 01. Estrutura molecular da celulose (Adaptado de ZHANG & LYND, 2004).

Um número variável de unidades de glicose (aproximadamente cem) formam fibrilas que se empacotam, formando as microfibrilas de celulose. As fibrilas de celulose conectam-se por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e, ainda, por forças de Van der Waals, formando microfibrilas rígidas e insolúveis. Estas microfibrilas apresentam regiões com alto grau de cristalinidade, sendo chamadas de regiões cristalinas, ou regiões menos compactas, com maior distanciamento entre as fibras, chamadas de regiões amorfas. Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como a água e enzimas (LYND *et al.*, 2002).

1.2.2 HEMICELULOSE

A hemicelulose encontra-se em associação com a celulose na parede das células vegetais (TIMELL, 1967). É formada por heteropolissacarídeos, contendo diferentes resíduos de carboidratos: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-raminose ácido D-galacturônico e ácido D-glicurônico, sendo, normalmente, formada por 2 à 6 açúcares diferentes, unidos na maioria por ligações do tipo β -1,4 (Figura 02)(JANES, 1969). As hemiceluloses são classificadas de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (THOMPSON, 1983; BASTAWDE *et al.*, 1992).

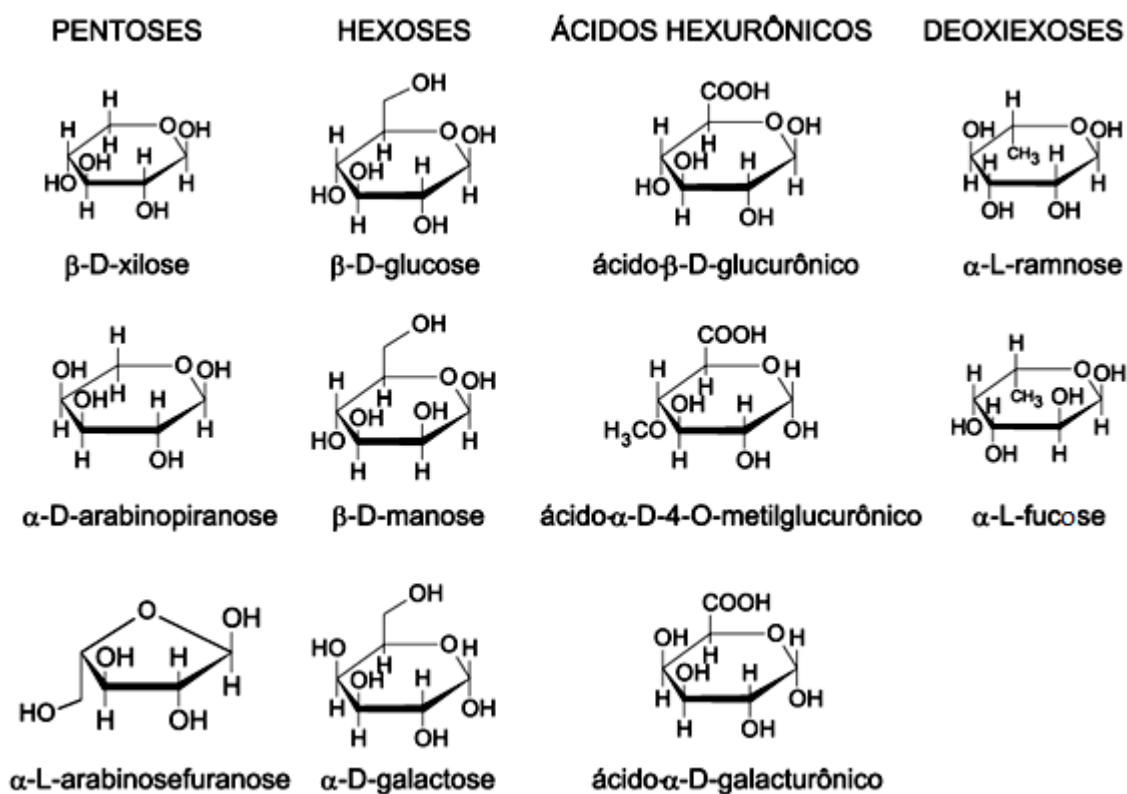


Figura 02 – Estrutura molecular dos carboidratos constituintes da hemicelulose (FENGEL & WEGENER, 1989).

A xilana é um complexo de carboidratos poliméricos e constitui o principal componente da hemicelulose. A cadeia principal da xilana é formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus por 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil (Figura 03). A xilana apresenta ainda pequenas quantidades de ácido ferúlico e *p*-cumárico ligados aos seus resíduos de L-arabinofuranose (KULKARNI *et al.*, 1999).

A xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose, sendo importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (BEG *et al.*, 2001).

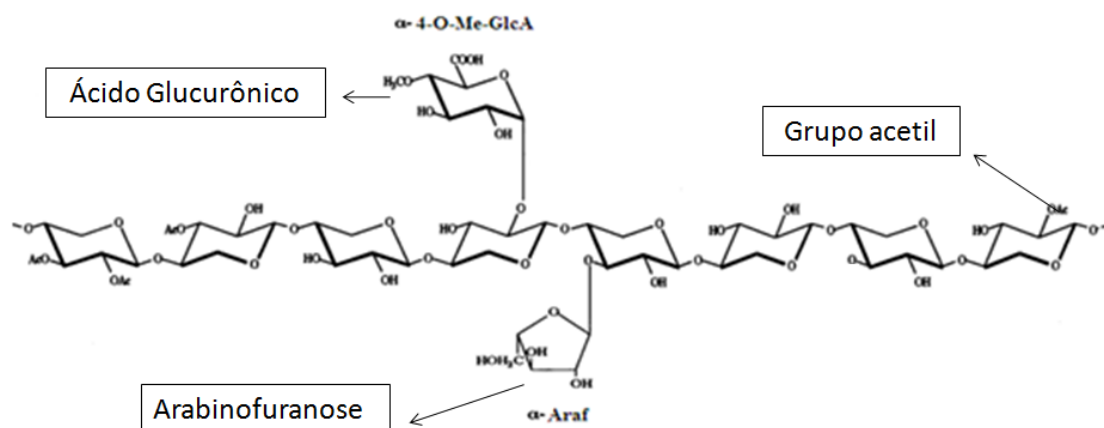


Figura 03 - Representação da xilana com a cadeia principal formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil com ramificações de ácido glucurônico, L-arabinofuranose e grupo acetil (COLLINS *et al.*, 2005).

1.2.3 LIGNINA

A lignina é um polímero, cuja estrutura tridimensional não uniforme, é composta basicamente de unidades de fenil propano (FENGEL & WEGENER, 1989). A lignina é composta por 9 unidades de carbono, derivadas do álcool cinamil substituído, que são cumaril, coniferil e álcool siringil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química, variando de acordo com a fonte de origem. A lignina encontra-se ligada a celulose e a hemicelulose, formando um lacre físico que constitui uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (SANCHES *et al.*, 2009).

1.3 ENZIMAS DEGRADADORAS DA PAREDE CELULAR

1.3.1 CELULASES

A hidrólise enzimática da celulose, em açúcares solúveis, é um processo que envolve a ação de um complexo multienzimático, denominado sistema celulolítico (DAIROT *et al.*, 2007). As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose. As enzimas do sistema celulolítico são divididas em três classes de enzimas hidrolíticas em fungos: as endoglicanases (EGL), as quais clivam ligações internas nas microfibrilas que se encontram nas regiões amorfas da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades

livres; as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH), que agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras (CBHI) ou não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e, principalmente, moléculas de celobiose como produtos; e as β -glicosidases (BGL), que atuam nos celooligossacarídeos e celobiose liberados pela ação das endo e exoglucanases e os hidrolisam a glicose (Figura 04)(TEERI, 1997; LYND *et al.*, 2002).

A endoglucanase é a enzima do complexo celulolítico responsável hidrolisar randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND *et al.*, 2002). A endoglucanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à fragmentação da celulose em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER *et al.*, 1996). O sítio ativo da endoglucanase possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o seu grau de polimerização de maneira considerável (SALOHEIMO *et al.* 1997). As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões micro cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (ELISAHVILI, 1993).

As celobiohidrolases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras (CBHI - EC 3.2.1) e não-redutoras (CBHII - EC 3.2.1.91) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente, celobiose como produtos. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (celobiose). Possuem um domínio de ligação ao substrato conectado ao domínio catalítico por uma dobradiça. Embora os domínios de ligação à celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a atividade específica das enzimas em substratos celulolíticos solúveis e insolúveis. O domínio de ligação à celulose (CBD) se liga na celulose microcristalina enfraquecendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, ajudando na separação das mesmas e na progressão da enzima. As enzimas que possuem o CBD apresentam melhor atividade sobre substratos insolúveis, principalmente sobre celulose cristalina, mas em substratos solúveis a falta do CBD não afeta a atividade enzimática. As CBHs atuam em sinergismo com as endoglucanases (EGLs) e os produtos de hidrólise são glicose e principalmente celobiose (TEERI, 1997; LYND *et al.*, 2002).

As β -glicosidasas têm a propriedade de hidrolisar celobiose (gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases) e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose. As β -glicosidasas também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose, porém são induzidas pela presença de celobiose. Quando as endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidasas atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento superior que a soma dos rendimentos individuais, efeito é conhecido como sinergismo (LYND *et al.*, 2002; ZHANG *et al.* 2004).

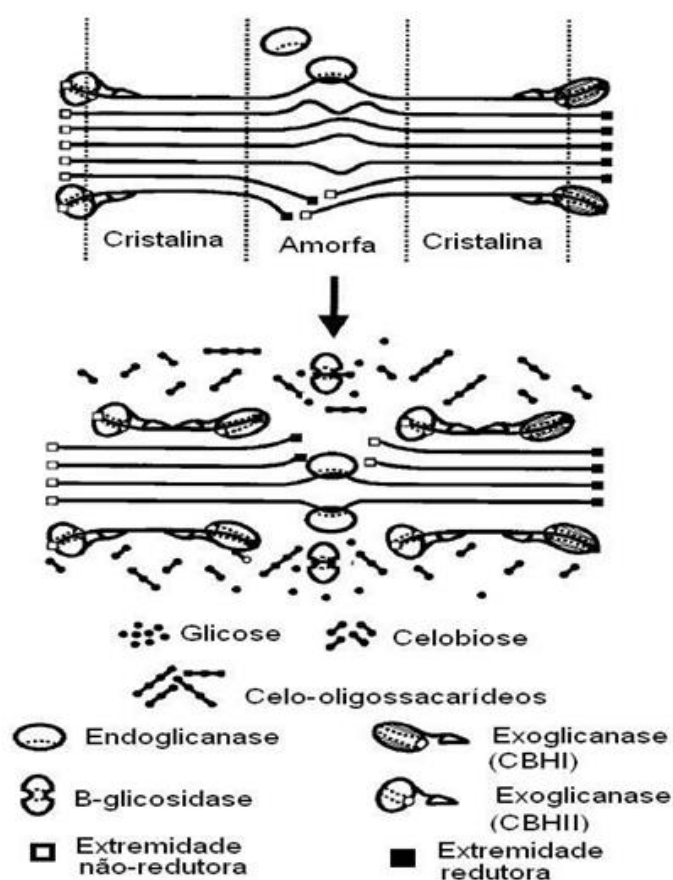


Figura 04 - Representação esquemática da hidrólise da celulose microcristalina e amorfa (Adaptado de LYND *et al.*, 2002).

1.3.2 XILANASES

A xilana representa a principal classe de hemicelulose encontrada na parede das células vegetais. Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua hidrólise requer ação sinérgica de um conjunto de enzimas responsáveis pela conversão da xilana em

unidades de xilose (sistema xilanolítico). As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4, dentro da cadeia da xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase. As arabinofuranosidases hidrolisam o grupo terminal não redutor de arabinofuranose de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. As glucuronidas hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre a xilose e o ácido glucurônico. A completa hidrólise de xilanas requer a ação de esterases que quebram as ligações da xilose com o ácido acético (acetil-xilana esterase) e as ligações entre os resíduos de L-arabinofuranose com ácido ferúlico (ácido ferulico esterase) ou ácido cumárico (ácido p-cumárico esterase). Todas estas enzimas atuam, cooperativamente, para converter a xilana em unidades de xilose (Figura 05) (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

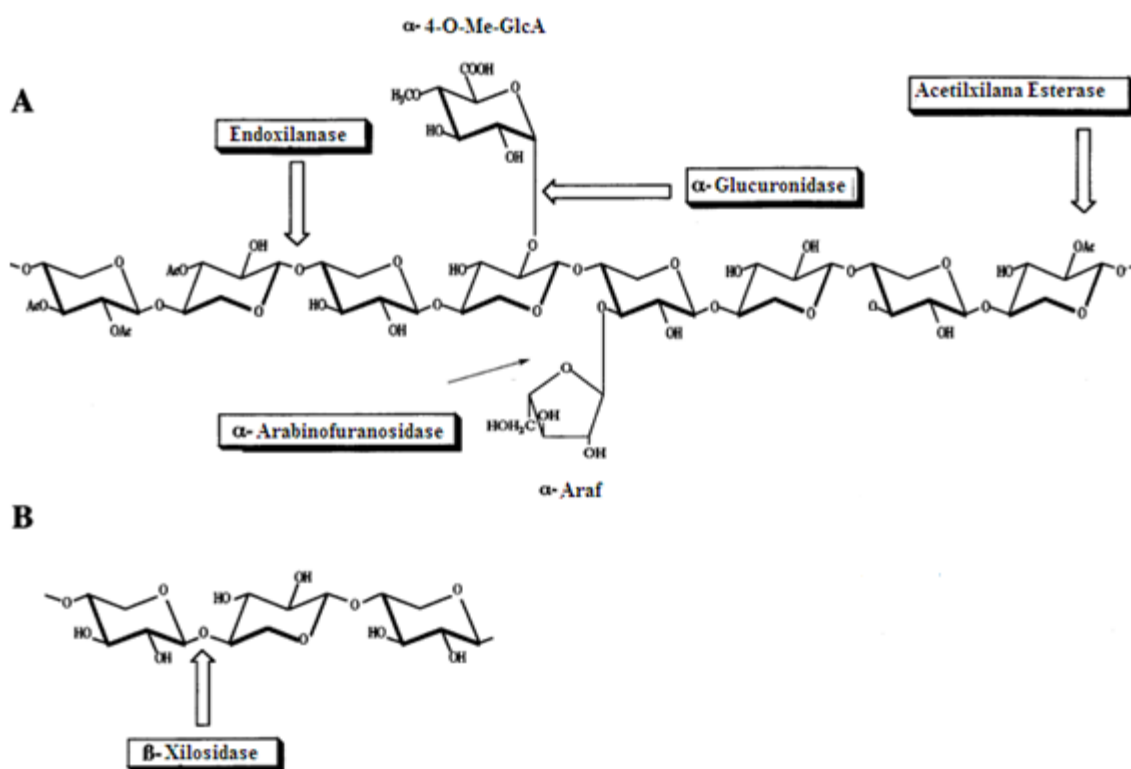


Figura 05 - (A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na hidrólise da xilana. Ac: grupo acetil; α -raf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: α -4-O-metilglucurônico (ácido glucurônico). (B) Hidrólise de xilo-oligossacarídeos por β -xilosidase (COLLINS *et al.*, 2005).

1.3.2.1 ENDOXILANASES

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características, o modo de ação da enzima e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e

bactérias (BASTAWDE, 1992). As informações disponíveis, na literatura, sobre as propriedades bioquímicas das endoxilanases são elucidadas predominantemente dos estudos com as endoxilanases bacterianas e fúngicas. Estas são enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa e apresentam, na sua maioria, atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C, sendo que as enzimas fúngicas apresentam maior estabilidade; somente um pequeno número de endoxilanases microbianas apresenta atividade ótima em temperaturas acima de 80°C (DUSTERHOFT *et al.*, 1997; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). As endoxilanases fúngicas são usualmente estáveis em uma ampla faixa de pH (4 a 7); ponto isoelétrico pI variando de 3 a 10 (SUBRAMANYAN & PREMA, 2002).

As endoxilanases podem ser consideradas como específicas quando hidrolisam somente as ligações β -1,4 dentro da cadeia principal de xilana ou não específicas quando hidrolisam ligações glicosídicas, cruzadas, do tipo β -1,4 de outros polímeros adjacentes como as da celulose microcristalina. As endoxilanases hidrolisam a xilana a xilo-oligossacarídeos e xilobiose (dímero de xilose), que é o substrato para a β -xilosidase. Algumas enzimas somente atuam na cadeia central de xilana (não ramificadoras), enquanto que outras hidrolisam as ramificações de arabinofuranose também (ramificadoras) (COUGHLAN, 1992).

1.4 PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES FÚNGICAS

A produção de enzimas do sistema celulolítico (celulases) e xilanolítico (xilanases) tem sido amplamente estudada em fungos, sendo estabelecido que a regulação da mesma é sujeita a indução, repressão catabólica na presença de glicose e expressão constitutiva destas enzimas (KULKARNI *et al.*, 1999; SUTO & TOMITA, 2001). O crescimento do microrganismo em fonte de carbono favorável, como a glicose, reprime a síntese de enzimas requeridas para o metabolismo de fontes de carbono alternativas como a xilana ou a celulose. Assim, em geral, a produção das xilanases é reprimida pela glicose e induzida pela xilana; a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de glicose e induzida na presença de diversos indutores, como celulose e celobiose (MANDELS & PARRISH, 1962; BASTAWDE *et al.*, 1992; BÉGUIN, 1994; KULKARNI *et al.*, 1999). O fenômeno da repressão catabólica ocorre devido a formação de uma cascata de sinais no interior da célula, iniciada pela presença da molécula sinal (glicose), causando a ativação da molécula repressora. Esta molécula se liga a região promotora dos genes de celulase e xilanase, bloqueando a transcrição e expressão destes

genes (SANCHEZ, 2009).

Uma vez que a celulose e a xilana não conseguem atravessar a parede e a membrana celular microbiana, o fungo produz celulasas e xilanases constitutivas que são secretadas e clivam, inicialmente, os polissacarídeos. Gerando moléculas menores que penetram na célula e são responsáveis pela indução da expressão dos genes que codificam enzimas do sistema celulolítico e xilanolítico (KULKARNI *et al.*, 1999).

Em fungos o pH em que há maior desenvolvimento e maior atividade metabólica (conseqüentemente, maior produção de enzimas) é ácido, entre 4 a 6, conforme Tortora *et al.* (2005). Quanto a temperatura, POLIZELI *et al.*, 2005 citam que os microrganismos termófilos são de interesse biotecnológicos por possuir estabilidade térmica maior do que uma enzima produzida em temperaturas menores.

Yan *et al* (1997) verificaram que no pH 5,0 e na temperatura de 55° C ocorre a maior atividade enzimática da β -glicosidase produzida pelo fungo *A.niger* CCRC 31494, também analisaram que a glicose, quando adicionado no meio reacional, inibiu a atividade enzimática dessa enzima.

Para Kiehl (1985) os microrganismos absorvem os elementos carbono e nitrogênio em uma proporção de trinta partes de carbono para cada parte de nitrogênio, o carbono é utilizado como fonte de energia, sendo dez partes incorporadas ao protoplasma celular e vinte partes eliminadas como gás carbônico; o nitrogênio é assimilado na estrutura da célula na proporção de dez partes de carbono para uma de nitrogênio.

De acordo com Stewart & Parry (1981) que analisaram em que pH, fonte de nitrogênio, fonte de carbono e temperatura são melhores para a produção das enzimas FPase e Avicelase pelo fungo *A. fumigatus*, chegaram a conclusão que para FPAse e Avicelase o pH com maior produção é o pH 6, a fonte de nitrogênio é o NH_4NO_3 , a fonte de carbono é a celulose e a temperatura entre 30 a 60°C.

Segundo Suto & Tomita (2001), há três estados na regulação de celulasas em fungos: expressão a nível basal, secreção de celulasas induzidas por indutores e repressão catabólica. Em nível basal de expressão nem as proteínas ativadoras nem as repressoras catabólicas afetam a regulação da transcrição das celulasas. Acredita-se que a celulase expressa em nível basal pode ajudar os fungos a reconhecer a existência da celulose. Quando um indutor entra na célula ele aciona a transcrição do gene da celulase mediada por proteínas ativadoras e elementos de ativação, e com uma grande quantidade de celulase secretada ocorre a degradação de mais celulose para

oligossacarídeos e glicose favorecendo o crescimento. Após a degradação da celulose, uma grande quantidade de glicose é liberada o que causa a repressão catabólica. A proteína repressora catabólica é diretamente responsável pela regulação negativa à nível transcricional. A repressão catabólica vai impedir o fungo de sintetizar uma quantidade excessiva de celulasas em circunstâncias em que há abundância de fonte de carbono facilmente assimilável.

Segundo Mandels & Reese (1960), a celobiose é liberada pela ação de celobiohidrolases constitutivas sobre a celulose, é responsável pela indução da expressão de outros genes de celulase das outras enzimas do sistema celulolítico pelo fungo *Tricoderma reesei*. Similarmente, xilanases constitutivas secretadas para o meio degradam parte da xilana em fragmentos de baixamassa molecular como xilose, xilobiose, xilotriose, que penetram na célula, sustentando o crescimento do fungo, agindo como fonte de energia e de carbono e induzindo a expressão de genes de xilanase (BASTAWDE *et al.*, 1992).

Segundo, Wang *et al.* (1992) e Gomes *et al.* (1994), os xilo-oligômeros, liberados a partir da hidrólise da xilana pela ação de xilanases constitutivas, são transportados diretamente para dentro da matriz celular, sendo, em seguida, degradados pela ação da β -xilosidase intracelular, que libera os resíduos de xilose ou estes xilo-oligômeros são hidrolisados a monômeros, durante o seu transporte para dentro da matriz celular, por meio da ação de β -xilosidases presentes no espaço periplasmático (SUBRAMANIYAN & PRENA, 2002).

Diferentes substratos lignocelulósicos induzem a produção de diferentes complexos enzimáticos, já que os substratos apresentam diferenças quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina (SANCHEZ, 2009). Sabugo de milho (SM), palha de arroz (PA), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), farelo de trigo (FT) e outros substratos lignocelulósicos são eficientes para a indução da produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas por fungos, como *Aspergillus awamori*, *T. reesei*, *A. niger*, *Penicillium prupurogenum*, *Humicola grisea* e outros (HALTRICH *et al.*, 1996 DE PAULA *et al.*, 1998; CARVALHO 2003; SANCHEZ, 2009).

Ramani *et al.* (2012) descreveram que resíduos da fábrica de papel foram bons indutores da produção de β -glicosidase pelo fungo *Penicillium funiculosum* NCL1. Posteriormente os autores demonstraram que análise da atividade enzimática quanto ao pH e temperatura em que há maior atividade. Foi o pH entre 4 e 5 e temperatura de 60°C, houve aumento na atividade enzimática quando adicionado os íons Mn^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na^+ e Co^{2+} .

1.5 GÊNERO *ASPERGILLUS*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são descritos como produtores de amilases, pectinases, celulasas, hemicelulasas e outras enzimas. Espécies desse gênero são freqüentemente encontradas em ambientes terrestres e são comumente isoladas do solo e associadas aos restos de plantas (CARROLL & WICKLOW, 1992).

A característica definidora do gênero *Aspergillus* são os esporos parecidos com aspergilus, que é um instrumento utilizado na liturgia da igreja católica para aspergir água benta, nome dado por Michaeli em 1729 (AINSWORTH, 1976). Esta é a característica microscópica mais importante utilizada em taxonomia de *Aspergillus*. Durante a diferenciação micelial, algumas células ampliam-se, desenvolvendo uma parede celular em forma de 'T' ou 'L' estrutura conhecida como "células pé", estas células produzem conidióforos perpendiculares ao eixo da célula. A visualização desta estrutura é uma característica utilizada na classificação morfológica da espécie de *Aspergillus*. Os conidióforos possuem seu ápice em forma de uma clava arredondada, elíptica ou vesícula. O tamanho e arranjo das cabeças conidiais, assim como a cor dos esporos, são importantes características para a identificação da espécie de *Aspergillus* (BENNETT *et al.*, 2010). Observa-se mudanças macroscópicas quando o fungo é cultivado em diferentes meios de cultura assim os taxonomistas definiram o meio padrão chamado Meio Czapek-Dox, no qual utilizam a sacarose como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio para o cultivo deste fungo nas etapas de classificação da espécie (RAPER & FENNELL, 1965).

