

**UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
EXTRATO CELULOLÍTICO PRODUZIDO POR LINHAGEM
FÚNGICA MUTANTE**

ALEX DA SILVA SANTOS

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
EXTRATO CELULOLÍTICO PRODUZIDO POR LINHAGEM
FÚNGICA MUTANTE**

ALEX DA SILVA SANTOS

Sob a Orientação da Professora
Mônica Caraméz Triches Damaso

e Co-orientação da Professora
Sonia Couri

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Tecnologia de Alimentos.

SEROPÉDICA, RJ
FEVEREIRO DE 2011

660.634
S237p
T

Santos, Alex da Silva, 1979-

Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante / Alex da Silva Santos - 2011.

93 f.: il.

Orientador: Mônica Caraméz Triches Damaso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 61-69.

1. Enzimas - Aplicações industriais - Teses. 2. Celulase - Teses. 3. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Damaso, Mônica Caraméz Triches, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

ALEX DA SILVA SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM28 / 02 / 2011

Mônica Caraméz Triches Damaso. D.Sc. Embrapa sede
(Orientador)

Aline Machado de Castro. D.Sc.CENPES/Petrobrás
(Membro titular)

André Von Randow de Assis. D.Sc.UFRRJ
(Membro titular)

Leda Maria Gottschalk. D.Sc.Embrapa CTAA
(Membro suplente)

*Aos meus amados pais,
pelo apoio incondicional, sempre.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus amados pais e a minha irmã pela paciência, apoio, compreensão e por serem meu alicerce.

À minha família, em particular à Regiane e Viviane, pela compreensão, colaboração e incentivo.

À minha orientadora, professora Dra. Mônica Caramez Triches Damaso, pela orientação, incentivo, paciência e dedicação em todo o trabalho.

À professora Dra. Sonia Couri pela co-orientação, colaboração e oportunidade concedida.

À amiga Sandra Ventura, pelo incentivo e ajuda.

Ao amigo, professor Rômulo Cardoso Valadão, pelo incentivo, amizade e apoio.

Aos servidores da Embrapa CTAA, em especial a pesquisadora Dra. Lourdes Cabral, à técnica Selma Terzi e a estagiária Gabriela Moisés, pela colaboração e ajuda na realização deste trabalho.

A todos os companheiros de pesquisa Gabriela Costa, Aline Cascas, Grazielle Fonseca de Sousa, Gaspar Ramose Livia Nolasco pela amizade e apoio dado durante cada dia de trabalho.

À Dra. Alane Beatriz Vermelho, professora da UFRJ, por ter cedido o seu laboratório para realização de parte dos experimentos e a toda sua equipe de trabalho, principalmente à Ana Maria Mazotto, doutoranda do IMPPG/UFRJ, pela paciência e ajuda concedida.

À professora Dra. Lucielen dos Santos pela colaboração no planejamento estatístico de experimentos.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação pelo apoio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade concedida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo conhecimento fornecido durante este período.

À Luciamar Stork, secretária do curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia, pela atenção e colaboração.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa durante a realização do trabalho e a Embrapa pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

SANTOS, Alex da Silva. **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante.** UFRRJ, 2011. 77p. (Dissertação. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

A produção de enzimas para uso em diferentes áreas da agroindústria de alimentos mostra perspectivas futuras promissoras, devido às várias características inerentes à ação das enzimas que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas com melhor qualidade. Entre as enzimas mais utilizadas pelo setor de alimentos estão as celulases, um complexo de enzimas que atuam de forma sinérgica sobre a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 das moléculas de celulose, e possuem várias aplicações industriais neste setor, como na extração de óleos vegetais, na maceração de frutas e na clarificação de sucos. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo produzir, concentrar e caracterizar parcialmente um extrato celulolítico obtido por linhagem fúngica mutante de *Aspergillus niger*. A produção foi realizada por fermentação no estado sólido (FES) em colunas aeradas, utilizando como substrato farelo de trigo triturado umidificado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,1N e celobiose, como indutor. O extrato celulolítico consistiu de uma mistura de extratos obtidos em 3 ensaios fermentativos diferentes, selecionados em trabalhos anteriores como as melhores condições para produção de cada uma das enzimas carboximetilcelulase (CMCase), β -glicosidase e celulase em papel de filtro (FPase). Durante a caracterização do extrato enzimático, além da atividade das celulases, também era avaliado o teor de proteína, a presença de protease e de enzimas correlatas à ação de celulases como xilanase e poligalacturonase. Para concentração do extrato enzimático foram realizadas três diferentes estratégias: ultrafiltração em um sistema de quadro e placas em aço inox, utilizando uma membrana de polietersulfona com massa molar de corte de 20 kDa e área de $0,014\text{m}^2$; precipitação com sulfato de amônio utilizando saturações de 20%, 40%, 50%, 60%, 80% e liofilização. O processo de ultrafiltração foi o que obteve o melhor resultado, purificando parcialmente a amostra e proporcionando uma recuperação das atividades enzimáticas entre 75% e 99% para todas as atividades avaliadas, exceto FPase. A análise eletroforética em SDS-PAGE demonstrou a presença de 15 bandas visíveis de proteínas no extrato celulolítico com pesos moleculares que compreendem uma faixa entre 13,3 e 104,6 kD. O teste de zimografia foi realizado para as celulases e enzimas correlatas, bem como para protease, no entanto somente para esta última, as condições testadas foram adequadas tornando-se possível identificar bandas em 88, 103 e 145 kDa. A efetiva ação das enzimas β -glicosidase e xilanase na hidrólise de celobiose e xilana, respectivamente, foi comprovada em cromatografia de camada fina. Além disso, a temperatura e pH ótimos de atuação de carboximetilcelulase e β -glicosidase foram determinados utilizando o delineamento composto central rotacional 2^2 , com 4 pontos centrais. A análise dos resultados de ambas as enzimas demonstrou que as variáveis eram significativas, a um nível de confiança de 95%. Com base nas condições estudadas, concluiu-se que as faixas de pH e temperatura ótimos para a atuação eficiente e conjunta de CMCase e β -glicosidase estão entre 3,7 a 5,5 e 60 a 65 °C, respectivamente.

Palavras-chave: Celulases, fermentação estado sólido, concentração, ultrafiltração, caracterização parcial.