A taxonomia do gênero *Aspergillus* foi dividida em seções, sendo eles o *Fumigati*, *Circundanti*, *Nigri* e *Flavi*. Dessas, a seção *Nigri*, tem sido estudada por muitos taxonomistas (ABARCA *et al.*, 2004). Mosseray em 1934, descreveu 35 espécies de *Aspergillus* preto, enquanto Raper e Fennell (1965), reduziram o número de espécies dentro desse grupo para 12. Al-Musallam *et al.* (1980) revisaram a taxonomia do grupo *A. niger*, principalmente com base em características morfológicas, auxiliando nos trabalhos de Samson (2004) que cita 15 espécies dentro da seção, sendo o *A. niger* a espécie que é mais frequentemente relatada, e que tem sido muitas vezes incluídas em processos biotecnológicos. Dentre as espécies da seção *Nigri* estão: *A. aculeatus*; *A. brasiliensis*; *A. carbonarius*; *A. costaricensis*; *A. ellipticus*; *A. foetidus*; *A. heteromorphus*; *A. homomorphus*; *A. japonicus*; *A. lacticoffeatus*; *A. piperis*; *A. sclerotium*; *A. turbingensis*; *A. vadensis* e *A. niger*. No entanto, os conceitos de

espécies estão incertos e, ocasionalmente, o nome de *A. niger* tem sido utilizado para qualquer membro da seção.

Estudos taxonômicos utilizando métodos moleculares estão disponíveis para a identificação e tipagem molecular de espécies de *Aspergillus* (POLONELLI, 1985; DEAN, 2005). A identificação molecular tem sido realizada com o sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacers) do RNA ribossomal que são regiões conservadas do DNA capazes de auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies (Balajee *et al.* 2009).

Samson *et al.* (2007) citaram que além da região ITS é necessário o seu sequenciamento de outras seqüências do DNA para a identificação de *Aspergillus*, como os genes da calmodulina e β -tubulina. Varga *et al.* (2007) identificaram uma nova espécie de *Aspergillus* com base no sequenciamento da seqüência ITS e dos genes da calmodulina e β -tubulina, além da caracterização morfológica e análise de metabólitos secundários.

1.6 PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO *Aspergillus niger*

As espécies de *Aspergillus* são conhecidas por usarem uma vasta gama de substratos lignocelulósicos para a produção de celulases (LOCKINGTON *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2008). Bansal *et al.* (2012) obtiveram alta produtividade de enzimas degradadoras de celulose, por fermentação sólida utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, utilizando o fungo *A. niger* NS2. Pal *et al.* (2011) utilizando o fungo *Aspergillus niger* DFR-5 obteve êxito na produção de xilanase, utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono.

Shinghania *et al.* (2011) analisaram a produção de β -glicosidase pelo fungo *A. niger* NII-08121 cultivado em meio contendo diferentes substratos como de fonte de carbono, sendo eles o farelo de trigo, palha de arroz, glicose, lactose e celulose, por fermentação submersa por 4 dias. O farelo de trigo foi o melhor indutor da produção de β -glicosidase 1400 U/ml e não se observou a produção da enzima em meio com glicose como substrato. A enzima foi purificada e apresentou temperatura ótima de 70°C e pH ótimo de 5,5.

Cunha *et al.* (2012) utilizaram em seu trabalho o fungo *A. niger* para a produção de CMCase e xilanases, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar, os autores obtiveram uma produção de 1,36 U/ml de CMCase e 16,8 U/ml de xilanase.

Essas enzimas foram produzidas sob fermentação submersa em pH 5 na temperatura de 32°C sob agitação de 200 rpm por 30 horas.

Gomatchi *et al.* (2012) analisaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de CMCase pelo fungo *A. flavus* por fermentação submersa. Os melhores resultados foram obtidos utilizando farelo de trigo na concentração de 3% e peptona na concentração de 1% e o pH em que houve maior produção dessa enzima foi o pH 6.

Fang *et al.* (2010) analisaram a produção β -glicosidase e FPase pelos fungos *A. niger* e *T. reesei* por fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a palha de milho. O pico de produção da β -glicosidase foi observado após 7 dias de cultivo pelo fungo *A. niger* (1,4 U/mL) e após 6 dias de cultivo pelo *T. reesei* (0,3 U/mL). O pico de produção de FPase pelo *A. Níger* foi observado após 2 dias de cultivo (0,25 U/ml) e após 5 dias de cultivo do *T. reesei* (2,5 U/ml).

Xu *et al.* (2008) observaram que vários tipos e teores de fontes de nitrogênio na composição do meio de indução para a produção de xilanase pelo fungo *A. niger* XY-1, com objetivo de conhecer qual o tipo e o teor dessa fonte que aumenta a produção dessa enzima e concluiu que há maior produção com 4% de NaNO_3 , que é uma fonte inorgânica de nitrogênio, quando utilizou uma forma orgânica de nitrogênio (extrato de levedura) foi necessária a adição de 30% dessa fonte para obter o mesmo resultado de quando foi colocado 4% da fonte inorgânica. Pal *et al.* (2011) verificaram produção de xilanase pelo fungo *A. niger* DFR-5 utilizando o substrato farelo de trigo, obtendo a produção de 37,84 U/mL em pH 5 e temperatura de 37°C no tempo de 6 dias.

Hamza *et al.* (2012) compararam os fungos *A. niger*, *Trichoderma atroviride* e *Trametes trogii* em relação a produção de β -glicosidase, sendo o fungo *A. niger* o maior produtor dessa enzima. Os autores também analisaram a influência da fonte de carbono e fonte de nitrogênio, pH e temperatura na produção da enzima pelo *A. niger* e observaram que as melhores condições foram: farelo de trigo como fonte de carbono, peptona como fonte de nitrogênio, pH 4 e temperatura de 30° C.

Liu *et al.* (2011) testaram vários tipos de substratos e fontes de nitrogênio, para verificarem em qual há maior produção de celulase pelo fungo *A. fumigatus* Z5, sendo que a palha de milho e a peptona foram escolhidos por induzirem a maior produção dessas enzimas, essas enzimas foram submetidas a análises de atividade enzimática quanto a estabilidade de pH, termoestabilidade e zimograma. Liu *et al.* (2012) utilizando a enzima β -glicosidase produzida pelo fungo *A. fumigatus* Z5, analisaram o

aumento ou a inibição da atividade enzimática com adição de íons e de EDTA, obtendo como resultado a inibição da atividade enzimática com os íons Co^{2+} , Mn^{2+} e EDTA, porém aumentou essa atividade com o uso dos íons NH_4 , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} e Na^+ .

Matkar *et al.* (2013) avaliaram a produção de celulase pelo fungo *Aspergillus sydowii* utilizando celulose como fonte de carbono em pH de 5,5 a 120 rpm na temperatura de 40° C por 6 dias, obtendo a produção de 1,32 U/mL de endoglicanase, 3,99 U/mL de exoglicanase e 9,24 U/mL de β -glicosidase.

Riou *et al.* (1998) verificaram a produção de β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus oryzae* em vários tipos de substratos e analisaram a atividade enzimática em varias faixas de pHs e temperaturas assim como a sua estabilidade nos pHs e nas temperaturas analisadas, obtendo como resultado uma maior produção dessa enzima quando utilizaram o substrato celobiose como fonte de carbono produzindo 1,33 U/mL, quanto ao pH e temperatura em que a enzima teve maior atividade foram o pH 5 e a temperatura de 50° C.

Nair *et al.* (2008) utilizaram várias cepas de fungos para a produção de xilanase e CMCase, dentre esses fungos 10 eram *A. niger* que produziram em média 32,4 U/mL de xilanase e 1,81 U/mL de CMCase utilizando o farelo de trigo como substrato. Farinas *et al.* (2010) utilizando o mesmo substrato e a mesma espécie de fungo para a produção de celulase e xilanase, analisaram a atividade enzimática quanto ao pH e temperatura em ocorre a maior atividade enzimática, assim como a estabilidade do pH e a termoestabilidade dessas enzimas, obtiveram as maiores atividade nas temperaturas entre 35 e 60°C e no pH entre 4 e 5,5. Dhillon *et al.* (2012) utilizaram como substrato bagaço de maçã como fonte de carbono a produção de exo e endoglicanase pelo fungo *A.niger* NRRL-567, as enzimas obtendo como resultado uma maior atividade enzimática nos pHs entre 4,8 e 5,5. Ncube *et al.* (2012) analisaram a produção de CMCase e xilanase pelo fungo *A.niger* FGSCA733 utilizando a torta de semente de pinhão manso (*Jatropha curcas*) e verificaram, através de zimograma, seis tipos de celulasas com as massas moleculares variando entre 20 a 43 kDa e apenas uma xilanase com massa molecular de 31 kDa.

1.7 APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILANASES E CELULASES

As hidrolases compreendem, aproximadamente, 75% do total de enzimas comercializadas, incluindo celulasas, amilases e hemicelulasas, constituindo o segundo

maior grupo, após as proteases. As endoxilanases constituem as principais hemicelulases comerciais, atraindo atenção devido ao seu potencial para uso em diversas aplicações, cobrindo os três setores do mercado de enzimas industriais: têxtil, alimentício e rações para animais (BHAT *et al.*, 2000). Outras aplicações, menos documentadas, incluem: fermentação da cerveja; extração de café e preparação de café solúvel; detergentes; produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos, para uso como agentes antimicrobianos ou antioxidantes (WONG *et al.*, 1988; RYTTERSGAARD *et al.*, 2002; TIKHOMOROV *et al.*, 2003; KAMAL *et al.*, 2004; KATAPODIS *et al.*, 2006).

A utilização de enzimas em rações animais é um setor de relevante importância no agronegócio, sendo que as xilanases, usadas juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases degradam a porção de arabinoxilana presente na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (POLIZELI *et al.*, 2005).

Na indústria têxtil, as xilanases livre de celulases podem ser utilizadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas para a produção de tecidos como a viscose “rayon”. Nestes processos, as enzimas são usadas com o objetivo de facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e remoção da lignina (MILAGRES & PRADE, 1994). As celulases são empregadas nas fases de fiação, tingimento e acabamento dos tecidos para a redução das pilosidades, remoção do excesso de tinta e melhoramento das características da aparência e da maciez do jeans (DILLON *et al.*, 2004).

Uma das principais aplicações das endoxilanases está na indústria de papel e de celulose, na etapa de branqueamento da polpa da celulose para produção de papel (VIIKARI *et al.*, 1994). Na etapa de branqueamento, a lignina residual presente na polpa é responsável pela coloração parda da polpa e é retirada com o uso de cloro, o que leva a produção de efluentes ricos em organoclorados e com elevada toxicidade. O emprego de xilanases na etapa de branqueamento ajuda na retirada da lignina residual e resulta na diminuição da carga de cloro utilizada.

O uso das xilanases foi introduzido na indústria da panificação nos anos 70 (KULP, 1968), para o preparo de massa com o aumento de 14-60 % no volume específico, em comparação com pães não suplementados (GRUPPEN *et al.*, 1993; CAMACHO & AGUILAR, 2003; SHAH *et al.*, 2006).

Resíduos de xilose, produtos da hidrólise da xilana, podem ser fermentados por leveduras como *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para a produção de etanol ou xilitol.

O xilitol é um poliálcool com poder adoçante comparável com a sacarose, utilizado como adoçante não cancerígeno, recomendável para diabéticos e indivíduos obesos (POLIZELI *et al.*, 2005).

As celulasas, assim como as xilanases, possuem um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregadas nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil e de detergentes, na reciclagem de papel, além da possibilidade de aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol (BHAT *et al.*, 2000).

Outro grande potencial biotecnológico das celulasas consiste no processo de reciclagem de papel, onde conseguem remover, com eficácia, partículas de tinta aderidas à superfície das fibras e favorecendo a alvura do papel (BHAT *et al.*, 2000).

A sacarificação de resíduos lignocelulósicos por celulasas, com a posterior produção de etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico, representa uma busca incessante por pesquisadores de vários países do mundo, no sentido de encontrar novas fontes alternativas aos combustíveis fósseis. A utilização ou reutilização da biomassa vegetal, além de reduzir a emissão de CO₂ na atmosfera, agrega valor à matéria e contribui para reduzir o impacto ambiental ocasionado pelo acúmulo de resíduos lignocelulósicos, gerados anualmente (PANDEY *et al.*, 2000; LIN & TANAKA, 2006). A conversão da celulose a etanol compreende as etapas de sacarificação e fermentação dos açúcares liberados. Na sacarificação ocorre a hidrólise dos polissacarídeos que pode ser por via ácida ou enzimática e posteriormente os açúcares liberados são fermentados por leveduras. A hidrólise ácida é bem conhecida, porém apresenta muitas desvantagens, como a geração de inibidores da fermentação por leveduras e a difícil recuperação dos açúcares liberados. A hidrólise enzimática é o método mais eficiente e que não gera inibidores, sendo que seu processo está em pleno desenvolvimento e pode contribuir na utilização da biomassa (SANTOS, *et al.*, 2012).

1.8 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SOLO PRODUTORES DE CELULASES E XILANASES

Na natureza existe uma grande variedade de microrganismos que produzem enzimas do sistema celulolítico (celulasas) e xilanolítico (xilanases), dentre eles algumas bactérias e fungos. Alguns exemplos de bactérias são *Leuconostoc mesenteroides* (COULON, *et al.*, 1998), *Cellulomonas biazotea* (LAU, *et al.*, 2001) e *Streptomyces* sp. (SHI, *et al.*, 2010) e *Clostridium thermocellum* (JOHNSON *et al.*, 1998). Alguns exemplos de fungos são dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e

Trichoderma (DELABONA, *et al.*, 2012a). A produção e secreção de enzimas celulolíticas, por fungos, são bem superiores às das bactérias, segundo Knowles *et al.* (1987).

Eubactérias e fungos isolados de biotas onde se acumulam resíduos de celulose têm sido caracterizados como produtores de celulasas e xilanases. Microrganismos produtores de celulasas e xilanases têm sido isolados do solo e resíduos lignocelulósicos (MCDONALD, *et al.*, 2012). No solo há uma grande diversidade de microrganismos, assim como de compostos orgânicos que são fonte de carbono para tais organismos. Para a utilização desses compostos, as espécies de microrganismos sintetizam e secretam diversas enzimas. A prospecção de espécies microbianas do solo, produtoras de enzimas é muito utilizada pelas indústrias, para a seleção de novas linhagens industriais. (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina, sobremaneira, a ocorrência e a distribuição desses organismos. O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos, tornando-se importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (BAYER & LAMED, 1992).

A seleção de microrganismos celulolíticos pode ser realizada empregando o experimento de atividade em placa, onde os microrganismos são cultivados em placas contendo meio suplementado com celulose e o halo de hidrólise denota a produção de celulasas extracelulares pelo microorganismo (MCDONALD, *et al.*, 2012). Microrganismos celulolíticos apresentam estratégias diferentes para a hidrólise da celulose, sendo importante a escolha do tipo de celulose que será adicionada ao meio de cultura, celulose insolúvel (papel de filtro ou celulose microcristalina -Avicel) ou solúvel (carboximetil celulase - CMC). O papel de filtro, utilizado para determinação de FPase, é composto em sua maior parte de celulose microcristalina e em menor parte de celulose amorfa, essa celulose microcristalina é o mesmo tipo de celulose encontrado na celulose microcristalina -Avicel (MCDONALD, *et al.*, 2012; MANN, 1968; HUNGATE, 1950). Delabona *et al.* (2012a) utilizaram essa técnica para o isolamento e seleção de fungos produtores de celulasas da floresta amazônica, selecionando 46 fungos dos 110 analisados quanto a presença ou ausência do halo de hidrólise de

celulose. Dos 46 apenas 10 fungos, que apresentaram os maiores índices de produção de celulasas continuaram em seu experimento, sendo estes submetidos à fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. O fungo *Aspergillus fumigatus* P40M2 produziu 43,65 U/g de endoglucanase que atuam em pH 5,0 na temperatura de 37° C (DELABONA, *et al.*, 2012a e 2012b).

Uma boa estratégia para a produção de celulasas é a seleção de microrganismos, que apresentem uma elevada taxa de produção dessas enzimas, sendo o fungo *Aspergillus niger* conhecido como um bom produtor de enzimas que hidrolisam a biomassa lignocelulósica (KAUR *et al.*, 2012), inclusive, da produção da enzima β -glicosidase, necessária para que a hidrólise da celulose seja completa (BRIJWANI *et al.*, 2010).

Com base nos inúmeros dados, acima citados, sobre fungos produtores de celulasas e xilanases provenientes do solo, a busca por espécies fúngicas em solo do Cerrado mostra-se promissora, sendo que esse solo tem característica ácida, o que propicia o crescimento de fungo na rizosfera, (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), cuja fonte de carbono para o seu desenvolvimento são restos de material lignocelulósicos o que indica que são produtores de enzimas que degradam esse tipo de material. Desta forma estes fungos podem ser isolados e estudados quanto à produção dessas enzimas, verificando qual espécie produz em maior quantidade, em que meio e substrato são os mais propícios para estimular a indução da produção dessas enzimas, sendo esse o estudo realizado no presente trabalho. A ausência de literatura a respeito de fungos isolados no Bioma Cerrado para a produção de celulasas e xilanases justifica esse trabalho.

2.OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a produção de celulasas e xilanases por fungos isolados de solo do Bioma Cerrado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os fungos produtores de celulasas pela metodologia de atividade em placa;
- Analisar a produção de xilanases e celulasas pelos fungos cultivados por fermentação submersa em meio contendo bagaço de cana de açúcar (BCA), carboximetilcelulose (CMC) e farelo de trigo (FT);
- Avaliar a cinética da produção de celulasas e xilanases por fermentação submersa pelo fungo selecionado.
- Analisar as celulasas e xilanases secretadas pelo fungo selecionado quanto ao pH e temperaturas ideais e estabilidade em diferentes faixas de temperatura e pH;
- Analisar o perfil de proteínas presentes no sobrenadante de cultura por SDS-PAGE e por Zimograma;
- Identificação taxonômica do isolado selecionado com base no sequenciamento de região do DNA ribossomal e análise morfológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Neste trabalho foram utilizadas onze linhagens de fungos isolados do solo do Cerrado. Estas linhagens pertencem ao banco de germoplasma do Instituto de Fosfatado Biológico - Goiânia – Goiás.

3.2 MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS FUNGOS

Os fungos foram mantidos em meio Agar Aveia (AA). Para a produção de esporos os fungos foram semeados em meio AA e incubados por quatro dias à 40°C. Os esporos foram ressuspensos em solução salina 0,15 M com 0,1% de Tween 20 e contados em câmara de Neubauer.

3.3 SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Para a indução da produção de enzimas, os fungos foram cultivados em meio mínimo (MM) suplementado com bagaço de cana-de-açúcar (BCA), carboximetilcelulose (CMC - Sigma) e farelo de trigo (FT).

3.4 PREPARO DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

O BCA e o FT foram inicialmente lavados em água deionizada por 5 minutos, após esse tempo, descartou o sobrenadante e colocou novamente água deionizada, esse procedimento foi repetido por dez vezes, sendo mantido submerso em água deionizada por 16 horas. Para a secagem do substrato, este foi mantido à 60 °C por 3 horas, sendo revirado a cada hora. O substrato foi moído em moinho de facas e peneirado para 20 *mesh*.

3.5 MEIOS DE CULTURA

3.5.1 MEIO ÁGAR AVEIA – AA

Farinha de aveia infantil (Quaker)	4,0%(p/v)
Ágar	1,5%(p/v)

3.5.2 MEIO MÍNIMO – MM (PONTECORVO *et al.*, 1953) MODIFICADO

NaNO ₃	0,6%(p/v)
KCl	0,05%(p/v)
KH ₂ PO ₄	0,15% (p/v)
ZnSO ₄	0,001%(p/v)
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,001%(p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25%(p/v)
Extrato de levedura	0,25%(p/v)
Fonte de carbono	1%(p/v)

O pH foi acertado para 6,8 com solução de NaOH 1M.

3.5.3 MEIO CELULOSE ASPARAGINA ÁGAR – CAA (PARKINSON, 1971)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05%(p/v)
L-asparagina	0,05%(p/v)
KH ₂ PO ₄	0,1%(p/v)
KCl	0,05%(p/v)
MgSO ₄	0,02%(p/v)
CaCl ₂	0,01%(p/v)
Extrato de levedura	0,05%(p/v)
Ágar	2%(p/v)
Água destilada	q.s.p.

As fontes de carbono utilizadas foram: Celulose microcristalina – (Avicel) e CMC a 1% (p/v).

3.5.4 MEIO CZAPEK (TUIE, 1969)

NaNO ₃	0,3%(p/v)
K ₂ HPO ₄	0,1%(p/v)
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,05%(p/v)

KCl	0,05%(p/v)
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,001%(p/v)
Ágar	1,5%(p/v)
Água destilada	q.s.p.

As fontes de carbono utilizadas foram: Celulose microcristalina (Avicel) e CMC a 1% (p/v).

3.5.5 MEIO EXTRATO DE MALTE – MEA (SAMSON & FRISVAD, 2004)

Peptona	0,078%(p/v)
Maltose	1,275%(p/v)
Dextrose	0,275%(p/v)
Ágar	1,5%(p/v)
Água destilada	q.s.p.

Dois meios de cultura foram utilizados para a caracterização taxonômica, sendo eles o meio Czapek com extrato de levedura (CYA) (Pitt, 1988) e o meio ágar extrato de malte (MEA)(Samson & Frisvad, 2004).

3.6 SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Na dosagem da atividade xilanolítica, foi utilizada a xilana “beechwood” (xilana obtido de madeira de faia - Sigma®); na dosagem da atividade celulolítica foram utilizados os seguintes substratos: carboximetilcelulose (CMC de baixa viscosidade – Sigma®), celulose microcristalina (Avicel - Sigmacell – Sigma®), papel de filtro Whatman nº1 e pNP-β-D- glicopiranosídeo - Sigma®.

3.7 SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água deionizada, quando necessário foram esterilizadas por autoclavação (120°C, 1 atm, 20 minutos). As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia na qual foram empregadas.

3.7.1 SOLUÇÕES PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.7.1.1 SOLUÇÃO DE ÁCIDO DINITROSALICÍLICO - ADNS

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	0,75%(p/v)
NaOH	1,4%(p/v)
Tartarato de Sódio e Potássio	21,6%(p/v)
Fenol	0,54%(v/v)
Metabissulfito de Sódio	0,58%(p/v)

3.7.1.2 TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO 0,05 M

	pH				
	3,0	4,0	4,8	5,0	5,5
Acido citrico 0,1 M (mL)	46,4	33	23	20,4	14,8
CitratoTrissódico 0,1 M (mL)	3,6	17	27	29,6	35,2
Água destilada (q.s.p) (mL)	100	100	100	100	100

3.7.1.3 TAMPÃO FOSFATO 0,05 M

	pH			
	6,0	6,5	7,0	7,4
Fosfato de Sódio monobásico 0,2M (mL)	43,8	34,2	19,5	9,5
Fosfato de Sódio dibásico 0,2M (mL)	6,2	15,8	30,5	40,5
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100	100	100

3.7.1.4 TAMPÃO TRIS-HCL 0,05M

	pH	
	7,7	8,2
Triz 0,2 M (hidroximetil) aminometano (mL)	25	25
HCl 0,2 M (mL)	18,8	11
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100

3.7.1.5 TAMPÃO CARBONATO 0,05 M

	pH		
	9,2	10,2	10,9
Carbonato de Sódio 0,2 M (mL)	4,0	28,5	44,5
Bicarbonato de Sódio 0,2 M (mL)	46,0	21,5	5,5
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100	100

3.7.1.6 SOLUÇÃO DE XILANA “BEECHWOOD” 1% (p/v)

A xilana “beechwood” foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 após aquecimento da solução em micro-ondas durante 1 minuto, agitação manual e repouso durante 1 minuto. Este procedimento foi repetido três vezes e após, a solução foi submetida à centrifugação a 4.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20°C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

3.7.1.7 XILOSE

Xilose 0,42%(p/v)

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8.

3.7.1.8 SOLUÇÃO DE CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)

CMC 4%(p/v)

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, sendo aquecida no microondas até solubilização completa do soluto

3.7.1.9 SOLUÇÃO DE AVICEL

Avicel 1,0%(p/v)

A solução foi preparada, no momento do uso, com água destilada sob agitação.

3.7.1.10 SOLUÇÃO pNP-β-D- GLICOPIRANOSIDEO

pNP-β-D- glicopiranosideo 15 mM

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, no momento do uso.

3.8 SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLITICAS POR ATIVIDADE EM PLACA

Os fungos foram selecionados quanto a produção de celulasas utilizando o protocolo de atividade em placa, segundo Teather & Wood (1982). Os fungos foram inoculados em placas, contendo os meios Czapek, CAA e MM, utilizando como fonte de carbono 1% de CMC ou AVICEL, e mantidos por 3 dias a 40°C. Cortes do meio, com 1 cm de circunferência, contendo o micélio foram transferidos para outras placas, contendo o mesmo meio de cultura, e incubados a 40°C por 3 dias. Para revelar os halos de atividade enzimática, as placas foram sobrepostas com a solução de vermelho do Congo 1%, agitadas por 10 minutos. Após este período, a solução de vermelho do Congo foi descartada e as placas foram lavadas com solução de NaCl 1 M, sendo que após a terceira lavagem foi adicionado HCl 0,1M, para a revelação do halo, e lavado novamente com NaCl 1M. A placa foi mantida com essa solução até a marcação do halo. A atividade enzimática foi visualizada como um halo claro ao redor da cultura. O índice de produção de celulasas foi calculado, dividindo-se a circunferência do halo de hidrólise pela circunferência do micélio. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.9 PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR FUNGOS CULTIVADOS EM DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Para a produção de enzimas, 4×10^6 esporos/mL foram inoculados em 100 mL de meio mínimo, acrescido de 1% de CMC, BCA ou FT. O cultivo foi a 40°C, sob agitação de 170 rpm pelo período de 6 dias.

Para a análise da cinética de produção das enzimas, foram retiradas alíquotas a cada 24 horas e submetidas à centrifugação a 4.000 g por 10 minutos. O sobrenadante de cultura coletado foi analisado quanto a atividade celulolítica e xilanolítica pela metodologia do ADNS e a atividade de β -glicosidase pela metodologia pNP- β -D-glicopiranosideo.

3.10 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES XILANOLÍTICA E CELULOLÍTICA PELO MÉTODO DOS AÇÚCARES REDUTORES (MILLER, 1959)

As atividades enzimáticas de xilanase, celulase total (FPase), endoglicanase (CMCase), celobiohidrolase (Avicelase) foram avaliadas, segundo metodologia proposta por Miller (1959). O teor de açúcares redutores, liberados na reação

enzimática, foi quantificado pelo método do ADNS. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera um μmol do açúcar redutor correspondente, por minuto, nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática dos experimentos foram realizados em triplicata.

A dosagem da atividade de xilanase foi realizado, utilizando como substrato a “beechwood” 1% (Sigma)(p/v). Adicionou-se 50 μL da amostra em 450 μL do substrato seguindo-se incubação à 50°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 750 μL de DNS, as amostras foram fervidas, por 5 minutos, e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas (U). Para a determinação da atividade de xilanase, pelo método de DNS, primeiramente, foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL.

A atividade de celulase total foi determinada pelo uso de papel de filtro Whatman nº1 como substrato e a análise foi denominada como FPase. Nessa análise homogeneiza-se 500 μL de amostra, 500 μL de tampão citrato de sódio pH 4,8 em uma tira de papel de filtro (1 x 6 cm – 50 mg). A solução foi mantida à 50°C por 1 h e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do ADNS, onde foi adicionado 500 μL de ADNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A atividade de endoglicanase foi determinada pelo uso de CMC 1% como substrato e a análise foi denominada como CMCase. Nessa análise homogeneiza-se 250 μL de amostra e 250 μL da solução de CMC 4%. A solução foi mantida a 50°C por 1 hora e em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 500 μL de ADNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e realizada a leitura espectrofotométrica a 540nm.

A atividade de celobiohidrolase foi determinado utilizando Avicel 1% como substrato e a análise foi denominada como Avicelase. Nesse ensaio homogeneiza-se 250 μL de amostra e 500 μL da solução de Avicel 1%. A solução foi mantida à 50°C, por 1 hora, sob agitação constante e a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida à centrifugação a 4.000 g durante 10 minutos. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 μL do sobrenadante foi homogeneizada com 700 μL de ADNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e realizada a leitura espectrofotométrica a 540nm.

A curva padrão para os testes de FPase e CMCase foi estabelecida, utilizando-se glicose nas concentrações de 1-20 μ moles/mL. A curva padrão para o teste de Avicelase foi estabelecida, utilizando glicose nas concentrações de 0,15 a 1,5 mg/mL. As leituras foram plotadas em gráfico (Absorbância X Concentração de glicose), obtendo-se, assim, a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

3.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

A atividade de β -glicosidase foi realizada pelo método de Coston & Loomis (1969), adicionando-se 100 μ L do reagente pNPG (pNP- β -D- glicopiranosideo - Sigma) 15 mM, preparado em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 50 μ L do sobrenadante de cultura. A reação foi incubada por 20 minutos, em seguida, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M para cessar a reação. A leitura foi realizada a 410 nm. A curva padrão foi realizada, utilizando-se p-nitrofenol- cristalino – (Sigma) de 1 a 150 mM.

3.12 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

O efeito do pH na atividade de xilanase e celulase foi determinado incubando os sobrenadantes de cultura em tampões com diferentes valores de pH de 3 a 10,9 e procedido à dosagem enzimática, como descrito no item 3.10 e 3.11.

3.13 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

A temperatura em que há maior atividade foi determinada por meio de incubação dos sobrenadantes de cultura nas temperaturas de 10 a 80°C, com os respectivos substratos e procedido à dosagem enzimática, como descrito nos itens 3.10 e 3.11.

3.14 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA EM DIFERENTES FAIXAS DE pH

A estabilidade da enzima no pH em que há maior atividade, foi determinada incubando os sobrenadantes de cultura, no pH em que há maior atividade, um ponto acima e um ponto abaixo, durante os tempos de 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas. A temperatura de incubação foi a temperatura em que há maior atividade descrita para os ensaios de atividade enzimática com os seus respectivos substratos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade xilanolítica e celulolítica, pelo método de açúcares redutores e de β -glicosidase

3.15 AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE

A termoestabilidade foi determinada incubando a enzima na temperatura em que há maior atividade, 10°C acima e 10°C abaixo, nos tempos de 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas. O pH foi ajustado com tampão, para o pH em que há maior atividade descrita para os ensaios de atividade enzimática com os seus respectivos substratos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade xilanolítica e celulolítica, pelo método de açúcares redutores, utilizando o tampão citrato de sódio 50 mM e pelo ensaio de β -glicosidase.

3.16 INFLUÊNCIA DE ÍONS, EDTA, GLICOSE, XILOSE E CELOBIOSE NA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE.

A influência dos íons e do EDTA na atividade da β -glicosidase foi analisada, utilizando 10mM de cada ion (Mn, NH_4 , K, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na e Co^{2+}) pelo método de Coston & Loomis (1969), na temperatura e pH em que há maior atividade.

A glicose, xilose e celobiose foram colocadas na reação nas concentrações de 10 a 600mM e analisadas pelo método de Coston & Loomis (1969).

3.17 ANÁLISES DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE CULTURA POR SDS-PAGE.

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida, segundo o método descrito por Laemmli (1970). As amostras (0,9mL) a serem analisadas no gel de poliacrilamida foram incubadas com 0,1mL de ácido tricloroacético (TCA), por 1 hora à 4°C, em banho de gelo e água. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação (11.200 g, 10 minutos a 4°C) e o precipitado foi lavado com acetona gelada, seco e ressuspenso em tampão de amostra 2x (0,2M de Tris-HCl pH 6,8; sódio dodecil sulfato (SDS) a 4%; β -mercaptoetanol a 4%; glicerol a 4% e azul de bromofenol a 0,1%). As amostras foram mantidas a 100°C por 5 minutos, para desnaturação e, posteriormente, transferidas para banho de gelo. Para a corrida eletrofóretica, as amostras foram aplicadas em gel separador (13%), tampão de corrida (1x) acrescido de 0,1% de SDS, com voltagem de 200 V, utilizando o sistema de eletroforese vertical. Ao término da corrida eletroforética, as bandas proteicas presentes no gel foram visualizadas após incubação por 18 horas, sob agitação, na solução corante, preparada com Coomassie Blue, seguida pela descoloração, incubando o gel

por 30 minutos, sob agitação, na solução descorante.

3.18 ANÁLISE DO PERFIL DE ENZIMAS SECRETADAS POR ZIMOGRAMA

As análises de Zimograma foram realizadas segundo metodologias descritas por Teather & Wood, 1982 (atividade xilanase) e Takenaka *et al.*, 1999 (atividade celulase), ambas com modificações. As amostras foram, inicialmente dialisadas contra água destilada a 4°C por 24 horas, em sacos de celulose regenerada (INLAB), com porosidade de 25 Å e tamanho de corte de 12 a 16 kDa. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (Liofilizador EC Apparatus - Micro Modulyo), ressuspensas em tampão de amostra 2x, fervidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Para a revelação da atividade xilanolítica, adicionou-se xilana “oat-spelt” a 0,1% na malha do gel separador e, para a revelação da atividade celulolítica, adicionou-se CMC a 0,2%. Ao término da corrida, o gel foi incubado durante 1 h, sob agitação, em solução de Triton X-100 2,5% (atividade xilanolítica) e Triton X-100 1% (atividade celulolítica) e, em seguida, lavado 3 vezes com água destilada e incubado a 50°C, durante 1 hora, em tampão MES 50 mM pH 6 (MES (USB®) pré-aquecido a 50°C, (atividade xilanolítica) e incubado a 50°C, em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, pré-aquecido a 50°C, durante 12 horas, sob agitação (atividade celulolítica). Após a incubação em tampão MES ou em tampão citrato, o gel foi lavado com água destilada, incubado em solução de Vermelho do Congo 0,1%, sob agitação, durante 20 minutos e lavado com NaCl 1 M até o aparecimento dos halos de atividade enzimática. Para uma melhor visualização, adicionou-se HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl. As bandas de atividade xilanolítica e celulolítica foram visualizadas como bandas de atividade no gel.

3.19 MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS

Foi utilizado o kit de calibração para eletroforese, de baixa massa molecular – Amersham™ AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare).

97,0 kDa – Fosforilase B – músculo de coelho

66,0 kDa – Soroalbumina bovina

45,0 kDa – Ovoalbumina – ovo branco

30,0 kDa – Anidrase carbônica – eritrócitos bovinos

20,1 kDa – Inibidor de tripsina - soja

14,4 kDa – α-Lactoalbumina – leite bovino

3.20 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A identificação taxonômica do isolado IFBMD01 foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas-CPQBA, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. A metodologia empregada foi a análise morfológica e molecular, sendo que na análise morfológica o fungo foi cultivado em meio de cultura MEA e CYA, à 28°C por 7 dias e submetido a montagem a fresco em lactofenol azul de metileno.

A análise molecular se baseou na amplificação da região ITS por PCR, utilizando como molde o DNA genômico do fungo e os primers ITS-1 e ITS-4 para as regiões ITS1-5.8S-ITS2 da amostra. Os fragmentos amplificados foram sequenciados (ABI3500XL SERIES - Applied Biosystem) com os primers ITS-1 e ITS-4. As sequências parciais da região ITS obtidas com os diferentes primers foram montadas em um contig e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas, utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson, 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas, utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura, 2007).

As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo Kimura (1980) e a árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados, a partir de 1000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLITICAS POR ATIVIDADE EM PLACA

Neste trabalho foram analisados onze isolados de fungos, que pertencem ao Instituto de Fosfato Biológico e foram cedidos apenas para a realização deste estudo. Esses fungos foram isolados em material lignocelulósicos da rizosfera do solo do Cerrado. Os fungos foram cultivados, pelo período de 3 dias a 40°C, nos meios: MM, CAA e CZ contendo 1% de CMC ou Avicel como fonte de carbono. As celulasas extracelulares foram detectadas pela formação de halo de hidrólise. A formação de halos em meios sólidos com CMC ou Avicel, resulta da quebra do CMC ou Avicel em fragmentos menores aos quais o vermelho Congo não se liga, sendo assim, as placas são lavadas com NaCl 1 M, o vermelho Congo é arrastado das regiões onde ocorreram a degradação da celulose (WOODWARD&WISEMAN, 1982).

O índice de produção de celulasas foi calculado dividindo diâmetro do halo de hidrólise formado pelo diâmetro da colônia (FURLANETO, 1989).

Na figura 06, pode-se observar um exemplo do halo de hidrólise dos fungos cultivados em MM, CAA ou CZ, utilizando como fonte de carbono Avicel ou CMC.

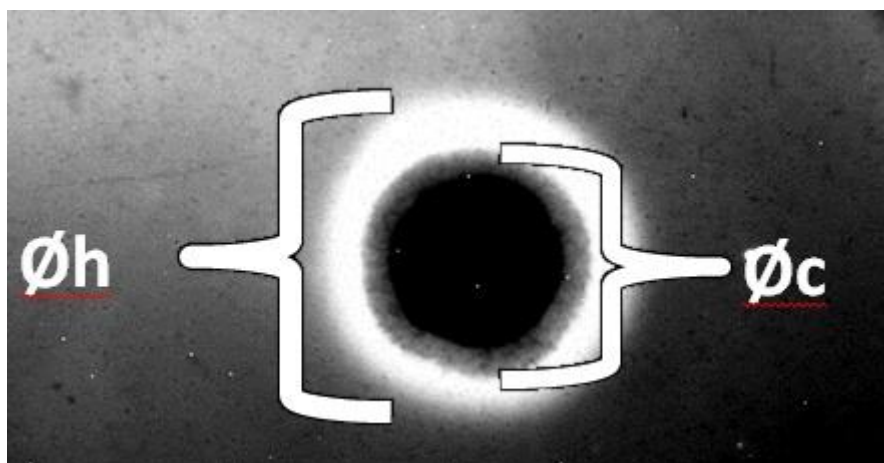


Figura 06 – Imagem representativa de uma placa contendo os meios sólidos, MM, CAA ou CZ, com CMC ou Avicel no experimento de atividade em placa.

Na Tabela 01, observa-se os valores dos índices de produção de celulasas pelos isolados analisados, denominados inicialmente como MD 01, MD 02, MD 03, MD 04, MD 05, MD 06, MD 07, MD 08, MD 09, MD 10 e MD 11. O delineamento

experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade. Dentre estes isolados, foram selecionados quatro, utilizando como critério de escolha: diferença significativa na análise de variância quando comparadas pelo teste de Tukey, índice de hidrólise próximo e/ou acima de 2 e número de placas com índice acima de 2,5.

A seleção de fungos em placas mostrou-se eficiente para Delabona *et al* (2012a), que utilizaram o meio CZ e Avicel como fonte de carbono, selecionando 46 fungos dos 110 analisados quanto a presença ou ausência do halo de hidrólise de celulose. Dos 46 apenas os 10 fungos que apresentaram o maior índice de hidrólise, continuaram em seu experimento, sendo estes submetidos à fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar dentre estes 10 fungos, quais produziram maior quantidade de endoglicanase. O fungo escolhido foi identificado como *Aspergillus fumigatus* P40M2, que produziu 43,65 U/g dessa enzima. Estes autores também analisaram qual pH e temperatura a endoglicanase apresentou maior atividade e realizaram o zimograma.

No presente trabalho os meios de cultura utilizados diferem entre si, principalmente, pelos teores de nitrogênio, tanto orgânico quanto inorgânico. No meio CAA, (item 3.5.3), o teor de nitrogênio orgânico é de 0,1% e inorgânico de 0,05%, dando um total de 0,15%; no meio CZ (item 3.5.4), há somente o nitrogênio inorgânico com 0,3% no total; o meio MM (item 3.5.2) possui 0,85% de nitrogênio inorgânico e 0,25% de nitrogênio orgânico, com o total de 1,1% de fonte de nitrogênio. Essa diferença nos teores de nitrogênio, influência no desenvolvimento do microrganismo, isso foi observado por Xu *et al.* (2008), em seu estudo analisaram várias fontes de nitrogênio e em várias concentrações, obtiveram a maior produção de enzimas quando utilizaram 4% de NaNO₃ (nitrogênio inorgânico), quando foi utilizada uma fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura), foi necessário elevar para 30% para obter a mesma quantidade de enzima, portanto, o nitrogênio na forma inorgânica, mostrou-se mais eficiente para esses autores, assim como para Steward & Parry (1981), já para Gomathi *et al.* (2012) e Hamza *et al.* (2012) foi na presença do nitrogênio orgânico que ocorreu maior produção de enzima celulolítica.

Na figura 06 e Tabela 01 observa-se a produção de celulasas pelos isolados MD cultivados nos meios MM, CAA e CZ contendo CMC como fonte de carbono, a produção de celulasas foi maior no meio MM, que contém 1,1% de nitrogênio, e menor

no meio CAA com apenas 0,15% de nitrogênio. Segundo Kiehl (1985) os microrganismos absorvem os elementos carbono e nitrogênio em uma proporção de trinta partes de carbono para cada parte de nitrogênio, o carbono é utilizado como fonte de energia, sendo dez partes incorporadas ao protoplasma celular e vinte partes eliminadas como gás carbônico; o nitrogênio é assimilado para síntese molecular na proporção de dez partes de carbono para uma de nitrogênio, nessa linha de pensamento no meio CAA a relação carbono/nitrogênio (C/N) é de 6,6 (ou seja, 6,6 partes de carbono para cada parte de nitrogênio), no meio CZ a relação C/N é de 3,3 e no meio MM é de 0,9. Possivelmente, se os meios de cultura CAA e CZ tivessem um teor de nitrogênio maior, diminuindo a relação C/N os resultados seriam de uma maior produção de celulases, ficando esse ponto para análise em uma futura perspectiva.

Nas figuras 07 e 08, podemos observar os valores dos índices de produção de celulases pelos isolados: MD 01, MD 02, MD 03, MD 04, MD 05, MD 06, MD 07, MD 08, MD 09, MD 10 e MD 11. Observa-se que tanto na figura 6 quanto na figura 07, o meio de cultura em que houve maior produção de enzimas celulolíticas foi o meio MM, sendo este o selecionado para a etapa de indução submersa. No meio Czapek houve halo de hidrólise em nove fungos quando utilizado CMC e com Avicel apenas quatro, o que pode ser explicado pelo fato do CMC ser solúvel em água e mais susceptível a hidrólise por celulase do que o Avicel que se encontra em estado de celulose microcristalina, insolúvel em água dificultando a ação de algumas enzimas celulolíticas (MCDONALD *et al*, 2012). Os isolados MD 01, MD 03, MD 04 e MD 08 apresentaram índice de produção de celulases próximo e/ou acima de dois e foram selecionados para a análise de produção de celulases por fermentação submersa, sendo que esses apresentaram diferenças significativas em relação aos outros sete isolados.

Tabela 01. Comparação entre os microrganismos em relação aos diferentes tipos de meios de cultura e fonte de carbono, quanto ao índice de produção celulase pela metodologia de atividade em placa.

	MD01	MD02	MD03	MD04	MD05	MD06	MD07	MD08	MD09	MD10	MD11
MM CMC	1,33d*	0a	3,03f	2,03e	1,18c	1,18c	1,14bc	3,03f	1,03b	1,25cd	1,03b
MM AVICEL	1,03b	0a	1,10bc	1,40d	1,25cd	1,25cd	1,22c	2,66e	1,10cd	1,03b	0a
CA CMC	1,12b	0a	1,66e	1,50d	1,21c	1,21c	0	0	1,29c	1,06b	0
CA AVICEL	1,25c	2,03e	1,20c	2,03e	1,03b	1,03b	1,11bc	0	1,03b	1,66d	0
CZ CMC	3,03e	1,50c	3,03e	1,87d	1,40c	1,40c	0	0	1,03b	1,03b	1,16b
CZ AVICEL	0	0	2,50e	1,50c	0	0	0	0	1,35b	1,66d	0

MM: Meio Mínimo; CA: Meio CAA; CZ: Meio Czapek.

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

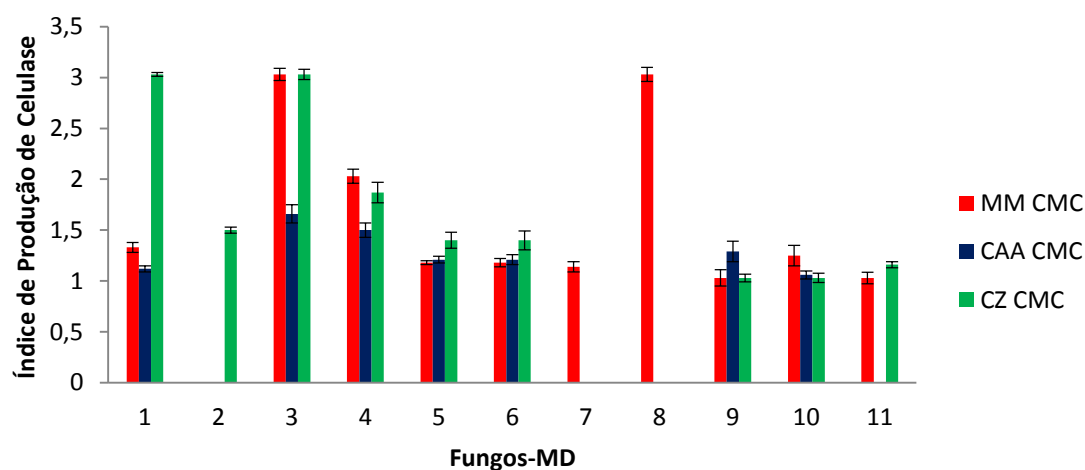


Figura 07. Índice de produção de celulase por fungos do grupo MD cultivados em meio contendo CMC.

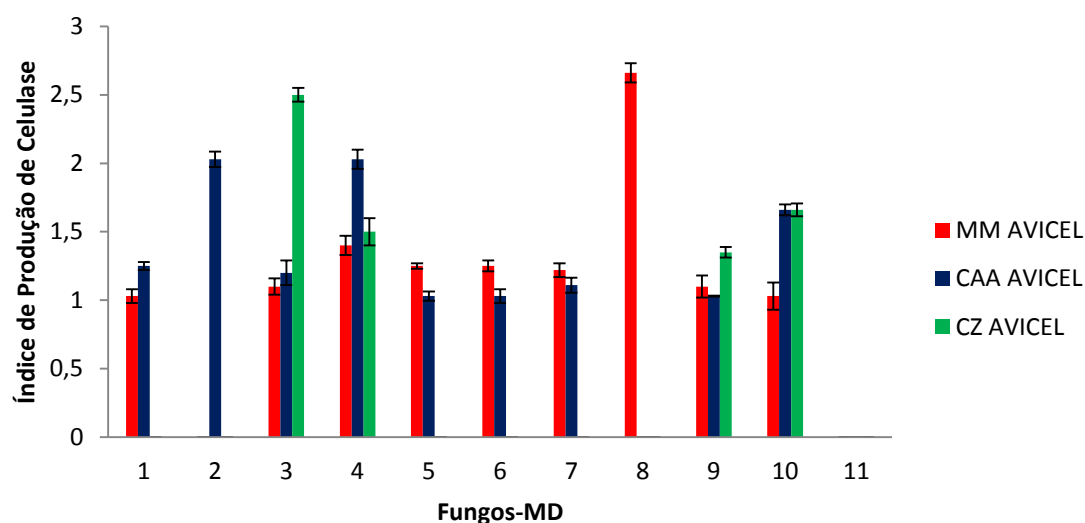


Figura 08. Índice de produção de celulase por fungos do grupo MD cultivados em meio contendo Avicel.