ABSTRACT

SANTOS, Alex da Silva. **Concentration and partial characterization of the enzymatic extract produced by fungal strain**. UFRRJ, 2011, 77p. (Dissertation. Master of Science and Food Technology) Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

The production of enzymes for application at different areas of food agroindustry presents promising future perspectives, due to several intrinsic properties regarded to the performance of the enzymes as natural and biodegradable compounds, responsible for achieving specific reactions with better quality. Cellulases have been the most employed enzymes on food industry, acting synergically on the hydrolysis of the glucosidic links β -1,4 from the molecules of cellulose, and being used on several applications in this sector as in vegetal oils extraction, fruit maceration and juice clarification. Based on this context, the present study aimed to produce, concentrate and partially characterize an enzymatic extract by a mutant fungus strain of *Aspergillus niger*. Production was performed by solid-state fermentation (SSF) in aerated columns, using humidified wheat bran with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution on 0,1N HCl as substrate and cellobiose as inducer. Cellulolytic extract was a blend of extracts from three different assays selected on previous studies as the best conditions for the enzymes carboxymethylcellulase, β -glucosidase and filter paper cellulase (FPase). During the characterization of the enzymatic extract, besides cellulases activity, the presence of protease and other enzymes with similar action to cellulases as xylanase and poligalacturonase was evaluated. For enzymatic extract concentration, three different strategies were performed: ultrafiltration, using a stainless steel plates system through a 20 kDa molecular weight cut-off polyethersulphone membrane and 0,014 m² area; precipitation with ammonium sulphate under 20%, 40 %, 60% and 80% saturation level and lyophilization. The best results were achieved by the ultrafiltration process, partially purified sample and providing enzymatic activities recovery between 75% and 99%, except for FPase. SDS-PAGE analysis presented 15 visible protein bands on cellulolytic extract with molecular weights ranging from 13.3 to 104.6 kDa. Zymography test was applied for cellulases and correlate enzymes as well as to protease, however, just for the last one the conditions were considered appropriate, identifying bands on 88, 103 and 145 kDa. The effective performance of β -glucosidase and xylanase over xylan and cellobiose hydrolysis was confirmed by thin layer chromatography. A central rotational statistical design 2² with 4 central points was used for evaluating optimal temperature and pH for carboxymethylcellulase and β -glucosidase. The analysis of the results obtained for both enzymes demonstrated that all variables were significative at a 95% confidence level. Based on the conditions studied it can be concluded that optimal pH and temperature ranges for efficient and combined action of carboxymethylcellulase and β -glucosidase are 3.7 to 5.5 and 60 to 65°C, respectively.

Key-words: cellulases, solid-state fermentation, ultrafiltration, concentration and partial characterization.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Propriedades de algumas celulasas produzidas por microrganismos.....	13
Tabela 1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos.	4
Tabela 2. Microrganismos produtores de celulasas e substratos utilizados.	11
Tabela 3. Meio básico para reativação do microrganismo.	22
Tabela 4. Meio de sabugo de milho.....	23
Tabela 5. Condições de processo para produção de celulasas por fermentação no estado sólido, conforme descrito por Couri et al. (2009).....	24
Tabela 6. Delineamento composto central rotacional 2 ² codificado para o estudo do efeito do pH e temperatura para as atividades de CMCase e β -glicosidase.	32
Tabela 7. Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional 2 ² para avaliação do pH e temperatura ótimos nas atividades de CMCase e β -glicosidase. ...	32
Tabela 8. Atividades enzimáticas em UI/g de massa seca na Mistura 3 para as três condições utilizadas.....	34
Tabela 9. Atividades enzimáticas do extrato líquido em UI/mL na Mistura3 para as três condições utilizadas.....	34
Tabela 10. Determinação das atividades específicas aparentes (UI/mg de proteína) do extrato líquido da Mistura 3 para as três condições utilizadas.	35
Tabela 11. Valores das atividades enzimáticas das misturas 1, 2 e 3.....	35
Tabela 12. Comparação entre as atividades do extrato bruto e do concentrado dos processos A e B após a ultrafiltração.	38
Tabela 13. Comparação das atividades específicas, percentuais de recuperação e fatores de purificação após a UF, para os processos A e B.....	39
Tabela 14. Avaliação da recuperação enzimática e do fator de purificação obtidos para a condição de saturação a 50%, 60% e 80%.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 15. Avaliação da recuperação da atividade enzimática após a liofilização para os processos A e B.	43
Tabela 16. Comparação entre os melhores processos de concentração	Erro! Indicador não definido.
Tabela 17. Atividades de carboximetilcelulase obtidas com o delineamento composto central rotacional 2 ²	45
Tabela 18. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e Temperatura na atividade da CMCase.....	48
Tabela 19. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e Temperatura na atividade da CMCase.....	49
Tabela 20. Atividade de β -Gase para o delineamento composto central rotacional 2 ²	51
Tabela 21. Coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial composto central rotacional 2 ² para a atividade de β -glicosidase.....	51

Tabela 22. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e Temperatura na atividade da β -glicosidase.....	52
Tabela 23. Comparação dos resultados encontrados para temperatura e pH ótimos de CMCase e β Gase com os obtidos em outros trabalhos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da celulose.	5
Figura 2. Modo de atuação das enzimas na hidrólise da fibra celulósica.....	9
Figura 3. Esquema de um processo de separação com membrana.	16
Figura 4. Esquema de escoamento convencional e tangencial.	18
Figura 5. Sistema de produção de enzimas em colunas com aeração.	24
Figura 6. Resumo esquemático do sistema de ultrafiltração para os testes e medidas da célula de ultrafiltração com respectivas posições de entrada e saída das correntes.....	28
Figura 7. Sistema de ultrafiltração onde foram realizadas as operações de concentração por membrana.....	28
Figura 8. Permeabilidade hidráulica da membrana de Polietersulfona.	37
Figura 9. Comportamento do fluxo permeado ao longo do tempo de processamento do extrato enzimático com a membrana de corte de 20 kDa.	37
Figura 10. Amostras das três condições de saturação, 60%, 50% e 80% respectivamente, após a precipitação e centrifugação.	40
Figura 11. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 50% de saturação em UI/mL	41
Figura 12. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 60% de saturação.	41
Figura 13. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 80% de saturação em UI/mL.	42
Figura 14. Comparação entre as atividades específicas das preparações enzimáticas concentradas por precipitação e a preparação enzimática bruta.....	44
Figura 15. Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade de CMCase.	50
Figura 16. Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade de β -glicosidase.....	52
Figura 17. Perfil eletroforético de proteínas em SDS-PAGE da amostra bruta e concentrada e a relação de peso molecular por banda de proteína. (A) Padrão; (B) Extrato Bruto; (C) Extrato concentrado.....	55
Figura 18. Zimograma em gel de poliacrilamida em malha de 10% co-polimerizado com gelatina.	56
Figura 19. Avaliação da eficiência da hidrólise pelas enzimas xilanase e β -glicosidase sobre os substratos específicos de atuação	58