4.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLITICAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Com o objetivo de analisar a produção de celulases pelos isolados MD 01, MD 03, MD 04 e MD 08, estes foram cultivados por fermentação submersa no meio MM contendo 1% de BCA, CMC ou FT como indutores da produção de enzimas celulolíticas. As culturas foram mantidas por 7 dias a 40°C em agitação a 170 rpm.

Na figura 09, pode-se observar a produção das enzimas Avicelase, FPase, xilanase, CMCase e β -glicosidase pelos isolados selecionados nos meios MM com os substratos BCA, FT e CMC. Observa-se que o isolado MD01 se destacou na produção de FPase, xilanase, CMCase e β -glicosidase quando cultivado no meio com FT e o isolado MD08 na produção de Avicelase no meio com CMC. Pode-se observar que houve uma diferença significativa nas produções das enzimas quando o fungo foi cultivado em meio contendo diferentes resíduos. Diferentes resíduos lignocelulósicos induzem a produção de diferentes enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico desde que apresentem diferentes composições de celulose, além de diferentes tipos de hemicelulose, segundo Sanchez (2009), na Tabela 02, observa-se a composição de alguns desses resíduos.

Em função desses resultados, escolheu-se o microrganismo MD 01 e o substrato FT, para a continuidade do trabalho. Semelhantemente, Hamza *et al.*(2012), Shinghania *et al.* (2011) e Wang *et al.*(2011) também optaram pelo substrato farelo de trigo para indução da produção destas enzimas por *A.niger*.

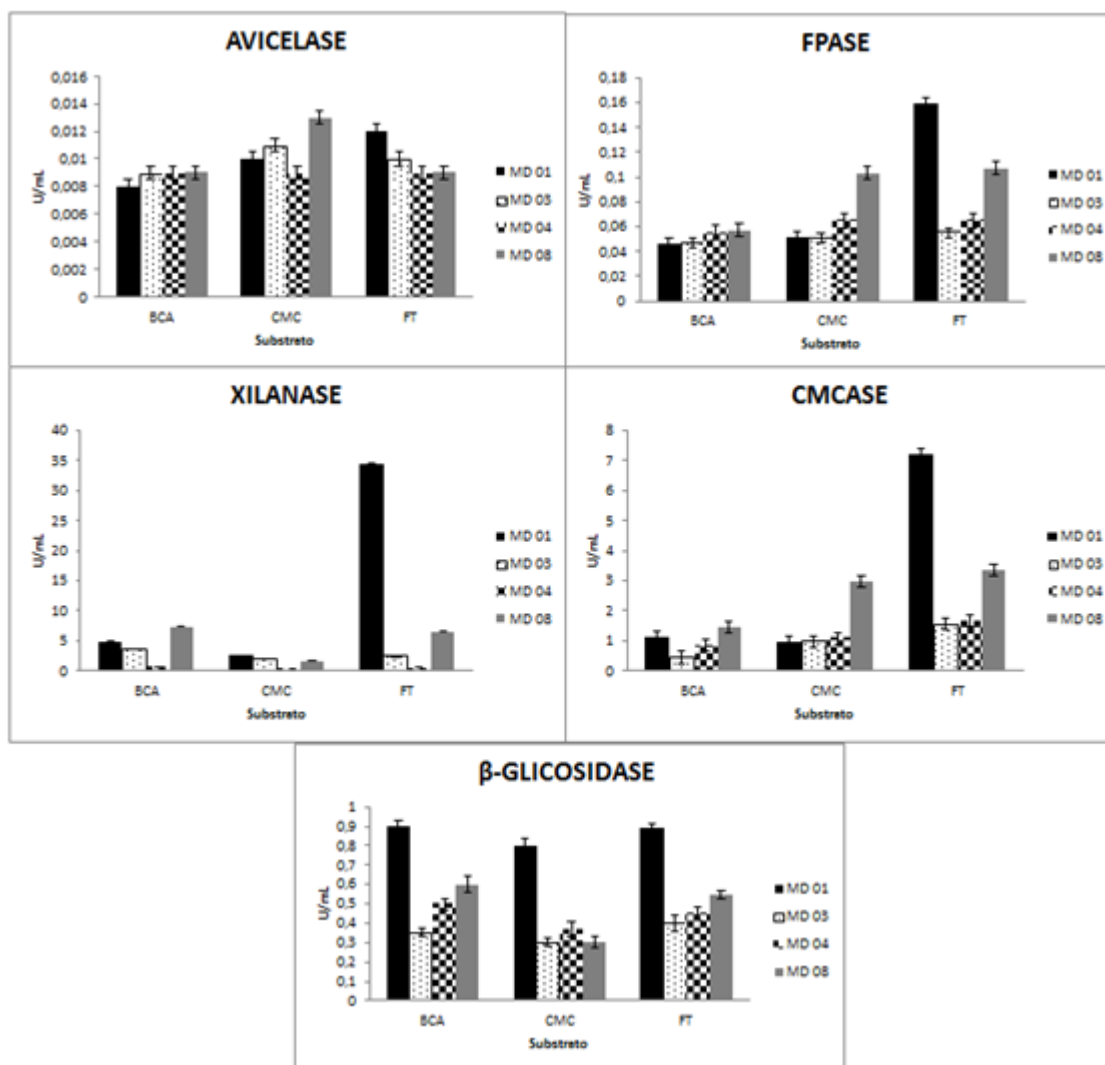


Figura 09 – Produção de enzimas com atividade de Avicelase, FPase, xilanase, CMCase e β-Glicosidase pelos fungos cultivados em BCA,CMC e FT.

Tabela 02. Composição da parede celular dos substratos BCA e FT

Resíduo Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
BCA	32-44	27-32	19-24	ROWELL (1992)
FT	29-35	26-32	16-21	ROWELL (1992)

BCA: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo

As correlações entre as variáveis: isolado, enzima e resíduo foram analisadas estatisticamente e as tabelas se encontram nos anexos da dissertação. Os resultados que apresentaram diferença significativa foram: 1. o substrato FT foi melhor indutor da produção de FPase, CMCase e xilanase e CMC de Avicelase (Tabela 01 – anexo); 2. O isolado MD01 produziu mais enzimas no meio com FT (Tabela 02 - anexo); 3. O isolado MD01 apresentou diferença significativa na produção de CMCase, xilanase e β -glicosidase (Tabela 06 – anexo).

Na tabela 03 observa-se vários autores que utilizaram de uma variedade de substratos para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fermentação submersa, obtendo vários tipos de resultados, justificando, que o presente estudo, buscou nos três tipos de substratos (FT, CMC e BCA), aquele que induz a maior produção dessas enzimas.

Tabela 03. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por diferentes fungos filamentosos

MICROORGANISMO	SUBSTRATO	ATIVIDADE	U/mL	AUTOR
<i>A.niger</i>	SM	Avicelase	0,35	WANG, 2011
<i>A.niger</i>	PM	β -Glicosidase	1,4	FANG, 2010
<i>Trichoderma reesei</i>	PM	β -Glicosidase	0,3	FANG, 2010
<i>A.niger</i>	PM	FPase	0,25	FANG, 2010
<i>T.reesei</i>	PM	FPase	2,5	FANG, 2010
<i>A.flavus</i>	FT	CMCase	1,4	GOMATHI, 2012
		β -Glicosidase	1400	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger NII 08121</i>	FT	β -Glicosidase	(purificado) 600	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger NII 08121</i>	PA	β -Glicosidase	(purificado)	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger NII 08121</i>	Glicose	β -Glicosidase	0 400	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger NII 08121</i>	Lactose	β -Glicosidase	(purificado) 410	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger NII 08121</i>	Celulose	β -Glicosidase	(purificado)	SHINGHANIA, 2011
<i>A.niger</i>	BCA	CMCase	1,36	CUNHA 2012
<i>A.niger</i>	BCA	Xilanase	16,8	CUNHA 2012

SM: sabugo de milho; PA: palha de arroz; BCA: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo; PM: palha de milho

comum para a identificação de fungos, principalmente para Zigomicetos, mas é menos preciso para espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, neste caso, o sequenciamento combinado com a identificação morfológica podem auxiliar na identificação (BALAJEE *et al.*,2009). Para a identificação molecular de *Aspergillus* é necessário, além da região ITS a análise da sequência de outras sequências como os genes de calmodulina e β -tubulina (SAMSON *et al.*, 2007).

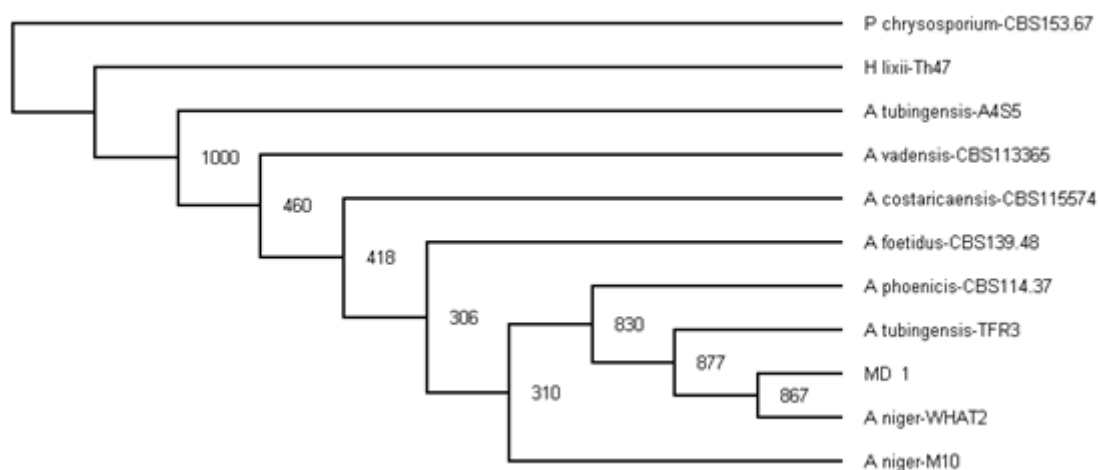


Figura 11 – Árvore filogenética construída por *Neighbour –Joining*.

O isolado MD01 é filogeneticamente semelhante ao *A.niger* WHAT2. Ele é filogeneticamente próximo das espécies de *A. níger*, *A. tubingensis*, *A. phoenicis*, *A. foetidus*, *A. costaricensis* e *A. vadensis*. Todas essas espécies são pertencentes a seção Nigri. As seqüências de *P. chrysosporium* e *H. lixi* foram utilizadas como grupo externo para auxiliar na resolução da árvore.

A proximidade do isolado IFBMD01 com *A.tubingensis* pode ser explicada por Parenicova *et al.* (2000) que verificaram que apenas 3 nucleotídeos separavam *A.niger* de *A.tubingensis* e apenas 2 nucleotídeos separavam *A.phoenicis* do *A.tubingensis*, na região ITS, conforme mostrado também por Abarca *et al.*(2004) que mostra a proximidade desses fungos na árvore filogenética baseado nas região ITS, o que corrobora com o observado na figura 10.

Varga *et al.* (2007), identificaram uma nova espécie de *Aspergillus* que foi inserida dentro da seção Nigri, que foi denominado como *A.brasiliensis* sp.nov.CBS101740, para isso foram sequenciados as regiões ITS, β -tubulina e calmodulina, que auxiliaram na identificação, mas também foram necessárias outras análises como a morfológica e produção de metabólitos secundários (termo modificado para extrolite; KARLOVSKY,

2008), ou seja, apenas a análise molecular em *Aspergillus*, não garante a sua identificação.

A caracterização morfológica foi realizada observando-se o fungo cultivado em meio CYA e MEA a 28°C. O fungo formou colônias, tipicamente, escuras, de aspectos pulverulentos; diâmetro médio de 65 x 40 mm; em MEA 38 mm, visualizado na figura 12. As seguintes características microscópicas em azul de lactofenol foram observadas cabeças conidiais radiadas, vesículas globulosas a sub-globulosas, bisseriadas, de 30-40 µm de diâmetro; conidióforos longos e grossos, de parede lisa, acastanhados; métulas, aproximadamente, duas vezes maior que as fiálides; conídios (Figura 13) acastanhados, esféricos a sub-esféricos, verrucosos, 3,0-4,0 µm de diâmetro com presença de célula pé.



Figura 12 – Colônias de *A. niger* IFBMD01 cultivadas em meio MEA

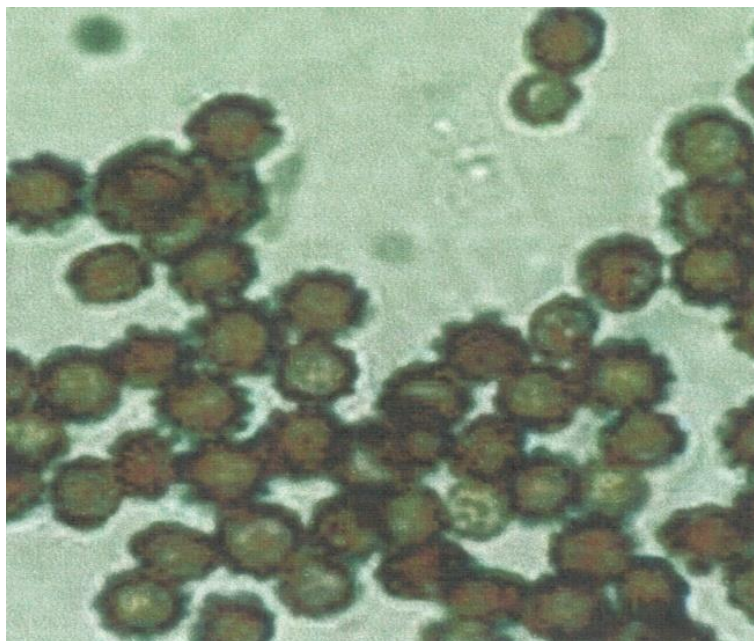


Figura 13 – Microscopia do fungo *A.niger* IFBMD01, em ampliação de 100 vezes, onde observa-se os conídios verrucosos.

A análise microscópica, feita mediante lâmina a fresco em lactofenol azul de metileno, revelou as estruturas e a morfologia mais próximas daquelas descritas para a espécie de *A. Níger* (ABARCA *et al.*, 2004), exceto para o tamanho dos conídios, que se apresentaram um pouco abaixo do citado por Samson *et al.* (2007), que é entre 3,5 – 5 μm de diâmetro, portanto, foi identificada a linhagem como *Aspergillus cf niger* (cf, entende-se por comparável à espécie *A. niger*). Sendo, doravante denominado *A.niger* IFBMD01.

4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELO FUNGO *A. niger* IFBMD01

A cinética de produção de celulasas e xilanases pelo fungo *A. niger* IFBMD01 foi realizada cultivando-se o fungo em meio MM/ FT por 10 dias, sendo que a atividade enzimática foi dosada no sobrenadante de cultura a cada 24 horas (Figura 14).

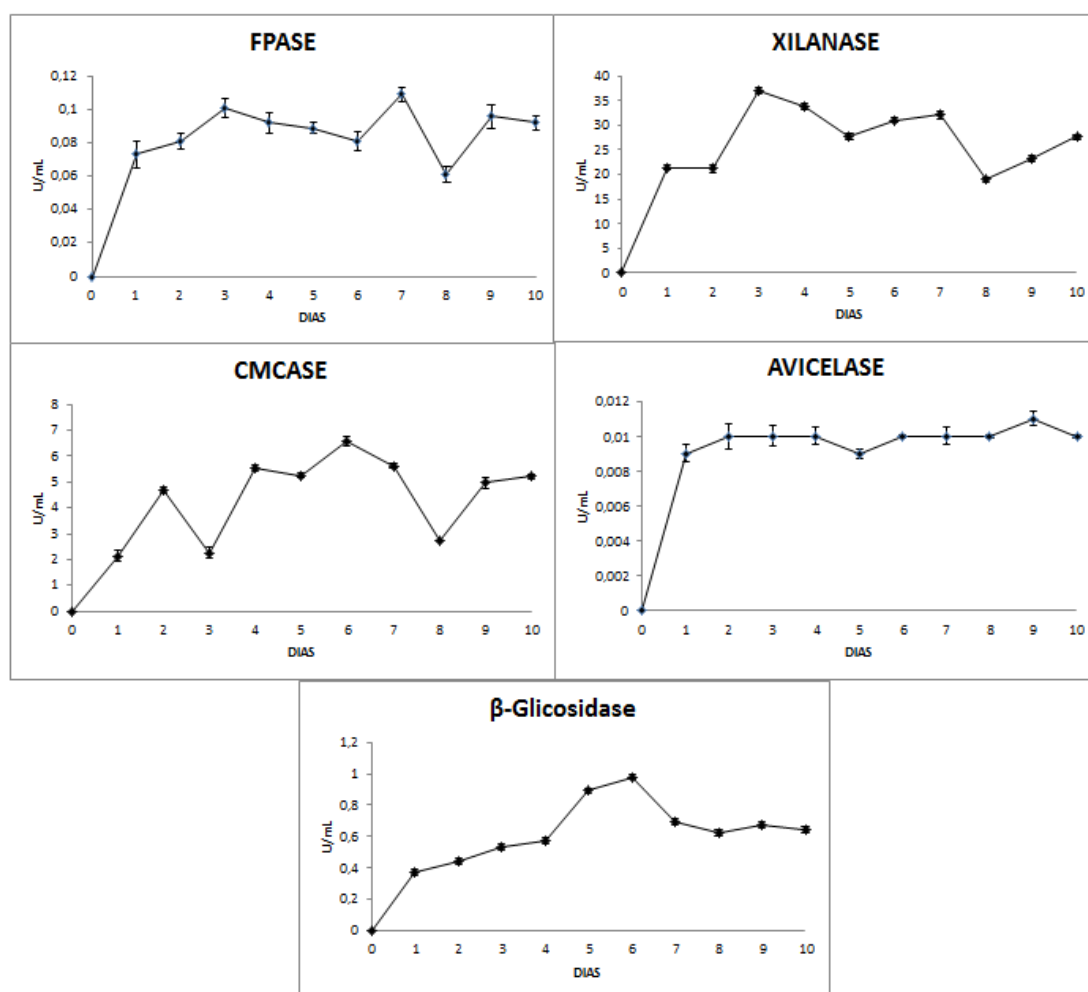


Figura 14 – Análise da produção de enzimas com atividade de FPase, xilanase, CMCcase, Avicelase e β -glucosidase pelo fungo *A. niger* IFBMD01 cultivado em meio MM/FT por 10 dias.

De acordo com a figura 14, a produção de FPase é relativamente constante entre o primeiro e o décimo dia sendo o pico observado após 7 dias de cultivo, produzindo 0,10 U/mL. Wang *et al.* (2011) utilizando o mesmo substrato e o fungo *A.niger* observou o pico de produção de FPase após 6 dias (3 U/mL) e Fang *et al.* (2010) na tabela 12 obtieram uma produção de 0,25U/mL de FPase por *A.niger* utilizando palha de milho após dois dias de cultivo.

Em relação à produção de xilanase (figura 14), o pico de produção foi obtido após 3 dias de cultivo, obtendo 37 U/mL, resultado semelhante ao observado por Pal *et al.*(2011) onde a produção de xilanase por *A.níger* após 6 dias foi de 37,84U/mL utilizando farelo de trigo como substrato. Cunha *et al.*(2012) (Tabela 12), utilizando a mesma espécie de fungo, mas com o substrato BCA e o tempo de produção de 30 horas

obteve uma produção de 16,8 U/mL; Nair *et al.* (2008) ao trabalhar com 10 cepas distintas de *A.niger*, obteve uma media de produção de xilanase de 32,4 U/mL, com sete dias de produção e utilizando farelo de trigo como substrato. Esse isolado, *A.niger* IFBMD01, mostrou-se promissor na produção de xilanase em tempo relativamente curto, quando comparado com os autores citados, e em grande quantidade (35 U/mL).

Na figura 14, observa-se que o pico de produção de CMCase foi obtido após 6 dias, produzindo 6,59 U/mL. Nair *et al.* (2008), analisaram a produção de CMCase por 4 cepas de *A.niger*, utilizando farelo de trigo como substrato e o melhor resultado obtido foi a produção de 1,81 U/mL de CMCase após 7 dias de cultivo, tempo superior ao encontrado no presente trabalho (6 dias) e em quantidade bem inferior. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomathi *et al.* (2012) que foi de 1,4 U/mL (Tabela 12), utilizando *A. flavus* como produtor e farelo de trigo como substrato, pelo tempo de 3 dias. Cunha *et al.* (2012) encontraram valores de 1,36 U/mL (Tabela 12) com *A.niger* como produtor e bagaço de cana-de-açúcar como substrato, no tempo de 30 horas de produção. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o *A.niger* IFBMD01 produz uma quantidade considerável de CMCase, podendo, futuramente ser empregado em processos biotecnológicos.

O pico de produção de β -Glicosidase neste trabalho foi obtido após 6 dias (Figura 14) com uma produção de 0,98 U/mL. Fang *et al* (2010), observaram o pico de produção de BGL pelo fungo *A.niger* após 7 dias de cultivo em meio contendo palha de milho como substrato, de 1,4 U/mL (Tabela 12), esse resultado aproxima do que foi encontrado neste trabalho, mesmo utilizando substratos diferentes. A produção de BGL pelo *A. niger* neste estudo encontra-se de acordo com a literatura podendo o fungo ser utilizado para a produção desta enzima em processos biotecnológicos, sendo que a sua purificação e concentração deve ser elaborada para uma aplicação futura, de modo reduzir custos e proporcionar benefícios à sociedade.

O pico de produção de Avicelase neste trabalho foi obtido após 9 dias de cultivo, conforme figura 14 (0,011 U/mL), como descrito anteriormente, pode-se notar uma semelhança na cinética da FPase e Avicelase, devido ao mesmo tipo de celulose encontrado em ambos materiais a serem hidrolisados. Wang *et al.* (2011), produziram em 2 dias 0,35U/mL, utilizando o sabugo de milho como substrato e o fungo *A.niger* como produtor. Baseado nesses dados da literatura, a produção dessa enzima, pelo *A. níger* IFBMD01, demonstrou ser baixa nesse tipo de substrato, devendo ser avaliado em análises futuras com um outro tipo de substrato, como por exemplo o sabugo de milho.

De acordo com os resultados obtidos até o momento, o fungo *A.niger* IFBMD01 mostrou-se promissor na produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase, no entanto para a produção de FPase e Avicelase, esse fungo não deve ser utilizado nas condições estabelecidas. Observa-se variações no pico de produção dessas enzimas, o que demonstra a importância da realização de ensaios, para avaliar a produção das enzimas, em intervalos de tempo maiores, mesmo trabalhando com fungos neste estudo, cujos dados de produção já estão bem descritos na literatura.