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SIMBOLOS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
°C	Graus Celsius ou centígrados
CBD	<i>celulose binding domain</i> (ou domínio de ligação)
CBH	Celobiohidrolases
CMCase	Carboximetilcelulase
CV%	Coefficiente de variação
Da	Dalton (Unidade de massa molecular)
DNS	cido 3,5- dinitro-salicílico
EGases	Endoglucanases
ExGases	Exoglucanases
FPase	<i>Filter Paper Activity</i>
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação no estado sólido
g	Grama
GOD-POD	Glicose Oxidase / Peroxidase
GP	Grau de Polimerização
GH	Glucanohidrolases
h	Horas
J	Fluxo permeado
kDa	Quilodalton
L	Litro
mg	Miligrama
m²	Metro quadrado
mL	Mililitro
min	Minutos
MMC	Massa molecular de corte
mm	Milímetro
MSM	Meio de sabugo de milho
mmol	Milimol
nm	Nanmetro
PES	Polietersulfona

PGase	Poligalacturonase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSM	Processo de separação por membrana
rpm	Rotação por minuto
SAB	Soro albumina bovina p. a.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UF	Ultrafiltração
UI	Unidade Internacional (para quantificação de atividade enzimática)
UNIPROT	<i>The Universal Protein Knowledgebase</i>
VVM	Volume de ar por volume de meio por minuto
βGase	β-glicosidase ou Betaglicosidase
σ	Desvio padrão
\bar{x}	Média aritmética
μL	Microlitro
μmol	Micromol

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SIMBOLOS	x
SUMÁRIO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. Justificativa.....	2
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. 1. Matérias-primas lignocelulósicos	4
3.1.2. Celulose	5
3.2. Celulases: classificação, mecanismo de atuação e produção	6
3.2.1. Classificação e mecanismo de atuação de celulases.....	6
3.2.1.1. Endoglucanases (EGases).....	7
3.2.1.2. Exoglucanases (ExGases).....	7
3.2.1.3. β -glicosidasases (β Gases)	8
3.2.2. Produção de celulases.....	9
3.2.3. Microrganismos Produtores de Celulases.....	10
3.3. Caracterização das celulases.....	12
3.4. Aplicações das celulases.....	14
3.4.1 Principais aplicações de celulases na indústria de alimentos	14
3.5. Processos de concentração de enzimas.....	15
3.5.1. Processos de Separação por Membranas (PSM)	16
3.5.1.1. Tipos de escoamento	17
3.5.1.2.Ultrafiltração (UF).....	18
3.5.2. Precipitação fracionada com Sulfato de Amônio	19
3.5.3. Liofilização.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22

4.1. Matéria-prima	22
4.2. Microrganismo utilizado.....	22
4.3. Meios de cultura e soluções utilizadas	22
4.3.1. Meio básico de gelose.....	22
4.3.2. Meio de sabugo de milho (MSM).....	22
4.3.3 Meio de fermentação no estado sólido	23
4.4. Reativação, produção de conídios e inoculação de linhagem para FES.....	23
4.4.1. Reativação de linhagem.....	23
4.4.2. Produção de conídios e inoculação para fermentação no estado sólido	23
4.5. Fermentação em colunas aeradas	24
4.6. Extração de enzimas	24
4.7. Determinações de atividades enzimáticas	25
4.7.1. Determinação da Atividade Enzimática celulolítica (C1 ou FPase).....	25
4.7.2. Determinação da Atividade de carboximetilcelulose (CMCase)	25
4.7.3. Determinação da Atividade de β -glicosidase:	25
4.7.4. Determinação de atividade enzimática de poligalacturonase	26
4.7.5. Determinação de atividade enzimática xilanase	26
4.8. Determinação de proteína total no extrato enzimático	26
4.8.1. Curva padrão para determinação de proteína	26
4.9. Determinação de atividade proteolítica	26
4.10. Determinação da umidade	27
4.11. Processos de concentração de enzimas.....	27
4.11.1. Processo de ultrafiltração (UF) com membranas	27
4.11.2. Ultrafiltração (UF) do extrato enzimático	27
4.11.3. Sistema de Amicon.....	28
4.12. Precipitação com sulfato de Amônio.....	29
4.12.1. Precipitação das enzimas e determinação de suas atividades enzimáticas.....	29
4.13. Liofilização do extrato enzimático bruto.....	29
4.14. Rendimento dos processos de concentração e avaliação da purificação parcial:	29
4.15. Caracterização bioquímica	30
4.15.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
4.15.2. Zimografia	30
4.16. Análise da composição de monossacarídeos	30

4.17. Caracterização físico-química	31
4.17.1. Determinação do pH e da Temperatura ótima de atividade para Carboximetilcelulase e β -glicosidase do extrato enzimático ultrafiltrado	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Comparação das três diferentes condições de produção de celulases e enzimas correlatas por <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8 em fermentação em estado sólido (FES)	33
5.2. Avaliação dos processos de concentração	36
5.2.1 Concentração do preparado celulolítico por ultrafiltração	36
5.2.1.1. Comparação das atividades enzimáticas no concentrado obtido por UF e no extrato enzimático.....	38
5.2.2. Avaliação da concentração por precipitação com sulfato de amônio seguido de diálise	40
5.3. Concentração da preparação enzimática bruta por liofilização	44
5.4 Determinação do pH e da temperatura ótimos para a atividade da CMCase	47
5.5. Determinação do pH e da temperatura ótimos para a atividade da Betaglicosidase	51
5.6. Caracterização físico-química das celulases.....	54
5.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
5.9. Análise da composição de monossacarídeos por <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC) ...	57
6. CONCLUSÕES	58
7. SUGESTÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	70

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.	Preparo de soluções para curva padrão de proteína (Método de <i>Lowry</i>).....	64
Anexo B.	Preparo de soluções para curva padrão de glicose (DNS).....	65
Anexo C.	Preparo de soluções para curva padrão de β -glicosidase.....	66
Anexo D.	Preparo de tampão citrato de sódio 0,05M.....	67
Anexo E.	Preparo de tampão fosfato de sódio 0,1M.....	68
Anexo F.	Equipamentos e reagentes utilizados.....	69
Anexo G.	Matérias-primas empregadas durante o crescimento da linhagem fúngica e/ou fermentação em estado sólido.....	70
Anexo H.	Composição do meio de manutenção e ativação da linhagem.....	70
Anexo I.	Equipamentos e seus respectivos fabricantes.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A indústria mundial de enzimas teve um faturamento de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com previsão de crescimento anual que gira em torno de 6,5%. Celulases e amilases são as enzimas do grupo das carboidrolases de maior impacto econômico, respondendo juntas por 23% do total das enzimas de uso industrial. O consumo de celulases em 2004 foi próximo a US\$ 300 milhões, superior ao de amilases, podendo ser aplicadas na indústria de alimentos, em processos de extração de óleos vegetais, de maceração de frutas, como também na fabricação de cerveja e vinho. No entanto, sua principal aplicação está voltada para a formulação de ração animal, correspondendo a 21% do total de enzimas utilizadas neste setor. A tendência do mercado mundial é pelo aumento no consumo das celulases tanto no segmento das enzimas industriais como no de enzimas especiais.

Apesar das qualidades catalíticas inerentes às enzimas, ainda existem limitações no seu uso em escala industrial: das 2000 enzimas conhecidas não mais que 30 tipos são produzidas e usadas em grande escala. Algumas das razões desse panorama seriam: a) a dificuldade de se obter grandes quantidades de enzimas a baixo custo; b) nem todas as enzimas atuam com eficiência nas condições reais de processo; c) muitas das enzimas conhecidas são intracelulares, que além de serem caras, nem sempre atuam bem quando solubilizadas e d) a necessidade de cofatores.

Hoje, a indústria de enzimas é capaz de oferecer preparações contendo níveis balanceados de atividades enzimáticas, otimizadas por tipos específicos de produtos e ou processos. Estas preparações têm se tornado indispensáveis para a hidrólise de paredes celulares de plantas, para o aumento do rendimento e redução da viscosidade e melhoramento do processo de separação. No Brasil, as preparações enzimáticas são ainda pouco utilizadas pelo fato da grande parte precisar ser importada. Atualmente, cerca de 80% das enzimas utilizadas no Brasil são importadas.

Considerando o mercado potencial, a produção de enzimas para uso em diferentes áreas da agroindústria de alimentos, mostra perspectivas futuras promissoras, devido às várias características inerentes a ação das enzimas que são compostos naturais, biodegradáveis, capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários, com melhor qualidade.

O desenvolvimento do processo de produção de enzimas, em escala industrial, de qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre as diferentes etapas do processo que vão desde a obtenção da linhagem adequada, definição do melhor processo de fermentação até a adequação dos métodos de recuperação e/ou purificação e concentração de enzimas. Dependendo da sua aplicação, a enzima pode ser vendida comercialmente em diferentes graus de pureza.

Neste sentido, o presente trabalho visa contribuir com conhecimentos sobre a produção, concentração e caracterização parcial de um extrato enzimático rico em atividade celulolítica obtido por fermentação no estado sólido pela linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8.

1.2. Justificativa

A tecnologia enzimática vem despertando bastante interesse do setor industrial, pois além de melhorar a qualidade do produto, geralmente reduzem os gastos energéticos, proporcionam um melhor aproveitamento das matérias-primas e causam baixo impacto ambiental. No entanto, o custo de produção das enzimas ainda é alto, o que inviabiliza o uso dessa tecnologia para algumas aplicações industriais.

Por este motivo, tem-se intensificado a busca por enzimas mais eficientes ou mesmo um *pool* enzimático concentrado que permita a sua utilização em diversos setores industriais.

As celulasas, como a maior parte das enzimas são relativamente caras e uma significativa redução do custo seria importante para seu uso comercial, como a utilização de matéria-prima de baixo custo.

Dentro deste contexto, este projeto de pesquisa visa produzir, concentrar e caracterizar parcialmente um extrato enzimático obtido por linhagem fúngica com o propósito de reduzir a quantidade de enzima utilizada nos processos enzimáticos, seja pelo aumento real da atividade das enzimas, seja pelo conhecimento das condições ótimas para sua aplicação, ou por ambos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Produzir, concentrar e caracterizar parcialmente o extrato enzimático de origem fúngica obtido por fermentação no estado sólido.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir o extrato enzimático por fermentação no estado sólido em colunas aeradas utilizando linhagem fúngica selecionada;
- Concentrar o extrato enzimático utilizando os processos de ultrafiltração, liofilização e precipitação com sulfato de amônio;
- Comparar a eficiência dos processos de concentração e verificar a capacidade dos mesmos em pré-purificar o extrato enzimático;
- Caracterizar bioquimicamente, de forma parcial, as enzimas contidas no extrato enzimático;
- Determinar a temperatura e o pH ótimos da carboximetilcelulase e da β -glicosidase.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. 1. Matérias-primas lignocelulósicas

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza (SZENGYEL, 2000), sendo compreendidas, majoritariamente, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Essas biomassas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa e resistente a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990).

Os resíduos e subprodutos lignocelulósicos apresentam um potencial enorme para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico (ALBERTON *et al.*, 2009). Diversos resíduos como palhas, cascas, sabugos e bagaços estão sendo utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos.

Os resíduos e subprodutos agrícolas podem ser moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono e como fonte indutora. Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos com nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática. A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor. (AGUIAR e MENEZES, 2000; ELISASHVILI, 1993).

A Tabela 1 mostra a composição das 3 principais frações de materiais lignocelulósicos. Estes materiais podem ser utilizados como indutores e/ou suportes para produção de enzimas. No caso da produção de celulasas eles desempenham os dois papéis.