4.4.1 DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS PARA A ATIVIDADE DAS CELULASSES E XILANASES PRODUZIDAS POR *A.niger* IFBMD01

Para a determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01, este foi inoculado no MM/FT e mantido a 40°C por tempo suficiente para a obtenção do pico de produção de cada enzima conforme apresentado na figura 14. O sobrenadante de cultura coletado após 3 dias de cultivo apresentou o pico de produção das enzimas com atividade de xilanase (MM/FT/XIL), para a análise das enzimas com atividade de CMCase e β -glicosidase utilizou-se o sobrenadante de cultura coletado após 6 dias de cultivo (MM/FT/CMC e MM/FT/BGL) e para a análise das enzimas com atividade de FPase e Avicelase o sobrenadante de cultura coletado após 7 e 9 dias de cultivo respectivamente (MM/FT/FP e MM/FT/AVI). O pH ótimo para a atividade da maioria das celulasas e xilanasas fúngicas é ácido, entre 4 a 6, via de regra, conforme Tortora *et al.* (2005), diferente das enzimas bacterianas que atuam em pH de neutro a alcalino. Quanto a temperatura, Tortora *et al.* (2005) cita os microrganismos termófilos, que crescem em altas temperaturas, mesófilos em temperaturas moderadas e psicrófilos em temperaturas baixas, com isso, os microrganismos que crescem e secretam enzimas em temperaturas maiores, termófilos, são de interesse biotecnológicos, uma vez que a estabilidade térmica dessa enzima, em geral, é maior do que uma enzima produzida em temperaturas menores (POLIZELI *et al.*, 2005).

4.4.1.1 FPASE

As enzimas com atividade de FPase presentes no MM/FT/FP apresentaram maior atividade no pH 5,5 (Figura 15), porém observa-se que nos pHs 4 e 5 a atividade enzimática foi próxima a de pH 5,5; fato semelhante ocorrido em trabalho realizado por

Dhillon *et al.* (2012), cujo pH ótimo foi observado entre 4,8 à 5,5, utilizando *A.niger* como produtor de FPase.

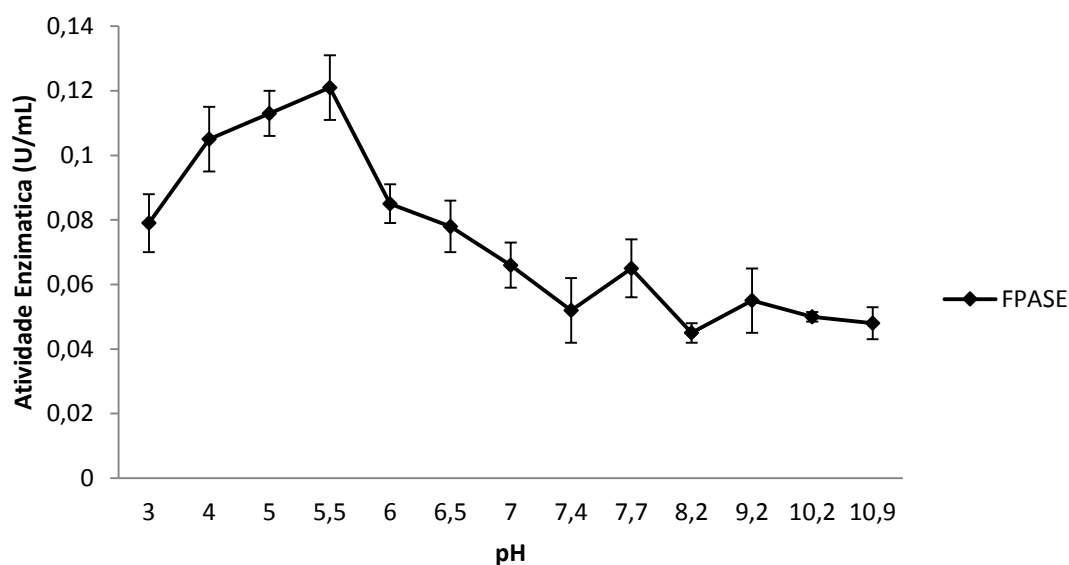


Figura 15 – Comportamento das enzimas com atividade de FPase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes valores de pH.

A temperatura ótima para a atividade das FPases foi de 60°C (Figura 16), quando as enzimas foram incubadas em tampão com pH 5,5. Delabona *et al* (2012a) estudando a atividade enzimática de FPases produzidas pelo fungo *A. fumigatus* verificaram que a faixa de temperatura onde as enzimas apresentaram maior atividade foi entre 45 a 60°C, o que está de acordo com o observado neste trabalho.

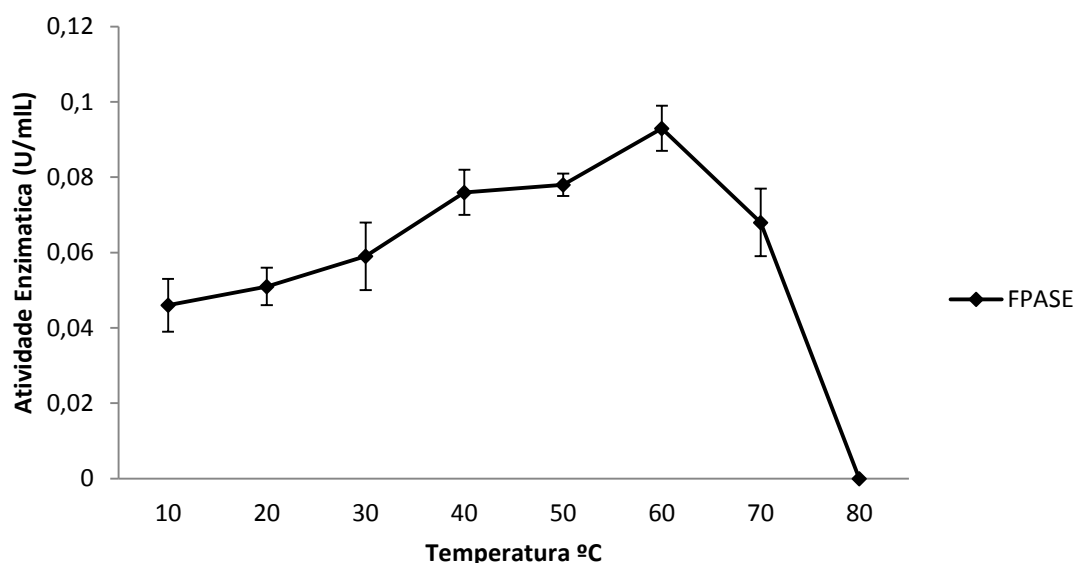


Figura 16 – Comportamento das enzimas com atividade de FPase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.

Para a análise da estabilidade das FPases em diferentes valores de pH a enzima foi incubada a 60°C nos pHs 4,5; 5,5 e 6,5. Na figura 17, observa-se que após 1 hora de incubação observa-se declínio da atividade enzimática em 41,18% - 58,22%, após este período a enzima manteve-se estável até o final do ensaio. Assim após 48 horas a enzima manteve 45,45% da sua atividade inicial em pH 4,5, 41,75% em pH 5,5 e 59,82% em pH 6,5.

Na figura 18 observa-se a estabilidade da atividade das FPases presentes no MM/FT/FP nas temperaturas de 50, 60 e 70°C e no pH 5,5 por 48 horas. Quando a enzima foi incubada a 50°C observou-se uma redução de 19,66% da atividade após a primeira hora, a enzima manteve-se estável até a vigésima quarta hora e no final do ensaio manteve 71,79% da atividade enzimática. Quando as enzimas foram incubadas a 60°C observou-se uma redução de 45,72% da atividade após a primeira hora e a enzima manteve-se estável até o final do ensaio. A 70°C observou-se uma queda de 33,34% na primeira hora e a atividade manteve-se até a 12ª hora, onde, a partir desse ponto, ficou inativa. Assim após 48 horas, as FPases mantiveram 71,79% da sua atividade inicial a 50°C, 50% da atividade inicial à 60°C e sem atividade à 70°C.

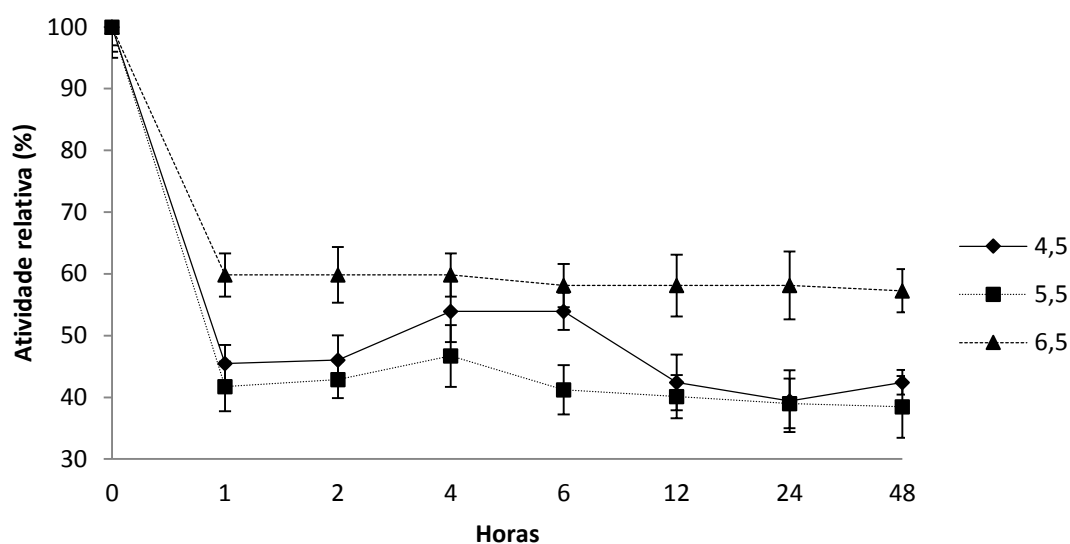


Figura 17 – Estabilidade das enzimas com atividade de FPase presentes no MM/FT/FP em de pH 4,5 a 6,5 por 48h.

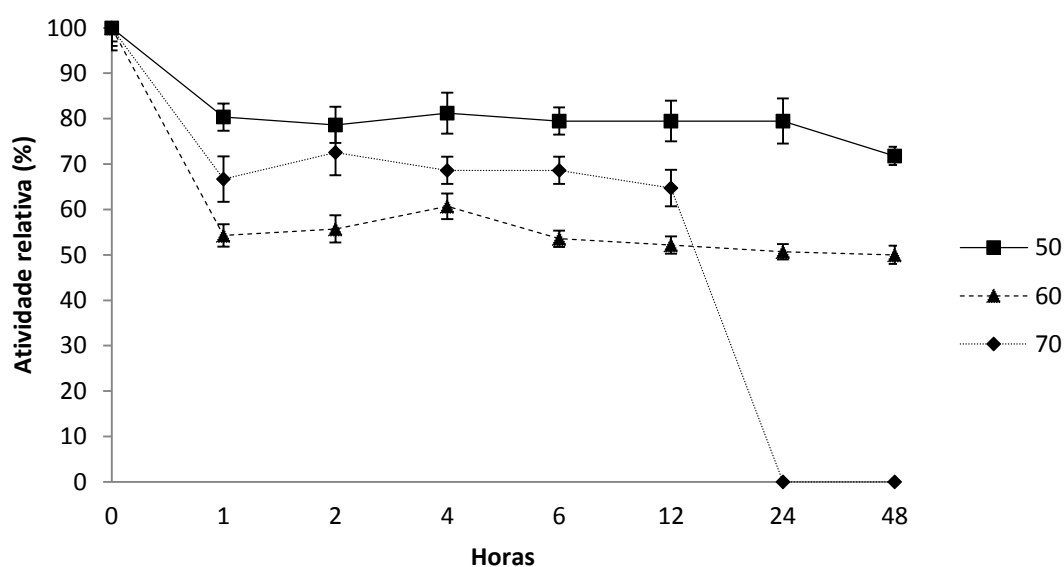


Figura 18 - Estabilidade da atividade das FPases presentes no MM/FT/FP nas temperaturas de 50, 60 e 70°C por 48 horas.

4.4.1.2 CMCase

As enzimas com atividade de CMCase presentes no MM/FT/CMC apresentaram maior atividade nos pHs 5 e 7 (Figura 19), sugerindo que no sobrenadante há pelo

menos duas CMCases que atuam em pH diferentes. A temperatura ótima para a atividade das CMCases foi 70°C (Figura 20). Resultado semelhante obteve Delabona *et al* (2012a) que determinaram a temperatura ótima de 65°C para a atividade das CMCases produzidas pelo fungo *A. fumigatus*, estando o valor próximo ao observado neste trabalho.

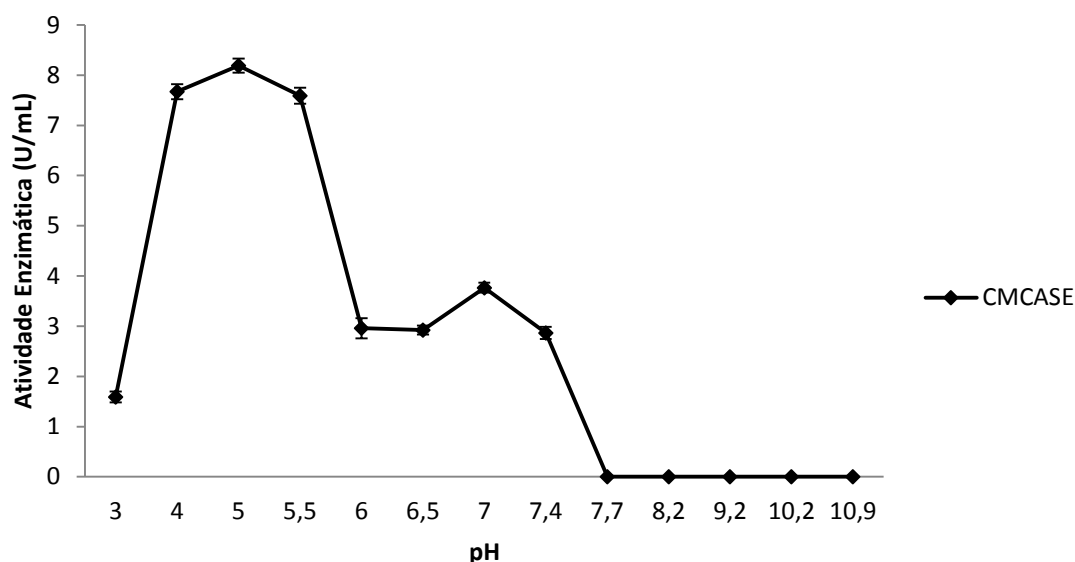


Figura 19 – Comportamento das enzimas com atividade de CMCase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 (MM/FT/CMC) em diferentes valores de pH.

A estabilidade do pH foi realizada na temperatura com maior atividade enzimática de 70°C. Na figura 21, observa-se que a atividade da enzima cai na primeira hora em 2,57% no pH 4; 36,77% no pH 5; 90,72% no pH 6. No pH 6, essa queda não é tão acentuada até a quarta hora que chega a 11,71% da sua atividade. A enzima no pH 4 fica inativada após a quarta hora. Assim após 48 horas a enzima em pH 4 encontra-se inativada, no pH 5 a enzima mantém 0,54% de sua atividade e no pH 6 a atividade da enzima encontrada foi de 1,80%. Liu *et al.* (2011), observaram uma estabilidade maior entre o pH 4 e 8 durante 20 horas, variando entre 90 a 50% da sua atividade enzimática respectivamente, a temperatura utilizada para a incubação foi de 50°C e a enzima utilizada foi produzida pelo fungo *A. fumigatus* Z5.

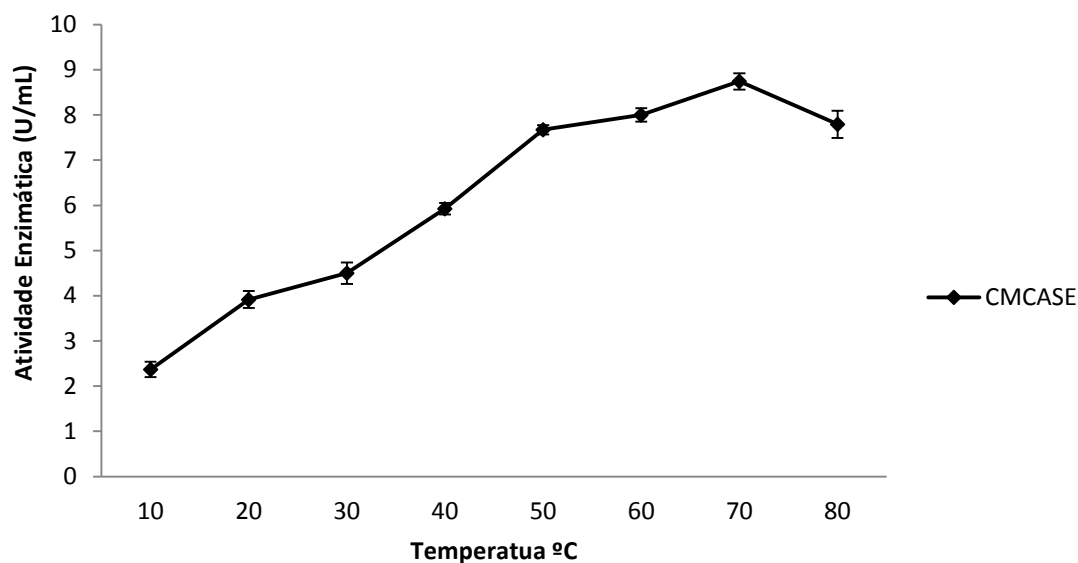


Figura 20 – Comportamento das enzimas com atividade de CMCase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 (MM/FT/CMC) em diferentes faixas de temperatura.

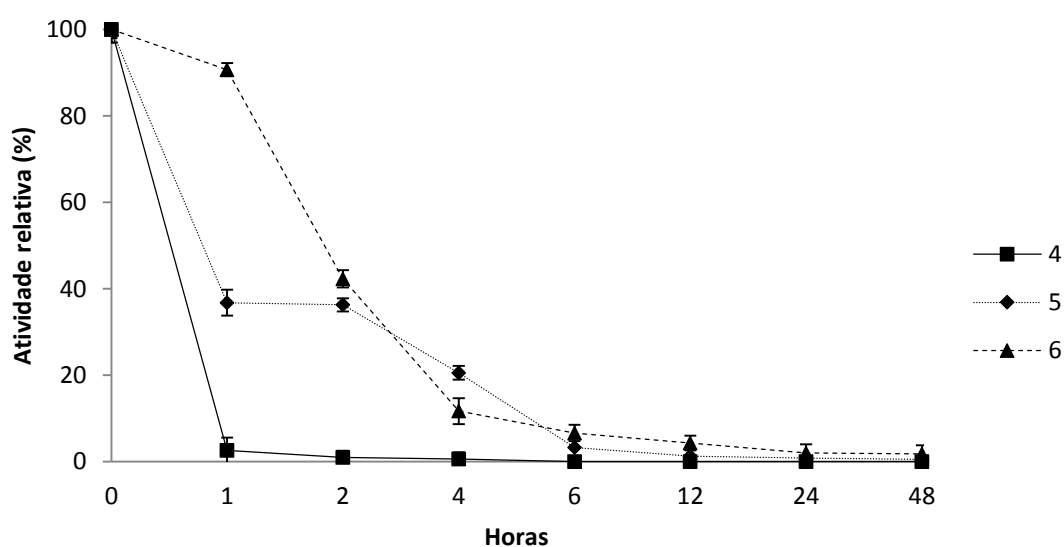


Figura 21 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase presentes no MM/FT/CMC em de pH 4,0 a 6,0 por 48 h.

Na figura 22, observa-se a estabilidade da enzima CMCase nas temperaturas 60, 70 e 80°C, em pH com maior atividade enzimática de 5, por 48 horas. Na temperatura de 60°C, nota-se declínio até a quarta hora, em que a sua atividade era de 24,75%, mas na sexta hora, essa enzima consegue ter atividade maior que na quarta hora, elevando sua atividade para 42,12%, declinando novamente na décima segunda hora para 25,75%,

chegando a 19,12% de atividade no final do ensaio de 48 horas. À temperatura de 70°C, que na figura 11 apresentou-se como sendo a de melhor atividade enzimática, quando analisado nesse ensaio, apresentou redução de atividade para 33,75% na primeira hora, declinando até a sexta hora para 2,97%, chegando ao final do ensaio com 0,45%. A 80°C, a atividade de CMCase na primeira hora caiu para 33,78%, caindo ainda mais até a quarta hora, onde, após esse período, perdeu totalmente a atividade. Sendo assim, após 48 horas a enzima manteve 19,12% de sua atividade à 60°C, 0,45% a 70°C e perdeu a sua atividade a 80°C. Liu *et al.* (2011), quando incubaram esse tipo de enzima, em pH 5, em varias temperaturas, observaram que a atividade enzimática manteve-se acima de 80% nas temperaturas entre 40 a 60°C, a 70°C manteve 40% de atividade e entre 80 e 90°C apenas 10% da atividade, esses valores diferem dos observados neste trabalho. Farinas *et al.* (2010), realizaram esse experimento com 96 horas em temperaturas de 37 e 50°C com enzima produzida por *A.niger*, e observaram que a atividade no final desse período foi de 100% para a temperatura de 37°C e de 38% na temperatura de 50°C. Falkoski *et al.* (2013) quando deixaram a enzima incubada a 60°C, pelo período de 48 horas, relataram perda total da atividade de CMCase, diferentemente do verificado nesse trabalho que manteve 19,12% de sua atividade. Essa enzima, apesar de apresentar maior atividade em uma temperatura alta (70°C), demonstrou baixa estabilidade nas temperaturas estudadas. Desta forma, fica como perspectiva o estudo de sua estabilidade em temperaturas menores a avaliada, seguindo os mesmos parâmetros dos autores anteriormente citados.

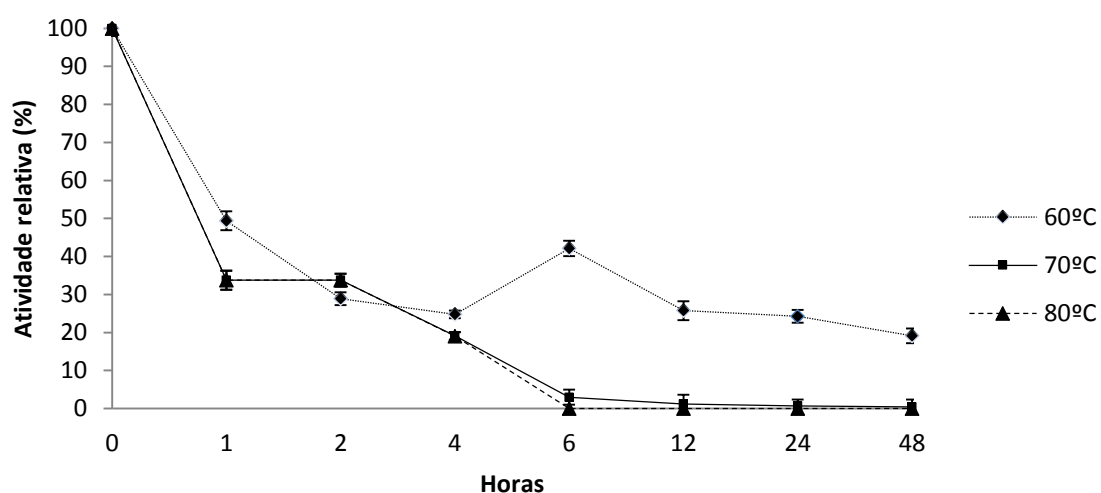


Figura 22 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase presentes no MM/FT/CMC nas temperaturas de 60, 70 e 80°C.

4.4.1.3 AVICELASE

As enzimas com atividade de Avicelase presentes no MM/FT/AVI apresentaram pH ótimo 5,5 (Figura 23), entretanto as enzimas mostraram alta atividade em pH de 4 a 6. Observa-se a ausência de atividade nos pHs 3 e 10,9. Para Dhillon *et al* (2012) o pH ótimo foi entre 4,8 à 5,5, utilizando *A. niger* como produtor de celobiohidrolase, o que está de acordo com o observado nesse trabalho.