Tabela 1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Outras (%)	Referências*
Bagaço de cana	40	26	25	NR	9
Bagaço de laranja	16	14	1	10	6
Casca de amendoim	38	36	16	NR	4
Casca de arroz	36	20	19	20,1	7
Casca de aveia	31	29	23	NR	8
Palha de cana	36	21	16	27	1
Palha de milho	36	28	29	NR	2
Palha de trigo	39	36	10	NR	3
Palha de cevada	44	27	7	NR	3
Palha de arroz	43	22	17	NR	10
Palha de algodão	42	12	16	NR	4
Farelo de cevada	23	33	21	NR	5
Sabugo de milho	36	28	NR	NR	2

NR: Valores não reportados. * (1) SHLESER (1994); (2) OLSSON e HAHN-HÄGERDAL (1996), (3) AWAF0 (1997); (4) GHOSH e SINGH (1993);(5) COUTO e SANROMÁN (2005); (6) MAMAA *etal.* (2008); (7)CENe XIA (1999) apud CASTRO, 2006, ; (8) FELIPE *et al.* (2003); (9) NEUREITER *etal.*(2002); (10) MUSSATO e ROBERTO (2002).

3.1.2. Celulose

Segundo Ramos (2003) a celulose é um homopolissacarídeo linear formado por moléculas de glicose (D-glicopiranosose) unidas entre si por ligações β -(1-4) glicosídicas (β -D-glucana) (Figura 1). O seu tamanho normalmente é dado em termos do seu grau de polimerização (DP), ou seja, o número de unidades de glicose anidra presente em uma única cadeia. No entanto, a análise conformacional da cadeia polimérica de celulose indica que ao invés da glicose, a celobiose (4-O- β -D-glicopiranosil- β -D-glicopiranosose) é a sua unidade de repetição (RAMOS, 2003).

A celulose é o polímero naturalmente ocorrente mais abundante na biosfera e o principal constituinte das biomassas. Corresponde de um terço da metade do tecido das plantas. Ela responde isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos, e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (SUN; CHENG, 2002).

Uma característica importante da celulose é a sua estrutura cristalina. Durante a sua síntese as moléculas de celulose sofrem um rearranjo, onde as cadeias individuais de glicose estabelecem fortes ligações de hidrogênio intermoleculares. E o estabelecimento de pontes de hidrogênio intracadeias resulta na formação de fibrilas, uma estrutura altamente ordenada que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas regiões amorfas (ZHANG e LYND, 2004). Esta característica cristalina confere a celulose uma alta resistência tanto a hidrólise ácida como também enzimática. Já a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (COUGHLAN, 1985).

No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e a celobiose (COUGHLAN, 1985).

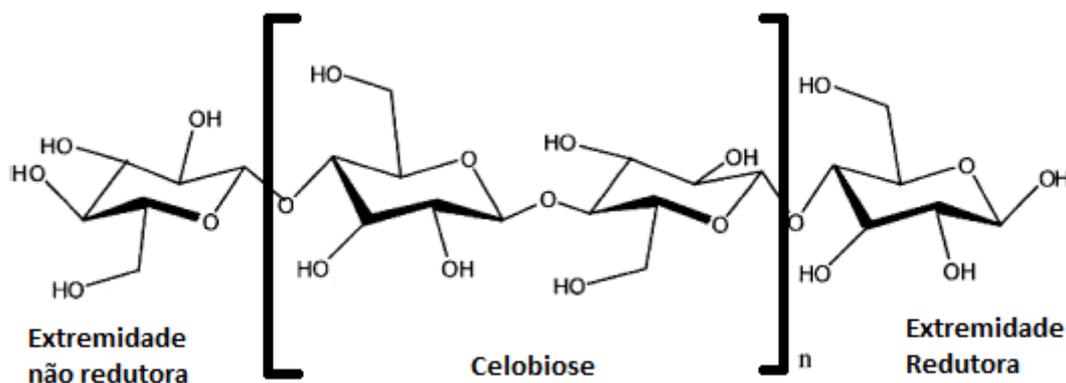


Figura 1. Estrutura molecular da celulose.

Fonte: Adaptado de ZHANG e LYND (2004).

3.2. Celulases: classificação, mecanismo de atuação e produção

As enzimas hidrolases são extensivamente utilizadas por vários segmentos industriais. Celulases e amilases são as enzimas do grupo das carboidrolases de maior impacto econômico, respondendo juntas por 23% do total das enzimas de uso industrial no mundo. O consumo de celulases em 2004 foi próximo a US\$ 300 milhões, podendo ser aplicadas na indústria de alimentos, em processos de extração de óleos vegetais, na maceração de frutas e clarificação de sucos, bem como na fabricação de cerveja e vinho, apesar da sua principal aplicação estar voltada para a formulação de ração animal (BON; GÍRIO; PEREIRA JR., 2008).

O processo de obtenção das enzimas se dá pela extração de tecidos animais e vegetais ou por fermentação. Contudo, a maioria das enzimas empregadas nos processos industriais é de origem microbiana e extracelular, pois os microrganismos independem de questões sazonais, excretam enzimas possibilitando sua recuperação sem lise celular, além de possuírem facilidade de cultivo em meios de cultura de baixo custo, principalmente quando se trata da fermentação no estado sólido (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

3.2.1. Classificação e mecanismo de atuação de celulases

As celulases são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (DILLON, 2004).

Tal como outros tipos de enzimas, possuem uma estrutura tridimensional protéica, sendo constituídas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Estão presentes em vários sistemas vivos e, quando degradadas, podem ser rapidamente absorvidas na natureza (PAULO, 1995). As celulases microbianas podem ser produzidas por microrganismos, como fungos e bactérias.

As massas moleculares das celulases são relativamente elevadas, apresentando em geral um alto teor de carboidratos em sua forma glicosilada. O teor de carboidratos da massa total das enzimas pode variar cerca de 1 a 50% (CASTRO, 2006).

Métodos de separação de moléculas e estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que para a hidrólise completa da celulose à glicose, é necessário o efeito de um consórcio enzimático denominado enzimas celulásicas, ou simplesmente celulases, as quais se dividem em 3 grupos, de acordo com sua atuação na celulose. As endoglucanases que hidrolisam aleatoriamente as ligações glicosídicas na fibra de celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas cadeias terminais; as celobiohidrolases ou exoglucanases que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglucanases, liberando celobiose; e as β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose à glicose (LYND; ZHANG, 2002). Na Figura 2 é possível verificar o modo de atuação dessas enzimas.

Todas as três enzimas do complexo sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise, desempenhando assim, um efeito crucial na hidrólise enzimática da celulose (PARRY *et al.*, 2002).

3.2.1.1. Endoglucanases (EGases)

Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) as endoglucanases (EC 3.2.1.4) possuem o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

Endoglucanases são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose. Tais enzimas hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, atuando sobre celooligossacarídeos, celulose substituída como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC), liberando oligossacarídeos e causando mudança rápida no grau de polimerização (ZHANG; LYND, 2004).

A celulose cristalina, substrato com elevado grau de cristalinidade, é menos hidrolisada devido ao maior grau de organização molecular que apresenta. O sítio ativo das endoglucanases 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 cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (ELISAHVILI, 1993)

3.2.1.2. Exoglucanases (ExGases)

O grupo das exoglucanases (ExGases) é constituído pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs) (BON; GÍRIO; PEREIRA JR., 2008).

As glucanohidrolases GHs (EC 3.2.1.74) possuem o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-glucanohidrolases, mas também podem ser referidas como exo-1,4- β -glicosidases, exocelulases, exo- β -1,4-glicosidases, exo- β -1,4-glucanases, β -1,4- β -glucanases, β -glicosidases e exo-1,4- β -glucanase (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

As celobiohidrolases CBHs (EC 3.2.1.91), também conhecidas como exo-celobiohidrolases, β -1,4-glucana celobiohidrolases, β -1,4-glucana celobiosilhidrolases, 1,4- β -glucana celobiosidases, exoglucanases, avicelases, C1 celulases, exo- β -1,4-glucana celobiohidrolases e celobiosidases, possuem o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolases (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

As exoglucanases (ExGases) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose. As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização (ZHANG; LYND, 2004). São enzimas estratégicas na hidrólise da fibra celulósica, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND *et al.* 2002). As celobio-hidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (CBD – *celulose binding domain*) e sofrem inibição do seu produto de hidrólise, a celobiose (BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA Jr, 2008).

O grau de polimerização (GP) de substratos celulósicos determina a quantidade de ligações β -glicosídicas terminais e interiores e a quantidade de substratos para a ação das enzimas exo e endoglucanases, respectivamente. A solubilidade da celulose reduz drasticamente com o aumento do grau de polimerização devido à presença de pontes de hidrogênio intermoleculares na estrutura de celulose (ZHANG; LYND, 2004).

A mudança do grau de polimerização durante a hidrólise é determinada pela relativa proporção das atividades de exo e endoglucanases e das propriedades da celulose (LYND *et al.*, 2002). Exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia, ocorrendo então apenas um

incremento na redução do GP, enquanto que as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero, causando uma redução drástica do mesmo (ZHANG; LYND, 2004).

As ExGases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões anteriormente cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004).

3.2.1.3. β -glicosidases (β Gases)

Esse grupo engloba as enzimas β -glicosidásicas ou β -glicosídeo glucohidrolases (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático. Outros nomes com os quais estas enzimas também podem ser encontradas são: gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril- β -glicosidase, β -D-glicosidase, β -glicosídeo glicohidrolase, arbutinase, amigdalina, p-nitrophenil β -glicosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilina (NC-IUBMB, 2010).

As β -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose (gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases) e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose. As β Gases também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose (LYND *et al.*, 2002; LYND; ZHANG, 2002), porém são induzidas pela presença de celobiose.

O mercado atual oferece muitos complexos de celulase que contêm níveis baixos de β -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose. Já que a celobiose apresenta um poder inibidor mais forte do que a glicose para as exoglucanases, e sua hidrólise ocorre através da ação das enzimas β -glicosidases, é indicado que se adicione no meio reacional uma certa quantidade desta enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Desta forma, há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; SUN; CHENG, 2002).

Embora muitas teorias tenham sido propostas para descrever o mecanismo de hidrólise da celulose, existe um consenso que a hidrólise completa é realmente baseada numa ação sinérgica das três enzimas acima mencionadas (ZHANG *et al.*, 2006), existindo pelo menos 3 tipos de sinergia: endo-exo, exo-exo e exo-BG (LYND *et al.*, 2002).

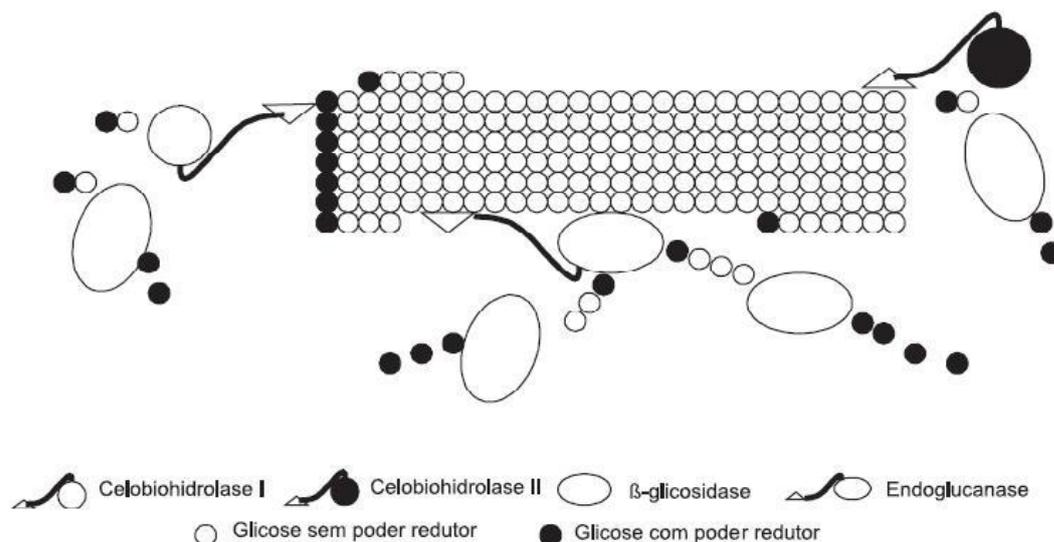


Figura 2. Modo de atuação das enzimas na hidrólise da fibra celulósica.

Fonte:Castro e Pereira JR, 2010.

A maior parte das celulasas é constituída por dois domínios: O domínio catalítico (DC) e o domínio de ligação ou *celulose binding domain* (CBD), que funcionam independentemente. O domínio catalítico catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas 1,4- β -D, enquanto o CBD é responsável pela adsorção da celulase ao substrato via ligações hidrofóbicas e interações de van der Waals. Os dois domínios estão ligados entre si através de um espaçador (*linker*), um polipeptídeo de 5 a 59 aminoácidos, que é responsável pela flexibilidade do domínio catalítico, em relação ao CBD, e influencia a atividade catalítica. O centro ativo do domínio catalítico tem a forma de um túnel, ou fenda, onde ocorre a reação de hidrólise. A forma de túnel permite somente o ataque do substrato pelos terminais das cadeias poliméricas e é encontrado em CBHs. As EGases apresentam um sítio ativo na forma de fenda. (ANDREAUS e CAVACO-PAULO, 2008)

Devido às diferentes seqüências dos aminoácidos, as celulasas são divididas em 11 famílias. O CBD é um peptídeo com 30 a 240 aminoácidos, dependendo da origem, que é essencial para a degradação da celulose cristalina. Os CBDs são agrupados em várias famílias. Também existem enzimas que só tem o domínio catalítico, não apresentando o CBD e espaçador, como a EG III de *Trichoderma reesei* (ANDREAUS e CAVACO-PAULO, 2008).