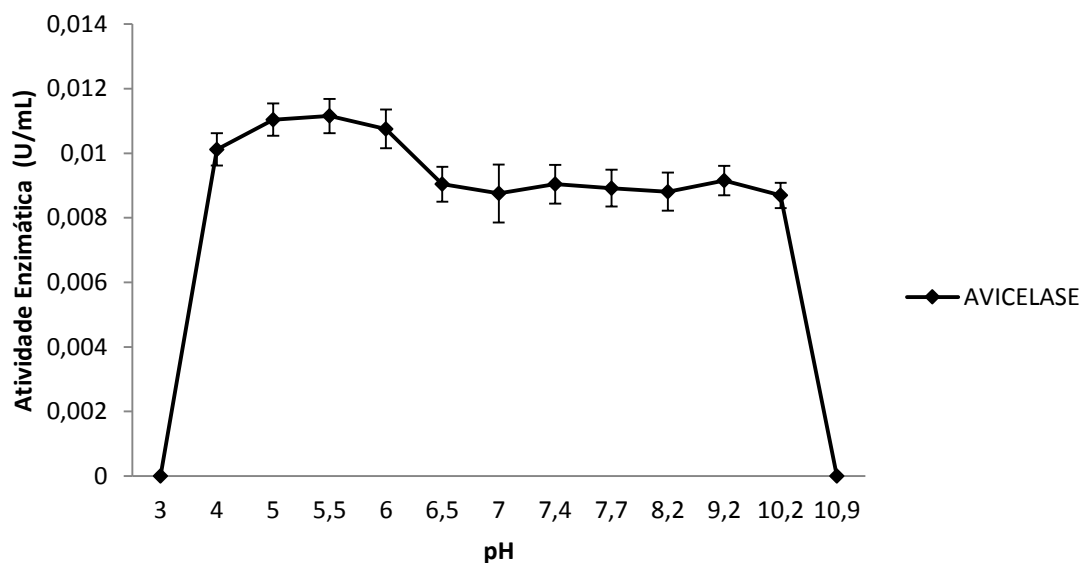


Figura 23 - Comportamento das enzimas com atividade de Avicelase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 (MM/FT/AVI) em diferentes valores de pH.

As enzimas com atividade de Avicelase presentes no MM/FT/AVI apresentaram temperatura ótima a 60°C (Figura 24). Observa-se a ausência de atividade dessas enzimas a 10°C. Para Matkar *et al.* (2013) a temperatura ótima das avicelases secretadas por *Aspergillus sydowii* foi a 40°C.

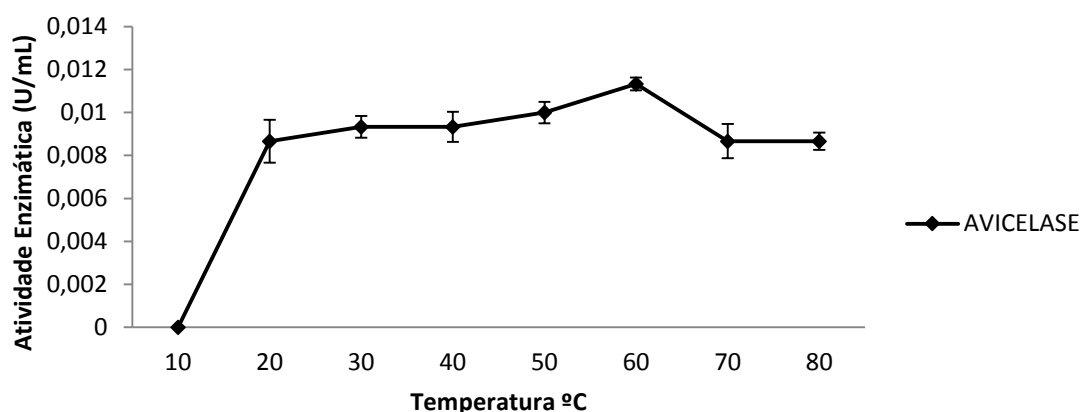


Figura 24 - Comportamento das enzimas com atividade de Avicelase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 (MM/FT/AVI) em diferentes faixas de temperatura.

A estabilidade das enzimas com atividade de Avicelase em diferentes valores de pH foi realizada na temperatura de maior atividade enzimática, a 60°C por 48 horas. Na figura 25, observa-se que quando a enzima foi incubada em pH 4,5 manteve 90% de sua atividade até a primeira hora, após esse período, não a enzima não manteve sua atividade. Em pHs 5,5 e 6,5 não houve atividade da enzima após o tempo zero, demonstrando a baixa estabilidade dessa enzima no decorrer do tempo. Johnson *et al.* (1982), verificaram a estabilidade desse tipo de enzima entre o pH 4 a 8 pelo período de 5 horas a 37°C e observaram a atividade entre 80 a 100%.

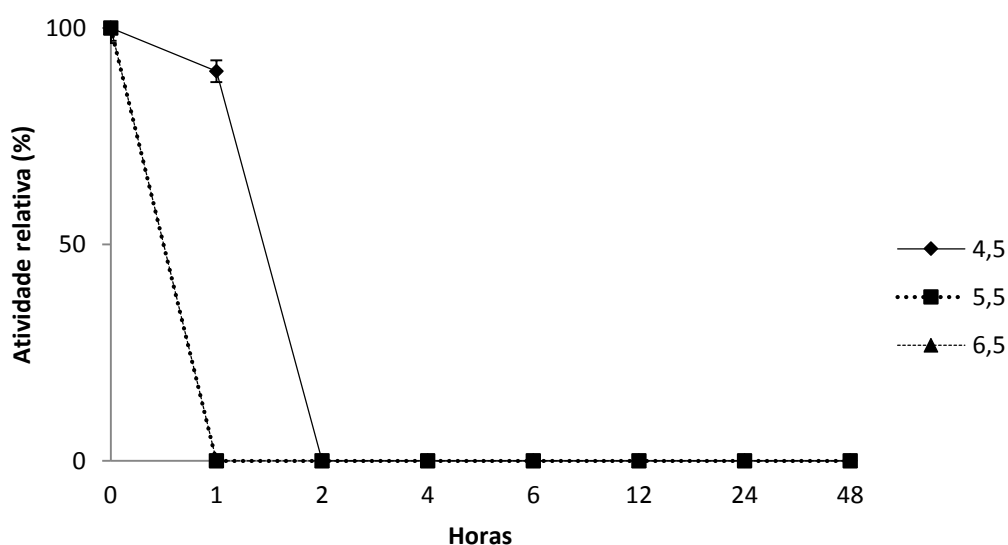


Figura 25 - Estabilidade das enzimas com atividade de Avicelases presentes no MM/FT/AVI em pH de 4,5 a 6,5 por 48h.

Na figura 26, observa-se a estabilidade da enzima Avicelase nas temperaturas 50, 60 e 70°C, em pH de maior atividade enzimática, pH 5,5 por 48 horas. Na temperatura de 50°C foi observada uma redução de 18,19% da atividade inicial na primeira hora, de 27,28% na segunda hora e a perda total da atividade após 4 horas de incubação. Na temperatura de 60 e 70°C não ocorreu atividade após o tempo zero. Portanto, não houve atividade da enzima no final do ensaio de 48 horas. Johnson *et al.* (1982), ao analisarem a termoestabilidade das Avicelases produzidas por *Clostridium thermocellum*, verificaram que no final do ensaio de 5 horas, nas temperaturas entre 30 a 70°C a atividade foi mantida em 85% , resultados diferentes deste trabalho que apenas a 50°C ainda havia atividade com duas horas de incubação.

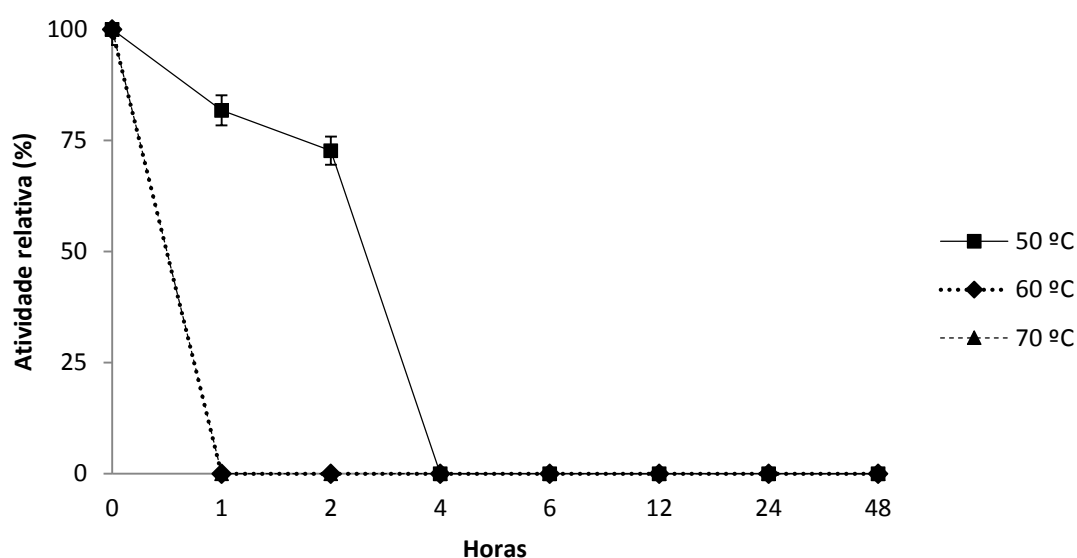


Figura 26 - Estabilidade das enzimas com atividade de Avicelases presentes no MM/FT/AVI nas temperaturas de 50, 60 e 70°C.

4.4.1.4 XILANASE

As enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL apresentaram pH ótimo de 5 (Figura 27), o que corrobora com o encontrado por Cunha *et al.* (2012) e Palet *et al.* (2011), que observaram o pH 5 como sendo o pH de maior atividade enzimática das xilanases secretadas por *A.niger*, o que está de acordo com o observado nesse trabalho. Observa-se também um pico de atividade em pH 7,7, o que sugere a presença de mais de uma xilanase no MM/FT/XIL o que foi comprovado pelas análises do Zimograma realizadas neste trabalho.

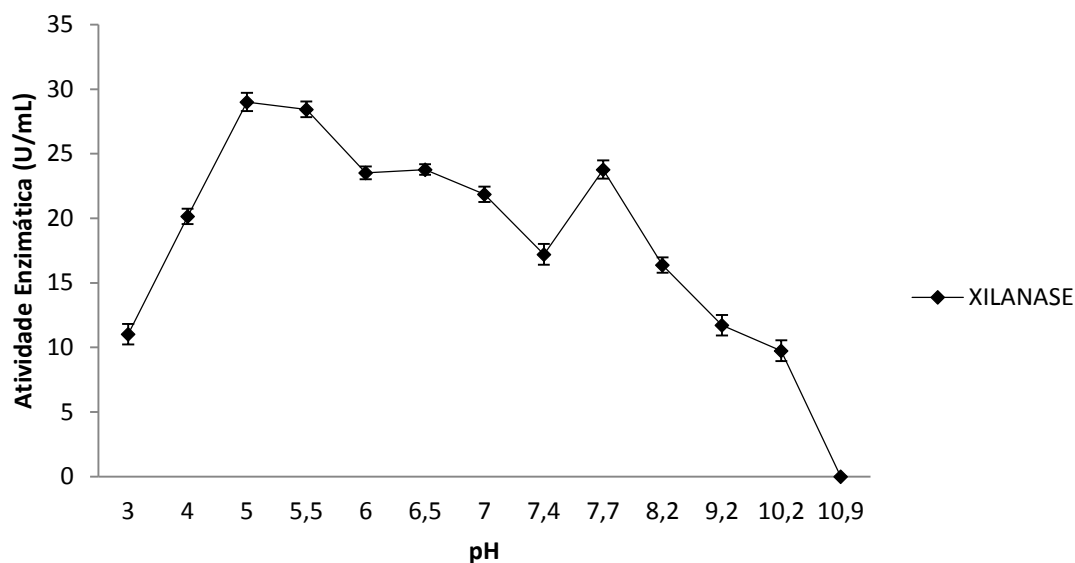


Figura 27 - Comportamento das enzimas com atividade de xilanase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes valores de pH.

As enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL apresentaram temperatura ótima a 50°C, conforme a figura 28, o que difere do resultado encontrado por Pal *et al* (2011) que verificaram que a maior atividade enzimática foi a 37°C da xilanase produzida pelo fungo *A. niger* DFR-5.

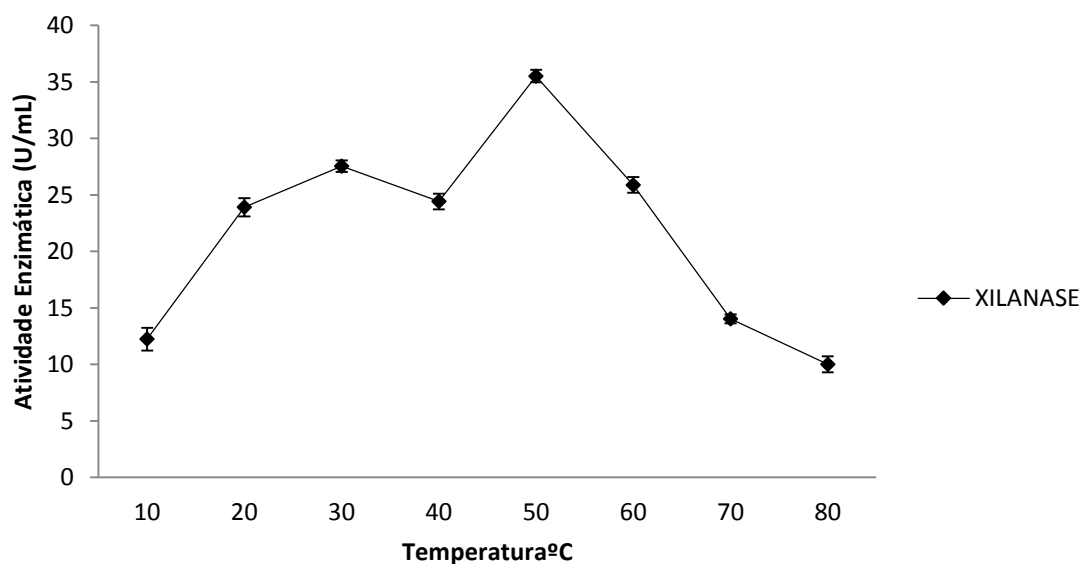


Figura 28 - Comportamento das enzimas com atividade de xilanase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.

A estabilidade das xilanases em diferentes valores de pH foi realizada na temperatura de maior atividade enzimática, 50°C por 48 horas. Na figura 29, observa-se que a atividade da enzima em pH 4 cai para 70,54% na primeira hora, caindo para 49,51% na segunda hora e na quarta hora cai para 3,54%, após este período a enzima manteve-se estável até o final do ensaio. No pH 5 a atividade caiu para 55,86% na primeira hora, caindo para 40,67% na segunda hora e subindo para 48,62% na 12ª hora, chegando no final do ensaio com 31,37% de sua atividade. No pH 6 na primeira hora a atividade passa para 63,78%, diminuindo para 45,92% na segunda hora e subindo para 63,78% na 12ª hora, mas cai para 2,98% no final do ensaio. Assim, após 48 horas a enzima manteve atividade de 2,98% em pH 4, 31,37% em pH 5 e 2,98% em pH 6.

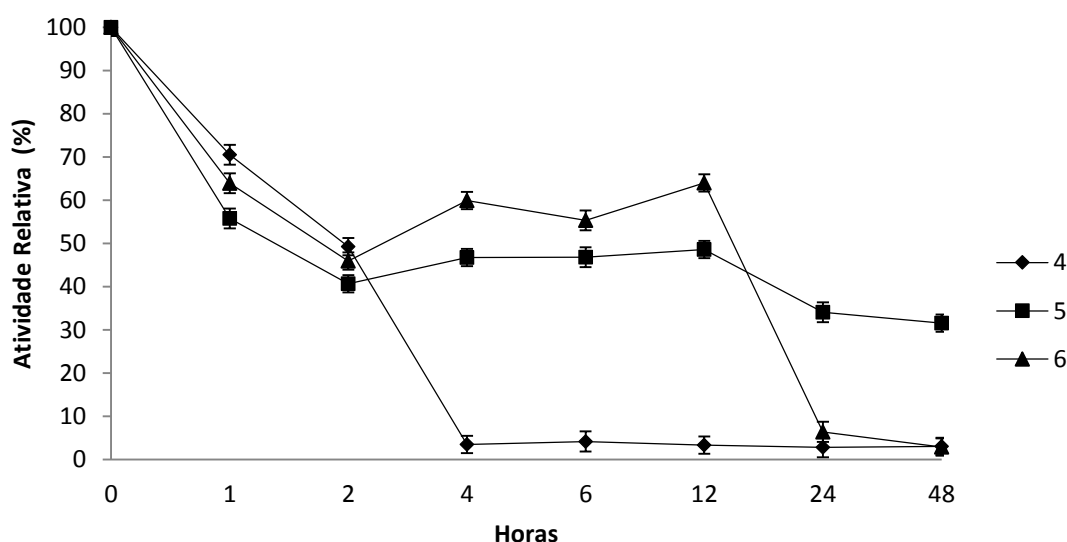


Figura 29- Estabilidade das enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL nos pHs de 4 a 6.

Na figura 30, observa-se a estabilidade das xilanases nas temperaturas 40, 50 e 60°C no pH de maior atividade enzimática, pH 5 por 48 horas. Na temperatura de 60°C, observa-se o declínio até a segunda hora, onde a atividade da enzima estava em 3,87%, sendo estável até a vigésima quarta hora, após esse tempo fica inativada. Na temperatura de 50°C, a atividade caiu para 55,86% na primeira hora, caindo para 40,67% na segunda hora e subindo para 48,62% na 12ª hora, chegando no final do ensaio com 31,37% de sua atividade. Na temperatura de 40°C, observa-se uma redução de 12,28% da atividade na primeira hora, chegando a 48,31% na sexta hora e na décima

segunda hora a 30,15, e ao final do ensaio nota-se uma redução de 45,83%. Sendo assim, após 48 horas a enzima manteve 54,17% de sua atividade à 40°C, 31,37% à 50°C e sem atividade à 60°C. Jun *et al.* (2009), ao analisar essa enzima, produzida por *T.reesei*, incubada 60°C por 30 minutos, obtiveram 40% de sua atividade enzimática, resultado próximo ao determinado neste trabalho que incubou por uma hora e manteve 28,8% da sua atividade.

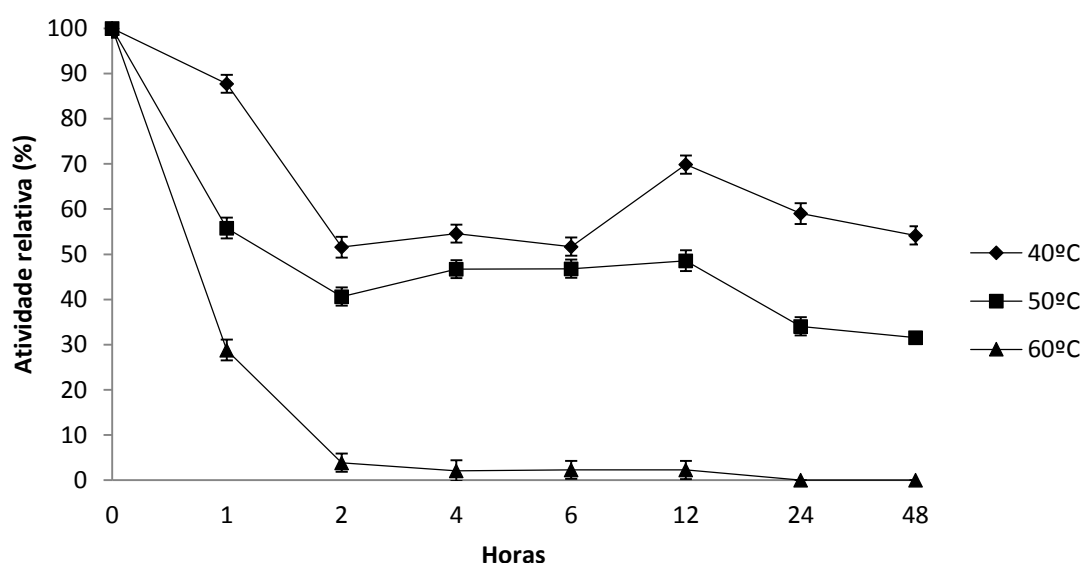


Figura 30 - Estabilidade das enzimas com atividade de xilanase presentes no MM/FT/XIL nas temperaturas de 40, 50 e 60°C.

4.4.1.5 β -GLICOSIDASE

Para a atividade de β -glicosidase, observa-se na figura 31 que o pH em que houve maior atividade enzimática foi de pH 5, mas houve um descréscimo dessa atividade em pH 7 subindo novamente no pH 7,4, isso pode ter ocorrido devido a análise ter sido realizada com sobrenadante de cultura e não com enzima purificada, podendo conter nesse sobrenadante mais de um tipo de β -glicosidase, com pI e massas moleculares diferentes, como foi o caso da xilanase anteriormente descrita; para confirmar essa afirmação, somente com análise de gel de atividade para β -glicosidase, que será realizada futuramente. Shinghania *et al.* (2011), ao avaliarem o mesmo tipo de

enzima produzida por *A.niger*, encontraram maior atividade no pH 5,5, resultado próximo ao encontrado corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

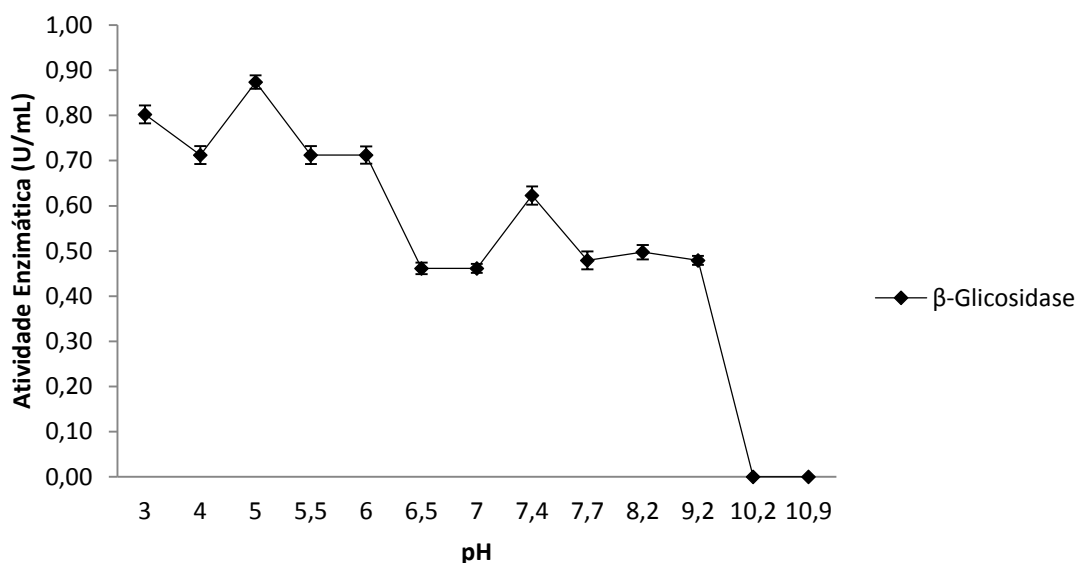


Figura 31- Comportamento das enzimas com atividade de β -glicosidase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes valores de pH.

Na figura 32, observa-se as β -glicosidases apresentaram temperatura ótima a 60°C, sendo que Shinghania *et al.* (2011), ao avaliarem o mesmo tipo de enzima produzida por *A.niger*, encontraram a temperatura ótima em 70°C. Semelhantemente ao que ocorreu na figura 31, em que há dois picos de atividade enzimática, na figura 32 também verificou-se picos, nas temperaturas 30 e 60°C, o que pode ser um indicador de que há mais de um tipo de β -glicosidase.

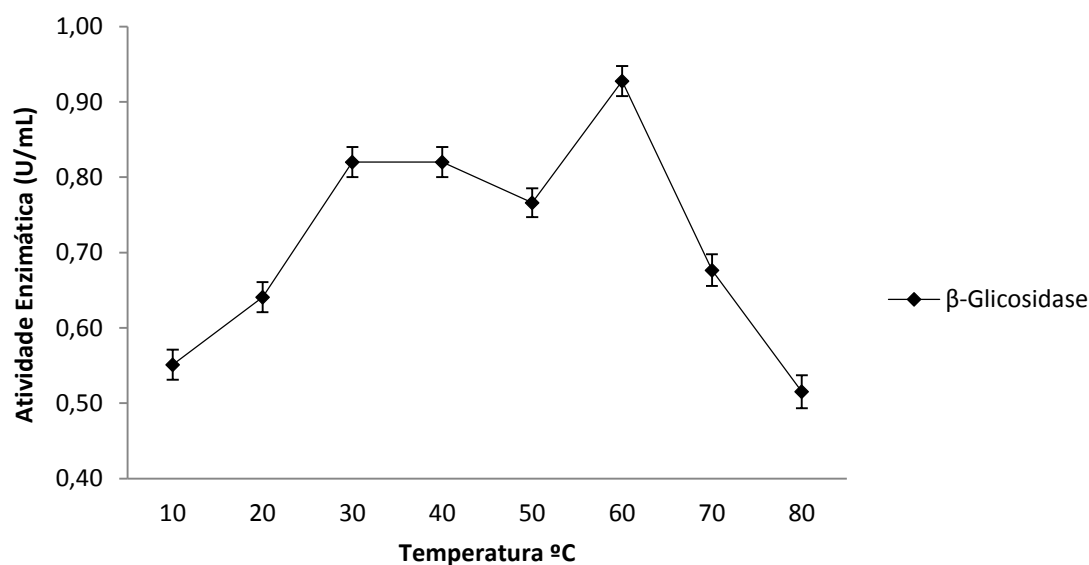


Figura 32- Comportamento das enzimas com atividade de β -glicosidase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 em diferentes faixas de temperatura.

Na figura 33, observa-se a estabilidade das β -glicosidases no pH, na primeira hora em pH 4, houve pouca queda, mantendo sua atividade em 97,65%, semelhantemente no pH 6, que manteve 94,90% da sua atividade, porém no pH 5, a atividade declinou para 73,31%. No final do ensaio, a atividade em pH 4 foi de 78,47%; no pH 5 de 42,54% e no pH 6 de 83,32%. Riou *et al.* (1998) em ensaio com a enzima produzida por *A.oryzae*, verificaram que esta enzima ficou estável entre os pH 4,5 e 6,5, caindo a sua atividade nos demais pH, esse resultado difere um pouco ao encontrado nesse trabalho em que a estabilidade foi maior em pH 4 e 6.

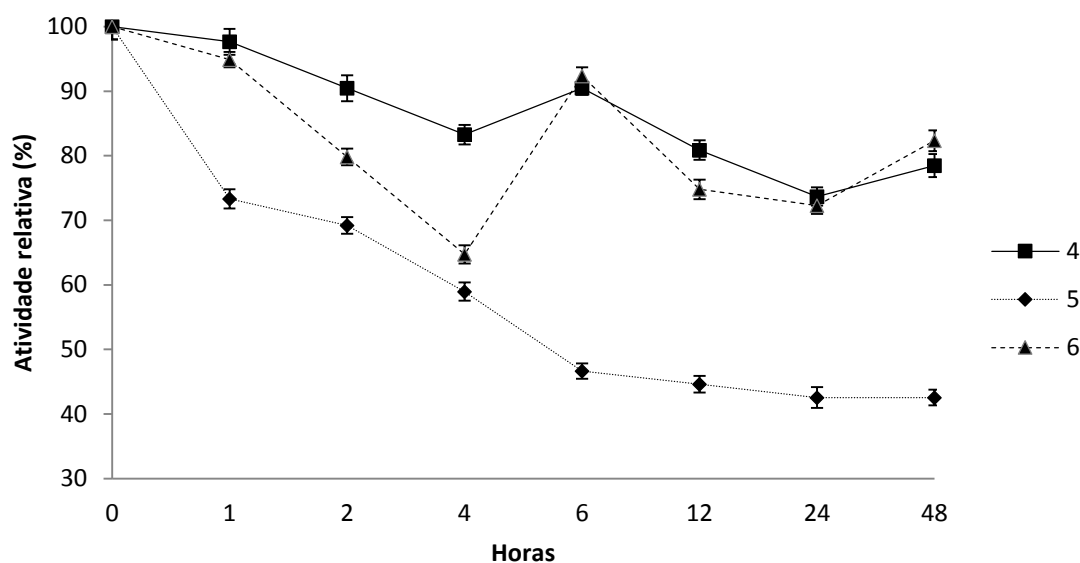


Figura 33 - Estabilidade das enzimas com atividade de β -glicosidase presentes no MM/FT/BGL nos pHs de 4 a 6.

A termoestabilidade das β -glicosidases em diferentes temperaturas demonstrou que na temperatura de 50°C, após a primeira hora do ensaio a enzima manteve a atividade em 91,07%, declinando para 46,36% no final do ensaio de 48 horas. À temperatura de 60°C, o declínio de atividade na primeira hora foi de 59,09%, chegando ao final do ensaio com 38,61%; com 70°C, a atividade na primeira hora foi de 74,89%, chegando à sexta hora com 57,26% e a partir da décima segunda hora foi inativada; com isso, ao final do ensaio de 48 horas, na temperatura de 50°C, a atividade enzimática foi de 46,36%; a 60°C, a atividade foi de 38,61% e inativou totalmente a 70°C. Resultado muito próximo ao de Farinas *et al.*(2010), em seu ensaio de 96 horas com enzima produzida por *A.niger*, na temperatura de 50°C, onde ao final do ensaio a enzima manteve 50% da atividade enzimática inicial, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo.

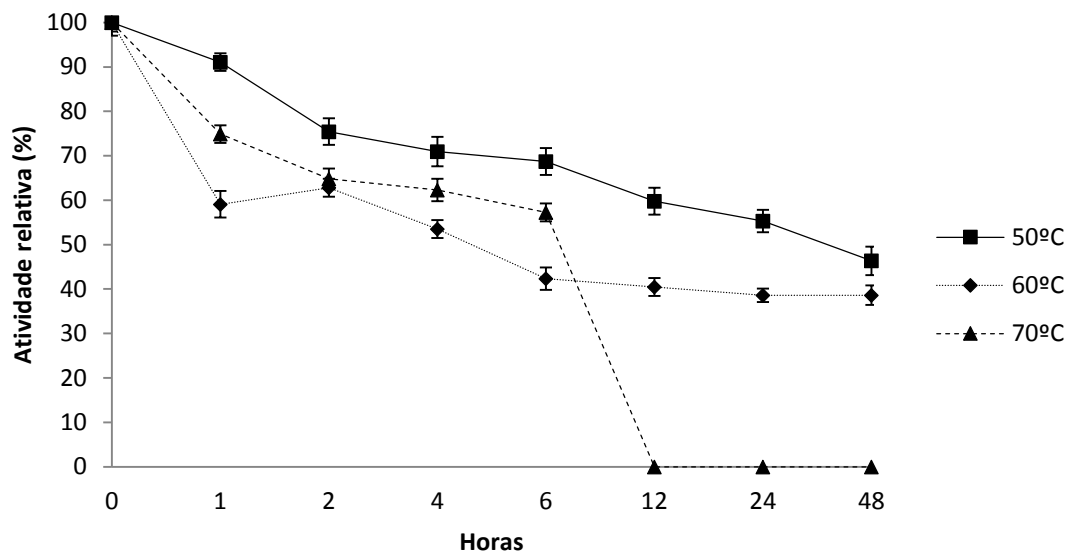


Figura 34 - Estabilidade das enzimas com atividade de β -glicosidase presentes no MM/FT/BGL nas temperaturas de 50, 60 e 70°C.

Os dados da estabilidade do pH são importantes para visualizar que, nem sempre o pH em que ocorre a maior atividade é o pH adequado para utilização em um processo biotecnológico. Fato este que pode ser notado com os ensaios realizados neste trabalho, onde apenas a enzima xilanase teve o pH em que houve a maior atividade enzimática a sua estabilidade mantida até o final do ensaio; as atividades das enzimas FPase, CMCase e β -Glicosidase, o pH em estas enzimas que mantiveram a maior atividade foram os pH correspondendo a um ponto acima do pH com maior atividade, e da Avicelase um ponto abaixo.

4.5 INFLUÊNCIA DE ÍONS, GLICOSE, XILOSE E CELOBIOSE NA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE.

A β -glicosidase têm a propriedade de hidrolisar celobiose (gerada pelas celobiohidrolases e endoglicanases) e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose. As β -Glicosidases também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose (LYND *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2004). Esse fato pode ser observado na figura 35, no qual o aumento da concentração da glicose diminuiu a atividade da enzima β -Glicosidase, chegando 43,69% de atividade enzimática na concentração de 600 mM. Esse tipo de inibição,

pelo produto, é comum segundo Yan *et al.* (1998). Em relação à adição de xilose no meio reacional, até a concentração de 200 mM, a atividade da enzima variou entre 53, 47, 55 e 49% nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 mM respectivamente; com 300 e 400 mM, a sua atividade subiu para 73 e 71% respectivamente, voltando a cair com 500 e 600 mM, com atividade de 63 e 49% respectivamente. A celobiose na concentração de 10 mM reduziu a atividade da enzima para 63%, porém na concentração de 50 mM essa atividade aumentou para 85% e começou a cair a partir de 100 mM, chegando à concentração final de 600 mM com atividade de 55%.

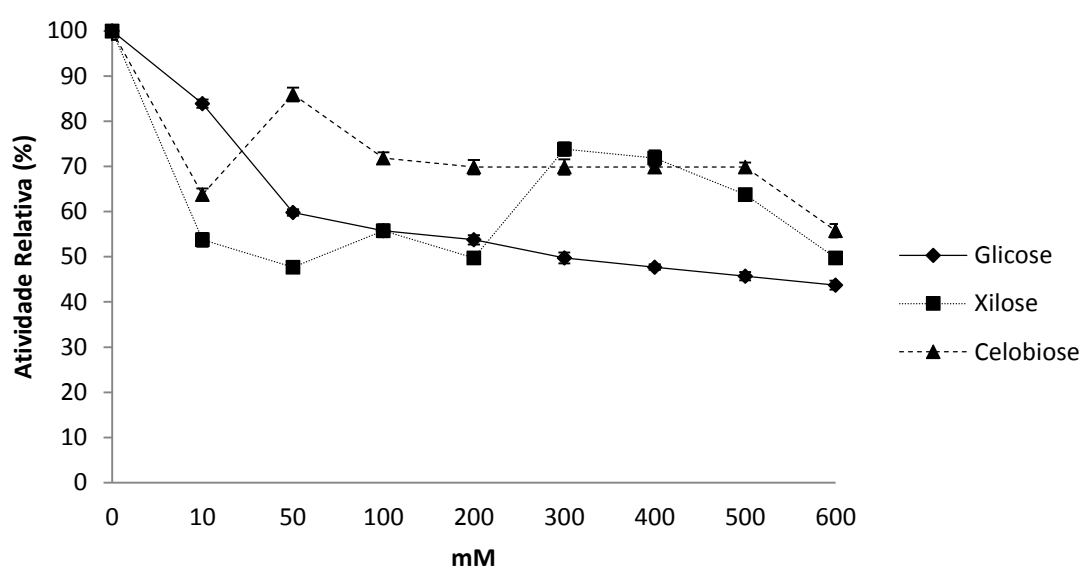


Figura 35 - Influência de glicose, xilose e celobiose na atividade das β-glicosidases secretadas pelo fungo *A. niger* IFBMD01 (MM/FT/BGL).

Na tabela 4, observou-se que todos os íons induziram a atividade da enzima β-glicosidase, chegando a 132,8% com $MnCl_2$ e $BaCl_2$. A presença de EDTA não inibiu a atividade enzimática, pelo contrario, induziu a atividade, todavia deve ser citado que o EDTA foi adicionado somente na reação analítica sem a presença de qualquer outro íon, resultados semelhantes aos descritos por Ramani *et al.* (2012), que utilizaram a β-glicosidase, produzida pelo fungo *Penicillium funiculosum* NCL1, porém com resultado um pouco diferente para Liu *et al.* (2012), que tiveram inibição da β-glicosidase, produzida pelo fungo *A. fumigatus* Z5 pelos íons Co, Mn e EDTA, sendo que os demais íons aumentaram a atividade da enzima β-glicosidase. Esses resultados

podem auxiliar na otimização da reação da enzima β -Glicosidase em uma escala industrial.

Tabela 4. Influência de íons na atividade das β -glicosidases secretadas pelo fungo *A. niger* IFBMD01 (MM/FT/BGL).

Íons	Porcentagem de atividade de β-Glicosidase $\pm$ desvio padrão
Controle	100,00 $\pm$ 0,9
MnCl ₂	132,80 $\pm$ 0,6
NH ₄ Cl	119,28 $\pm$ 0,4
KCl	109,62 $\pm$ 0,4
MgCl ₂	127,01 $\pm$ 0,7
CaCl ₂	113,48 $\pm$ 0,5
BaCl ₂	132,80 $\pm$ 0,8
AlCl ₃	121,21 $\pm$ 1,0
NaCl	121,21 $\pm$ 1,1
CoCl ₂	128,94 $\pm$ 1,0
EDTA	119,28 $\pm$ 0,9

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

4.6 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS PELO ISOLADO IFBMD01.

Nas figuras 36 e 37, observa-se o perfil de proteínas presentes no sobrenadante de cultura do fungo *A. niger* IFBMD01 cultivado em meio MM/FT por 3 e 6 dias, como descrito anteriormente nos resultados após três dias foi observado o pico de atividade de xilanase (MM/FT/XIL) e após seis dias o de CMCase (MM/FT/CMC).

Na figura 36 as proteínas presentes nos sobrendantes foram analisadas por SDS-PAGE e Zimograma para CMCase sendo que no pocinho 01 da figura 36A (MM/FT/XYL) detectou-se proteínas com massas moleculares aproximadas de 54, 34, 32 e 30 kDa e no pocinho 02 bandas de atividade para CMCase correspondendo a proteínas com massas moleculares de 39 e 31 kDa. Os resultados sugerem que a proteína de 31 kDa presente no sobrenadante trata-se de uma enzima com atividade de celulase e que há ainda no sobrenadante uma proteína de 39 kDa com atividade de celulase que está sendo secretada pelo fungo em baixa concentração. Anteriormente, foi analisado o comportamento das enzimas com atividade de CMCase secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01 (MM/FT/CMC) em diferentes valores de pH (Figura 19). Nesta figura podemos dois picos de atividade, sugerindo a presença de diferentes

celulases no sobrenadante que apresentavam comportamentos distintos nas diferentes faixas de pH, o que pode ser confirmado nesse zimograma (Figura 36A).

Na Figura 36B (MM/FT/CMC) observa-se no pocinho 01 bandas de proteínas com massas moleculares aproximadas de 66, 36, 32 e 30kDa e no pocinho 04 bandas de atividade para CMCase correspondendo a proteínas com massas moleculares de 44, 41, 36 e 34 kDa. Os resultados sugerem que a proteína de 36 kDa presente no sobrenadante tem atividade de celulase e que há ainda no sobrenadante as proteínas de 44, 41 e 34 kDa com atividade de celulase que está sendo secretada pelo fungo em baixa concentração. Os resultados obtidos demonstram há uma variação grande do perfil de celulases secretadas pelo fungo de acordo com o tempo de cultivo.

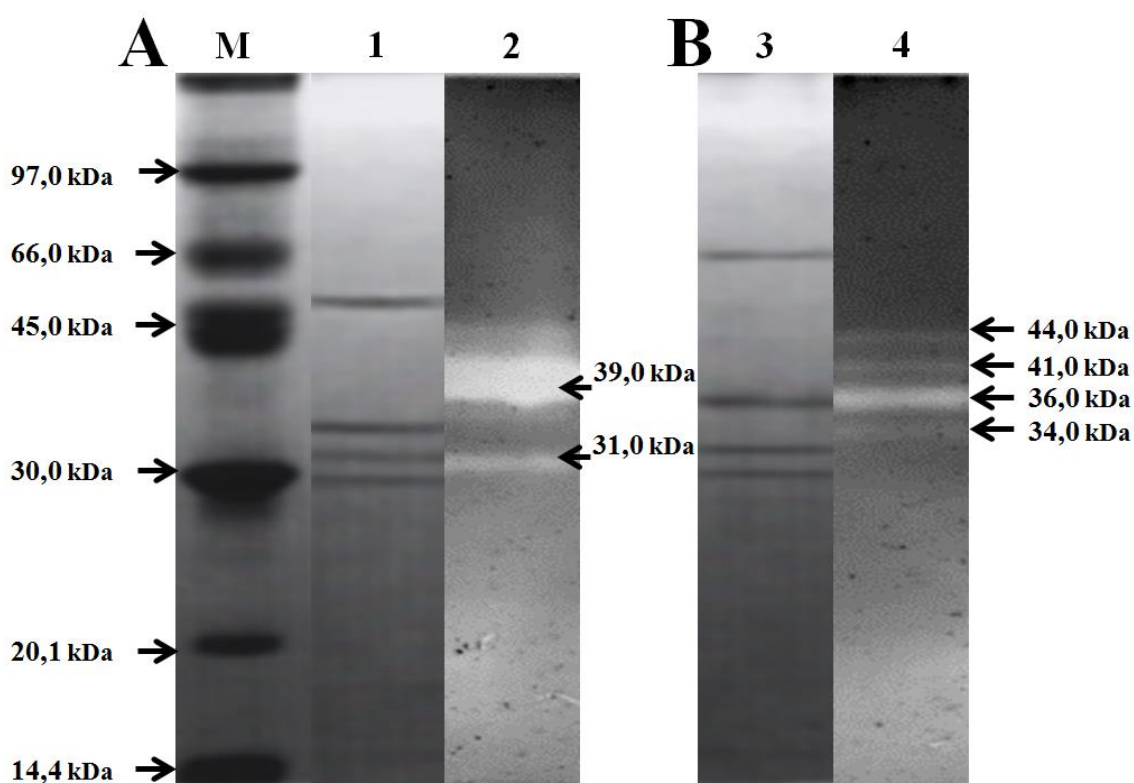


Figura 36 - Análise eletroforética das proteínas presentes no MM/FT/XIL e MM/FT/CMC por SDS-PAGE e Zimograma para atividade de CMCase. A. MM/FT/XIL: M. marcador de massa molecular Amersham™AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare), 1. SDS-PAGE e 2. Zimograma. B. MM/FT/CMC: 1. SDS-PAGE e 2. Zimograma.

Cepas de *A.niger* produzem vários tipos de celulases, dependendo da composição do substrato (NCUBE *et al.*, 2012), isso é observado quando comparado os resultados,

aqui apresentados, com os de Ncube *et al.* (2012), que utilizaram como substrato a torta da semente de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) obtendo seis tipos de celulasas com as massas moleculares variando entre 20 a 43 kDa; Delabona *et al* (2012a) relataram três celulasas quando utilizaram farelo de soja e farelo de trigo como substrato e apenas uma celulase quando utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato, utilizando *A. fumigatus* como produtor, as massas moleculares não foram detalhadas. Esses resultados corroboram com os encontrados nesse estudo e justifica o estudo de vários tipos de substrato e diferentes tempod e cultivo.

Na figura 37 as proteínas presentes nos sobrendantes foram analisadas por SDS-PAGE e Zimograma para xilanase. Na figura 37A (MM/FT/XYL) observa-se no pocinho 01 bandas de proteínas com massas moleculares aproximadas de 54, 34, 32 e 30 kDa e no pocinho 02 bandas de atividade para xilanase correspondendo a proteínas com massas moleculares de 33 e 25 kDa. Os resultados sugerem que as proteínas de 33 e 25 kDa presentes no sobrenadante tratam-se de enzimas ativas contra xilana “oat spelt” e que foram secretadas pelo fungo em baixa concentração. Na Figura 37B (MM/FT/CMC) observa-se no pocinho 01 bandas de proteínas com massas moleculares aproximadas de 66, 36, 32 e 30 kDa e no pocinho 02 bandas de atividade para CMCase correspondendo a proteínas com massas moleculares de 66, 56, 45, 31 e 22 kDa. Os resultados sugerem que a proteína de 66 kDa é ativa contra xilana “oat spelt” e que há ainda no sobrenadante as proteína de 56, 45, 31 e 22 kDa com atividade de xilanase que estão sendo secretadas pelo fungo em baixa concentração. Os resultados obtidos demonstram há uma variação grande do perfil de xilanases secretadas pelo fungo de acordo com o tempo de cultivo, como observado para as celulasas.

Delabona *et al.* (2012b), utilizaram três tipos de substratos para a indução da produção de xilanase em cepas de *Aspergillus sp.*, sendo eles farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram diferentes isoformas de xilanases no sobrenadante; Ncube *et al* (2012), reportaram apenas uma xilanase, utilizando *A.niger* como produtor e torta da semente de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) como substrato, com massa molecular de 31 kDa. Esses resultados aproximam dos encontrados nesse estudo, e corroboram com a justificativa de utilizar vários tipos de fontes de carbono para a indução dessa enzima.

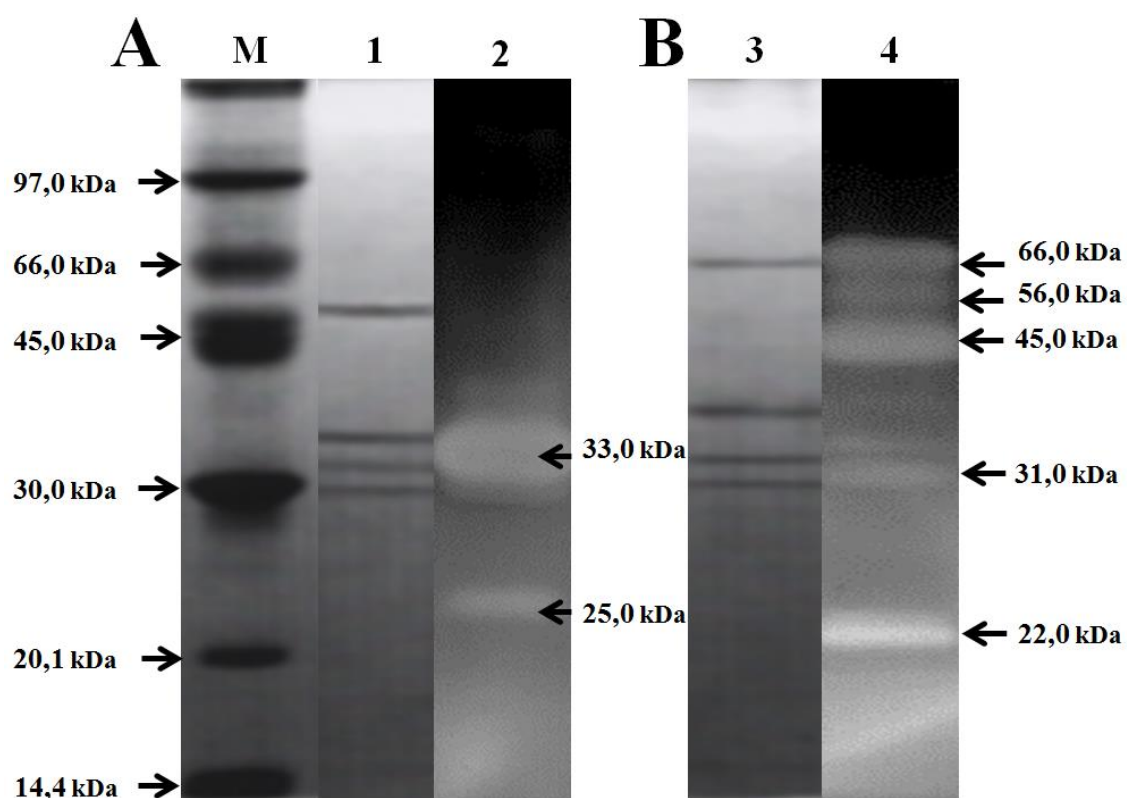


Figura 37- Análise eletroforética das proteínas presentes no MM/FT/XIL e MM/FT/CMC por SDS-PAGE e Zimograma para atividade de xilanase. A. MM/FT/XIL: M. marcador de massa molecular AmershamTMAMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare), 1. SDS-PAGE e 2. Zimograma. B. MM/FT/CMC: 1. SDS-PAGE e 2. Zimograma.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados MD01, MD03, MD 04 e MD 08 apresentaram os maiores índices de produção de celulases.
- O isolado MD01 se destacou na produção de xilanases e CMCase, quando cultivado em FT.
- Os resultados obtidos demonstraram que a seleção de fungos celulolíticos, do solo do Bioma Cerrado, pode ser realizada pelo método de atividade em placa, o que diminui o tempo de investigação para identificar os fungos celulolíticos.
- A análise taxonômica por morfologia e análises moleculares indicou que o isolado MD01 é *Aspergillus cf niger*, passando a ser denominado *A.niger* IFBMD01.
- No cultivo do fungo em meio MM/FT o pico de produção de FPase foi detectado após 168 horas de cultivo, de xilanase após 72 horas, de CMCase e β -glicosidase após 144 horas e de Avicelase após 216 horas.
- As FPases secretadas pelo fungo cultivado em MM/FT por 168 horas (MM/FT/FPA) apresentaram pH ótimo de 5,5; temperatura ótima de 60°C e mantiveram-se estáveis entre os pHs 4,5 a 6,5 por 48 horas em temperaturas de 50 e 60 °C por 48 horas.
- As CMCase secretadas pelo fungo cultivado em MM/FT por 144 horas (MM/FT/CMC) apresentaram pH ótimo de 5; temperatura ótima de 70°C e mantiveram-se 40% de sua atividade enzimática em pHs 5 e 6 durante 2 horas em temperaturas de 60 e 70 °C por 2 horas.
- As Avicelase secretadas pelo fungo cultivado em MM/FT por 216 horas (MM/FT/AVI) apresentaram pH ótimo de 5,5; temperatura ótima de 60°C e mantiveram-se estáveis no pH 4,5 durante 1 hora em temperatura de 50 °C por 1 horas.
- As xilanase secretadas pelo fungo cultivado em MM/FT por 72 horas (MM/FT/XIL) apresentaram pH ótimo de 5; temperatura ótima de 50°C e mantiveram-se 40% da atividade enzimática em pH 5 durante 48 horas em temperaturas de 40 e 50 °C por 1 horas.
- As β -glicosidase secretadas pelo fungo cultivado em MM/FT por 144 horas (MM/FT/BGL) apresentaram pH ótimo de 5; temperatura ótima de 60°C e mantiveram-se 80% da atividade enzimática nos pHs 4 e 6 durante 48 horas em temperaturas de 50 e 60 °C por 48 horas.