3.2.2. Produção de celulasas

Os processos fermentativos de produção de enzimas podem ser conduzidos tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto em meio sólido, chamado de fermentação em estado sólido (FES) (LIMA, *et al.*, 2001).

Embora a fermentação submersa (FS) seja até hoje o processo mais empregado para a produção de enzimas, a FES tem ganho bastante interesse, especialmente devido à possibilidade de aproveitamento de co-produtos agroindustriais de baixo custo como fontes de matéria-prima (COUTO; SANDROMÁN, 2005).

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos. Neste caso, a matéria-

prima funciona como um suporte do microrganismo, dos substratos, do produto, e da água adicionada para umedecer o suporte (PANDEY, *et al.*, 2000; MUDGETT, 1986).

O uso da técnica de FES oferece distintas vantagens sobre a FS, dentre as quais: a simplicidade do meio, principalmente para países com abundância de biomassa e de resíduos agro-industriais, e o uso de reatores menores, proporcionando economia de espaço. Destaca-se ainda, a possibilidade dos rendimentos serem maiores que os obtidos em FS, além da ausência de formação de espuma, menor demanda de energia e, especialmente, a facilidade de controle de contaminação proporcionada pela baixa quantidade de água no sistema (MUDGETT, 1986; RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Porém, existem alguns fatores limitantes na FES, tais como: acessibilidade e disponibilidade de substrato, transferência de oxigênio e de massa (nutrientes), e principalmente, as dificuldades em regular os fatores físicos como pH, temperatura (problemas com transferência de calor) e grau de mistura (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Fungos filamentosos são os microrganismos que mais se adaptam à fermentação em estado sólido, devido a sua boa tolerância à baixa atividade de água semelhante ao seu habitat natural.

3.2.3. Microrganismos Produtores de Celulases

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de hidrolisar a celulose natural. A degradação da celulose é realizada por fungos e bactérias (ROBSON; CHAMBLISS, 1989). Estes produzem enzimas celulases que degradam especificamente a cadeia polimérica, originando polímeros com cadeias mais curtas. Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição, desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas e os principais produtores de celulases incluem: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp e *Humicola* sp., *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria* (AGUIAR; MENEZES, 2000).

A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de microrganismos produtores de celulases e os respectivos substratos utilizados nos processos de produção das enzimas e/ou processos de hidrólise enzimática de tais resíduos.

Hideno *et al.* (2011) estudaram a produção de celulases pelo fungo *Acremonium cellulolyticus* em fermentação submersa utilizando palha de arroz submetida a vários tipos de pré-tratamentos como matéria-prima. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas com a palha molhada moída em disco, obtendo-se os seguintes resultados, respectivamente: CMCase, FPase, β -glicosidase, xilanase (19,73; 0,58; 1,25; 32,13 UI/g de proteína).

Tabela 2. Microrganismos produtores de celulasas e substratos utilizados.

MICROORGANISMO	SUBSTRATO
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
<i>Aspergillus ellipticus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
<i>Chaetomium globosum</i>	Fibras de palma
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Resíduos de grama
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Fibras de grama
<i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz
<i>Aspergillus flavus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar, serragem e sabugo de milho
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
<i>Aspergillus niger</i>	Espiga de milho e serragem
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Antigonum leptopus</i> , folhas de bananeira e palha de cana-de-açúcar
<i>Trichoderma lignorum</i>	Resíduos de banana
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
<i>Bacillus subtilis</i>	Palha de arroz, palha de trigo, e bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: AGUIAR, 2010

Kovács *et al.* (2009) avaliaram a produção de celulasas a partir de um tipo de madeira utilizando uma linhagem selvagem de *Trichoderma atroviride* e vários mutantes obtidos por mutação clássica deste fungo. As maiores atividades foram encontradas pelos mutantes e correspondem a CMCase, 160 U/mL; FPase, 0,68 FPU/mL e β -glicosidase, 11,7 UI/mL.

Sukumaran *et al.* (2009) estudaram a produção de celulasas em fermentação no estado sólido utilizando farelo de trigo como matéria-prima. A capacidade da linhagem *Aspergillus niger* MTCC 7956 em produzir as enzimas foi comparada a linhagem padrão, *Trichoderma reesei* RUT C30. As atividades obtidas pelas duas linhagens foram, respectivamente: FPase, 4,55 e 22,80 UI/g), CMCase (135 e 299 UI/g) e β -glicosidase (21,39 e 4,5 UI/g), demonstrando que a linhagem de *Aspergillus* foi superior apenas em termos de β -glicosidase, se comparada ao padrão.

A produção de celulasas por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa foi conduzida comparando-se o uso de bagaço de cana-de-açúcar submetido a vários pré-tratamentos, bem como substratos sintéticos (CASTRO; PEREIRA, 2010). O melhor resultado foi obtido utilizando o bagaço parcialmente deslignificado, com os seguintes valores de atividade para FPase (0,354 U/mL) e β -glicosidase (1,835 U/mL).

A linhagem termoacidofílica de *Aspergillus terreus* M11 foi testada para produção de celulasas em fermentação no estado sólido utilizando palha de milho como matéria-prima. Os resultados mostraram que o maior nível de atividade foi obtido a 45°C e pH 3 com uma umidade de 80% e 0,8% de extrato de levedura. Nesta condição foram obtidos os seguintes resultados: 528, 243 e 128 U/g para CMCase, FPase e β -glicosidase, respectivamente (GAO *et al.*, 2008).

3.3. Caracterização das celulasas

O estudo das propriedades físico-químicas e bioquímicas das enzimas é de extrema importância para estabelecer em quais condições de processo o uso da enzima propiciará melhores resultados técnicos e econômicos para os processos biotecnológicos. Os valores ótimos de temperatura e pH, a estabilidade da atividade enzimática em função da temperatura, do pH e da estocagem em baixas temperaturas, assim como peso molecular e influência de cátions e ânions são algumas destas propriedades. Na literatura são reportados vários trabalhos sobre caracterização de celulasas de diferentes espécies microbianas.