- A glicose, xilose e celobiose diminuíram a atividade enzimática da β -glicosidase em até 50% na concentração de 600 mM.
- Os íons Mn, NH_4 , K, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na e Co^{2+} e EDTA, aumentaram a atividade enzimática da β -Glicosidase entre 9 a 32,8%.
- A análise das proteínas secretadas pelo fungo por SDS-PAGE e Zimograma demonstrou após 3 e 6 dias de cultivo do fungo em MM/FT há a secreção de uma grande variedade de proteínas com atividade de celulase e xilanase apresentando massas moleculares entre 22 e 66 kDa, sendo que após 6 dias há um número maior de enzimas produzidas e secretadas pelo fungo.

6 PERSPECTIVAS

- Incorporar alterações na fonte de nitrogênio aos protocolos vigentes para a seleção de microrganismos produtores de celulasas.
- Verificar novos tipos de substratos, como palha de milho, engaço de dendê, casca de coco, etc, como fonte de carbono para a produção de enzimas lignocelulolíticas.
- Realizar o processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o sobrenadante de cultura produzido neste trabalho.
- Purificação das enzimas do sobrenadante de cultura.
- Analisar a termostabilidade em temperaturas abaixo das que foram estudadas.
- Análise de gel de atividade para β -Glicosidase.
- Indução da produção de enzimas lignocelulíticas por fermentação sólida.

7 BIBLIOGRAFIA

ABARCA M.L., ACCENSI F., CANO J., CABANES, F.J.. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*; 86: 33_49, 2004.

AINSWORTH, G.C..Introduction to the History of Mycology. Cambridge, Cambridge University Press. 1976.

AL-MUSALLAM, A. Revision of the black *Aspergillus* species.PHD thesis Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht, 1980.

BAFFI, M.A., SÁNCHEZ, S.R., IRANZO, J.U., PEREZ, A.I.B., Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *New Biotechnology*.29, 451-456, 2012.

BALAJEE, S.A.; BORMAN, A.M.; BRANDT, M.E. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *Journal Clinical Microbiology*, vol.47, 877–884, 2009.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S.K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 2012.

BASTAWDE, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action.*World J. of Microbiol.and Biotechnol.*, 8: 353-368, 1992.

BAYER, E.A. & LAMED, R.. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Review Biodegradation*, 3(2-3): 171-88, 1992

BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 326–338, 2001.

BÉGUIN, P. & AUBERT, J.P.The biological degradation of cellulose.*FEMS Microbiological Reviews*, 13: 25-58, 1994.

BENNETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*.*Aspergillus molecular biology and genomics*, 2010.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology.*Biotechnol. Advances*, 18: 355-83, 2000.

- BRIJWANI, K., OBEROI, H.S., VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.* 45, 120–128, 2010.
- CAMACHO, N.A & AGUILAR, G.O. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus sp* and its application in baking. *Applied biochemistry and biotechnology*, 104:159-171, 2003.
- CARROLL, G.C., WICKLOW, D.T. *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1992.
- CARVALHO, W.R. Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP. 2003.
- COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 5-23, 2005.
- COSTON, M.B.; LOOMIS, JR, W.F. Isozymes of β -glucosidase in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Bacteriology*, p.1208-1217, 1969.
- COUGHLAN, M.P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: *Xylans and xylanases*. (Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van Someren, M.A. & Voragen, A.G.J., eds.), Elsevier, Amsterdam. p. 111-139, 1992.
- COULON, S.; CHEMARDIN, P.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 74:105-114, 1998.
- CUNHA, F.M., ESPERANÇA, M.N., ZANGIROLAMI, T.C., BADINO, A.C., FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. *Bioresource Technology*, 112, 270-274, 2012.
- DAROIT, D.J. Caracterização de uma β -Glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2007.
- DEAN, T.R., ROOP, B., BETANCOURT, D., MENETREZ, M.Y. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *J Microbiol Meth* 2005; 61: 9_16, 2005.

- DE PAULA, E. H.; FARIA, F. P.; BARBOSA, C. D.; CORNELIO, I. N.; PEREIRA, L. R. & AZEVEDO, M. O. Sacarificação de Compostos Lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Anais da Enzitec, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.
- DELABONA, P.S., PIROTA, R.D.P.B., CODIMA, C.A., TREMACOLDI, C.R., RODRIGUES, A., FARINAS, C.S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and bioenergy*, 37, 243-250, 2012a.
- DELABONA, P.S., PIROTA, R.D.P.B., CODIMA, C.A., TREMACOLDI, C.R., RODRIGUES, A., FARINAS, C.S. Effect initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*.42, 236-242, 2012b.
- DHILLON, G.S., KAUR, S., BRAR, S.K., VERMA, M. Potencial of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulose and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation.38, 6-13, 2012.
- DILLON, A.J.P. Celulases. In: Said, S. & Pietro, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ed. Leigis Summa, Ribeirão Preto, 2004.
- DUSTERHOFT, E.M., LINSSEN, V.A.J.M., VORAGEN, A.G.J., BELDMAN, G. Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 437, 1997.
- ELISASHVILI, V.L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. *Applied Biotechnology and Microbiology*, New York, v. 29, p. 257-266, 1993
- FALKOSKI, D.L.; GUIMARAES, V.M.; ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; REZENDE, S.T. *Crysoporthe cubensis*: A new source of celluloses and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, vol.130, p. 296-305, 2013.
- FANG, H., ZHAO, C., SONG, X.Y., Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulose from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger*

NL02. Bioresource Technology. 101, 4111-4119, 2010.

FARINAS, C.S., LOYO, M.M., JUNIOR, A.B., TARDIOLI, P.W., NETO, V.B., COURI, S. Finding stable cellulose and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. New Biotechnology.27, 810-815, 2010.

FENGEL, D. & WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de American Chemical Society, p. 26–31, 1992. Artemd, 2005.

FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudo Koningii* Var. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

GAO, J., WENG, H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F., XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungus *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. Bioresour. Technol. 99, 7623–7629, 2008.

GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., KUMAR, D.G., RAVIKUMAR, G., KALAISELVI, M. UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S67-S73, 2012.

GOMES, D. J., GOMES, J., STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. J. Biotechnol., 33: 87-94, 1994.

GRUPPEN, H., KORMELINK, J.M., VORAGEN, A.G.J. Enzymic degradation of Water-unextractable cell wall material and arabinoxylans from Wheat Flour. Journal of Cereal Science, 18: 129-143. 1993.

HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. Bioresource Technology, 58:137-161, 1996.

HAMZA, M., KHOUFI, S., SAYADI, S. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. Food Chemistry, 131, 1430-1436, 2012.

HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev. 14, 1–49, 1950.

JANES, R.L. The chemistry of wood and fibres. In: The pulping of wood. MacDonald, R.G. & Franklin, J.N. Mc Graw-Hill, New York, USA, 1969.

- JOHNSON, E.R., SAKAJOH, M., HALLIWELL, G., MADIA, A., DEMAINE, A.L. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulose system from *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 43, p. 1125-1132, 1982.
- JUN, H.; BING, Y.; KEYING, Z.; XUEMEI, D.; DAIWEN, C. Thermostable carbohydrate binding module increases the thermostability and substrate-binding capacity of *Trichoderma reesei* xylanase 2. *New Biotechnology*, vol.26, p.53-59, 2009.
- KAMAL, K.B., BALAKRISHNAN, H., RELE, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Epub ahead of print, 2004.
- KANG, S.W., PARK, Y.S., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour.Technol.* 91, 153–156, 2004.
- KARLOVSKY, P. Secondary metabolites in soil ecology. *Soil Biology*, vol 14, 2008.
- KATAPODIS, P., NERINCKX, W., CLAEYSSSENS, M., CHISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular bxylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Process Biochem.* 41, 2402–2409, 2006.
- KAUR, S., DHILLON, G.S., BRAR, S.K., CHAUHAN, V.B. Carbohydrate degrading enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation. *Ind. Crops Prod.* 36, 140–148, 2012.
- KIEHL, E.J. Fertilizantes orgânicos. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1985.
- KIMURA, M.A. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* v.16, p.111-120, 1980.
- KLEMAN-LEYER, K.M., SIIKA-AHO, M., TEERI, T.T., KIRK, T.K. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 62, p.2883-2887, 1996.

- KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; PENTTILA, M.; TEERI, T.; HARKKI, A. & SALOVUORI, I. The cellulase genes of *Trichoderma*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(5): 335-41. 1987.
- KOVÁCS, K., SZAKACS, G., ZACCHI, G. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresour. Technol.* 100, 1350–1357, 2009.
- KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Reviews*, 23:411-456, 1999.
- KULP, K. Enzymolysis of pentosans of wheat flour. *Cereal Chemistry*. v.45, p.339–350, 1968.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- LEE, C.K., DARA, I., IBRAHIM, C.O. Production and optimization of cellulose enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. *Biotechnology Research International*, vol.2011, 2010.
- LIN, Y. & TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627-642, 2006.
- LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol 65, p. 717-725, 2011.
- LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y., SHEN, Q. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, p 11-25, 2012.
- LOCKINGTON, R.A., RODBOURN, L., BARNETT, S., CARTER, C.J., KELLY, J.M. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 190–196, 2002.

- LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology .Microbiology and molecular biology reviews, 66: 506-577, 2002.
- MANDELS, M. & PARRISH, F.W. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei*. J. Bacteriol., 83: 400-408, 1962.
- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in fungus by cellobiose. J. Bacteriol., 79 (6): 816-826. 1960.
- MANN, S. O. An improved method for determining cellulolytic activity in anaerobic bacteria. J. Appl. Bacteriol. 31, 241–244, 1968.
- MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. International Biodeterioration & Biodegradation., vol.78, p. 24-33, 2013.
- MCDONALD, J.E.; ROOKS, D.J; MCCARTHY, A.J. Methods for the isolation of cellulose-degrading microorganisms. Methods in Enzymology, vol.510, 2012
- MILAGRES, A.M.F. & PRADE, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. Enzyme and Microbial Technology, 16:627-632, 1994.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chem. 31: 426-428, 1959.
- MOREIRA, F.M. S; SIQUEIRA J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 2006.
- MOSSEREY R. Les *Aspergillus* de la section ‘Niger’ Thom and Church. La Cellule; 43: 203_285, 1934.
- NAIR, S.G., SINDHU, R., SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. African Journal Microbiology, vol. 2, p.82–86, 2008.
- NCUBE, T., HOWARD, R.L., ABOTSI, E.K., RENSBERG, E.L.J., NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by

Aspergillus niger FGSCA733 in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 37, 118-123, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Princípios da Bioquímica*. Editora Sarvier, São Paulo, 4ªEd.,2006.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*, 2011.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74:69-80, 2000.

PARENICOVA, L.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R.A.; ROSSEN, L.; VISSER, J. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p413-424, 2000.

PARKINSON, D., GRAY, T. R. G., WILLIAMS, S.T. *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Oxford, Blackwell Scientific Publications. p.116, 1971.

PITT, J.I.A. *Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species*. CSIRO, Food Research Laboratory, North Ryde, Austrália, 1988.

POLIZELI, M.L., RIZZATTI, A.C., MONTI, R., TERENCEI. H.F., JORGE J.A., AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591, 2005.

POLONELLI L, CASTAGNOLA M, D'URSO C, MORACE G. Serological approaches for identification of *Aspergillus* and *Penicillium* strains. In: Samson RA, Pitt JI (eds). *Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics*. New York: Plenum Press, 267_279, 1985.

PONTECORVO, G., ROPER, J., HEMMONS, L.H., MCDONALD, BUFTON, W. J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238, 1953.

RAEDER, J., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v.1, p. 17-20, 1985.

- RAMANI, G.; MEERA, B.; VANITHA, C.; RAO, M.; GUNASEKARAN, P. Production, purification, and characterization of β -glucosidase of *Penicillium finiculosum* NCL1. *Appl Biochem Biotechnol*, v.167, p.959-972, 2012.
- RAPER, K.B., FENNELL, D.I. *The Genus Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965.
- RIOU, C.; SALMON, J.M.; VALLIER, M.J.; GÜNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.64, p.3607-3614, 1998.
- ROWELL MR. Opportunities for lignocellulosic materials and composites. Emerging technologies for material and chemicals from biomass: Proceedings of symposium. Washington, DC: American Chemical Society, p. 26–3, 1992.
- RYTTERSGAARD, C., LO LEGGIO, L., COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B., LARSEN, S. *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A, *Biochemistry* 41: 15135–15143, 2002.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p. 406-425, 1987.
- SALOHEIMO, M; NAKARI-SETÄLÄ, T; TENKANEN, M; PENTTILÄ, M., cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast, *European Journal of Biochemistry*, v.249, p.584-591, 1997.
- SAMSON, R.A., HOUBRAKEN J.A.M.P., KUIJPERS A.F.A., FRANK M.J., FRISVAD J.C. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri . *Stud Mycol*; 50: 45_61, 2004.
- SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*, vol.59, 129–146, 2007.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advance*, vol.27(2), p.185-94, 2009.

- SANDGREN, M., SAHLBERG, J., MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, 89: 246-291. *Sci. Technol.*, 1: 45-70, 2005.
- SANTOS, F.A., QUEIRÓZ, J.H., COLODETTE, J.L., FERNANDES, S.A., GUIMARÃES, V.M., REZENDE, S.T. Pontencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol. *Química Nova*, vol. 35, n.5, p. 1004-1012, 2012.
- SHAH, A.R., SHAH, R.K., MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 97: 2047-2053, 2006.
- SHINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., RAJASREE, K.P., MATHEW, A., GOTTUMUKKALA, L., PANDEY, A. Properties of a major B-glicosidase-BGL 1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, 46, 1521-1524, 2011.
- SMITH, J.E., ANDERSON, J.G., SENIOR, E.K., Bioprocessing of lignocelluloses. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London*, v.321, p.507-521, 1987.
- SOHAIL, M., SIDDIQI, R., AHMAD, A., KHAN, S.A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, 25, 437-441, 2009.
- STEWART, J.C.; PARRY, J.B. Factors Influencing the Production of Cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). *Journal of General Microbiology*, vol. 125, p.33-39, 1981.
- SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1):33-64, 2002.
- SUNNA, A., & ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17: 39-67, 1997.
- SUTO, M., & TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 305-311, 2001.
- TAKENAKA, A., COLIN, G.D., KUDO, H., ITABASHI, H., CHENG, K. Molecular cloning, expression, and characterization of an endo- β -1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45: 57-61, 1999.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, 1596-1599, 2007.

TEATHER, R.M. & WOOD, P.J. Use of Congo Red polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 777-780, 1982.

TEERI, T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of Cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15:160–7, 1997.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, N.S. Hemicellulose as a biomass resource. In: *Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals*. Soltes, J. (ed), J. New York, Academic Press, p. 101-119, 1983.

TIKHOMIROV, D.F., SINITSYN, A.P., ZOROV, I.N., WILLIAMS, C. Non-starch polysaccharide hydrolysing microbial enzymes in grain processing In: *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing* (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A., Eds.), pp. 413–418. Kat. Univ. Leuven, Leuven, 2003.

TIMELL, T.E. Recent Progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood*, 1967.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre, 2005.

TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Purdue University Lafayette Indiana : Department of Botany and Plant Pathology, p.239, 1969.

VARGA, J.; KOCSUUBE, S.; TOTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp.nov.. a biserial black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, p. 1925-1932, 2007.

VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. Xylanases in bleaching: from anidea to the industry. *FEMS Microbiol.Rev.*, v.13, p. 335-50, 1994.

- WANG, B., XIA, L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. *Bioresource Technology*, 102, 4568-4572, 2011.
- WANG, P., ALI, S., MASON, J.C., SIMS, P.F.G., BRODA, P. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*, in *Xylans and Xylanases*. Visser, J.; Kusters-van Someran, M. A. & Voragen, A. G. J. Eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam BV, p. 225, 1992.
- WANG, X.J., BAI, J.G., LIAN, Y.X. Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 533–540, 2006.
- WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, vol.52, p.305-317, 1988.
- WOODWARD, J. & WISEMAN, A. Fungal and other α -D-glucosidases their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 73-79, 1982.
- XU, Y.X.; LI, Y.L.; XU, S.C.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J.W. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University*, p558-566, 2008.
- YAN, T. R.; LIN, Y. H.; LIN, C. L. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 46, p. 431-437, 1998.
- ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

Anexo I

Tabela 01. Comparação entre os tipos de substratos independentes do microrganismo

	BCA(U/mL)	CMC(U/mL)	FT(U/mL)
FPASE	0,051 a*	0,068a	0,096b
CMCASE	0,971a	1,486a	3,441b
AVICELASE	0,008a	0,011b	0,009ab
XILANASE	8,22ab	3,50a	21,59b
β -GLICOSIDASE	0,58a	0,44a	0,57a

BCA – bagaço de cana de açúcar; FT – farelo de trigo; CMC – carboximetilcelulose

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 02. Comparação entre a produção das enzima celulolíticas pelo isolado MD01 frente a diferentes substratos

	BCA (U/mL)	CMC (U/mL)	FT (U/mL)
FPASE	0,046a*	0,052a	0,159b
CMCASE	1,133a	0,940a	7,212b
AVICELASE	0,008a	0,010ab	0,012b
XILANASE	4,93a	2,54a	34,33b
β -GLICOSIDASE	0,90a	0,80a	0,89a

BCA – bagaço de cana de açúcar; FT – farelo de trigo; CMC – carboximetilcelulose

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 03. Comparação entre a produção das enzimas celulolíticas pelo isolado MD03 frente a diferentes substratos

	BCA(U/mL)	CMC(U/mL)	FT(U/mL)
FPASE	0,047a*	0,051a	0,055a
CMCASE	0,449a	0,959a	1,543a
AVICELASE	0,009a	0,011a	0,010a
XILANASE	3,56a	1,86a	2,34 a
β -GLICOSIDASE	0,35a	0,30a	0,40a

BCA – bagaço de cana de açúcar; FT – farelo de trigo; CMC – carboximetilcelulose

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 04. Comparação entre a produção das enzimas celulolíticas pelo isolado MD04 frente a diferentes substratos

	BCA(U/mL)	CMC(U/mL)	FT(U/mL)
FPASE	0,055a*	0,065a	0,065a
CMCASE	0,849a	1,087a	1,657a
AVICELASE	0,009a	0,009a	0,009a
XILANASE	0,64 a	0,23a	0,51a
β-GLICOSIDASE	0,50a	0,37a	0,45a

BCA – bagaço de cana de açúcar; FT – farelo de trigo; CMC – carboximetilcelulose

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 05. Comparação entre a produção das enzimas celulolíticas pelo isolado MD08 frente a diferentes substratos

	BCA(U/mL)	CMC(U/mL)	FT(U/mL)
FPASE	0,057a*	0,103a	0,107a
CMCASE	1,453a	2,958a	3,355a
AVICELASE	0,009a	0,013b	0,009a
XILANASE	7,33a	1,63a	6,5a
β-GLICOSIDASE	0,60a	0,30a	0,55a

BCA – bagaço de cana de açúcar; FT – farelo de trigo; CMC – carboximetilcelulose

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 06. Comparação entre os microrganismos em relação ao teste de produção enzimática independente do substrato

	MD01 (U/mL)	MD03 (U/mL)	MD04 (U/mL)	MD08(U/m L)
FPASE	0,086b*	0,050a	0,062ab	0,088b
CMCASE	3,095c	0,983a	1,197ab	2,588bc
AVICELASE	0,010a	0,009a	0,008a	0,010a
XILANASE	27,45 b	5,57a	0,9a	11,39ab
β-GLICOSIDASE	0,86c	0,35a	0,44ab	0,48b

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 07. Comparação entre a produção de enzimas por cada microrganismo, na presença de BCA

	MD01 (U/mL)	MD03 (U/mL)	MD04 (U/mL)	MD08 (U/mL)
FPASE	0,046a*	0,047a	0,055a	0,057a
CMCASE	1,133a	0,449a	0,849a	1,453a
AVICELASE	0,009a	0,009a	0,009a	0,009a
XILANASE	4,93 a	3,56a	0,61a	7,33a
β-GLICOSIDASE	0,90b	0,35a	0,50ab	0,60ab

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 08. Comparação entre a produção de enzimas por cada microrganismo, na presença de CMC

	MD01 (U/mL)	MD03 (U/mL)	MD04 (U/mL)	MD08 (U/mL)
FPASE	0,053a*	0,051a	0,065a	0,103a
CMCASE	0,940a	0,959a	1,087a	2,958a
AVICELASE	0,011ab	0,011ab	0,009a	0,013b
XILANASE	2,54a	1,86a	0,23a	1,63a
β-GLICOSIDASE	0,80a	0,30a	0,37a	0,30a

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 09. Comparação entre a produção de enzimas por cada microrganismo, na presença de FT

	MD01 (U/mL)	MD03 (U/mL)	MD04 (U/mL)	MD08 (U/mL)
FPASE	0,159b*	0,055a	0,065a	0,107ab
CMCASE	7,212b	1,543a	1,657a	3,355a
AVICELASE	0,012b	0,010ab	0,009a	0,009a
XILANSE	34,39b	2,34a	0,51a	6,5a
β-GLICOSIDASE	0,89a	0,40a	0,45a	0,89a

*Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo Teste de Tukey.