Gao *et al.* (2008) verificaram que as celulasas CMCase e β -glicosidase de *Aspergillus terreus* M11 exibem atividade máxima em pH 2 e 3, respectivamente, e ambas mostraram considerável estabilidade na faixa de pH 2-5. As atividades de CMCase e β -glicosidase atingem o máximo a 70°C e mantêm cerca de 65% e 53% da sua atividade original após incubação a 70°C por 6h.

As celulasas produzidas por *Penicillium funiculosum* têm temperatura ótima entre 52 e 58°C e máximo pH próximo de 4,9. Além disso, as celulasas são altamente estáveis a 37°C, perdendo menos de 15% da sua atividade inicial após 23h de incubação. Os parâmetros cinéticos k_M para CMCase e β -glicosidase são 17,691 e 1,653, respectivamente, e 0,78 e 0,024 para V_{max} em mmol/L.min (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A CMCase da levedura *Cryptococcus* sp. S-2 apresentou peso molecular de aproximadamente 34 kDa. A temperatura e o pH ótimos de ação da enzima foram determinados em 40–50°C e 3,5, respectivamente e a enzima reteve aproximadamente 50% da atividade máxima após incubação a 90°C por 1 h (THONGEKKAEW *et al.*, 2009).

Leal *et al.*, (2005) estudaram a produção de CMCase pelo actinomiceto *Streptomyces drozdowiczii*. A enzima apresentou uma faixa de temperatura ótima de 50 a 60°C, e mesmo a 70°C, a enzima manteve 50% da sua atividade. A CMCase demonstrou mais que 50% da sua atividade na faixa de pH entre 3 e 10. Dois picos máximos de atividade foram encontrados em pH 5 e 10. Além disso, estudos da influência de metais na atividade da enzima mostraram que na presença de cobre a enzima foi inibida (30%), enquanto na presença de bário (86%) e potássio (62%) a enzima sofreu indução.

Em relação à caracterização de peso molecular, encontram-se valores bem distintos para o grupo das celulasas, segundo dados contidos na base UNIPROT (CASTRO; PEREIRA, 2010). Por exemplo, a β -glicosidase de *A. niger* AMS11 tem peso molecular de 48,36 kDa, enquanto a de *Trichoderma reesei* Qm6a é 93,95 kDa. Para a endoglucanase de *A. niger* IFO 31125, *A. niger* e *T. reesei* Rut C30 verificou-se valores de 36,70; 90,46 e 35,51 kDa, respectivamente. Já para a exoglucanase, valores próximos de peso molecular foram encontrados para *H. grisea* var. *thermoidea* (55,69 kDa) e *Trichoderma harzianum* LP108 (53,21 kDa).

Com base em trabalhos relatados na literatura (Quadro 1), as CMCases, β Gase e exoglucanases apresentam pesos moleculares que variam entre 25 a 64 kDa, 42 a 120 kDa, e 49 a 64 kDa, respectivamente. As mesmas enzimas apresentaram faixa de pH e temperatura ótimos entre 4,0-7,0 e 45-70°C, respectivamente.

Também é bastante reportada na literatura a capacidade que as enzimas celulolíticas apresentam de serem influenciadas por outras moléculas, geralmente metais, seja sofrendo efeitos inibitórios ou indutores. O Quadro 1 mostra agentes inibidores como Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} e Zn^{2+} , que chegam a provocar até a perda total da atividade catalítica, estando presentes em concentrações tão baixas quanto 2 mM.

Quadro 1 – Propriedades de algumas celulasas produzidas por microrganismos.

Tipo de enzima	Microrganismo produtor	Condições ótimas (T; pH)	Massa Molecular (kDa)	Estabilidade: T ;pH	Inibidor	Referência
CMCase	<i>T. viride</i>	50°C; 4,2	64 kDa	30 -70°C; 3-7	Ag ⁺ , Hg ²⁺	Liu; Xia (2006)
CMCase	<i>Aspergillus niger</i>	70°C; 6 - 7	40 kDa	70; 5 - 10	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	AKIBA <i>et al.</i> (1995)
CMCase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	45°C; 5,0	45 kDa	-	Ca ²⁺ , Hg ²⁺ , K ⁺ , Na ²⁺	SAAD; FAWZI (2004)
CMCase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	45°C; 5,0	45 kDa (estimada)	90°C/5h	Carbodiimida, ietilpirocabonato	NAIKA; KAUL; PRAKASH, 2007
CMCase	<i>Aspergillus oryzae</i>	55°C; 4,4	25 kDa	47°C; 4,1 – 5,3	α-quimotripsina, uréia	JAVED <i>et al.</i> , 2008
βGase	<i>Aspergillus niger</i> A20	55 °C; 4,5	88 kDa;			ABDEL-NABY; OSMAN; ABDEL-FATTAH, 1999
βGase		55 °C; 4,5	80 kDa;			
βGase		60 °C; 4,5	71 kDa			
βGase	<i>Aspergillus sp.</i>	50°C; 5,0-5,5	42 kDa	50 - 85°C;-	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Zn ²⁺ EDTA	Qi; Wang; Liu, 2009
βGase	<i>Aspergillus japonicus</i>	65°C	120 kDa	30- 40°C;		KOROTKOVA <i>et al.</i> , 2009
βGase	<i>Penicillium verruculosum</i>	60°C	116 kDa	30 - 40°C;		KOROTKOVA <i>et al.</i> , 2009
βGase	<i>Trichoderma reesei</i>	70°C;	70 kDa	30 -40°C;		KOROTKOVA <i>et al.</i> , 2009
βGase	<i>Penicillium occitanis</i>	60°C; 4,5	98 kDa	60°C; 3 -8	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , glicose	BHIRI <i>et al.</i> ,2008
ExGase	<i>A. niger</i>	50°C; 5,5	52,5 kDa		Hg ²⁺ , Pb ²⁺	SINGH <i>et al.</i> , 1990
ExGase	<i>Thermophile aurantiacus</i>	60°C; 5,0	49 kDa			TONG; COLE; SHEPHE, 1980
ExGase	<i>Sporotrichum thermophile</i>	63°C ; 4,0-5,0	64 kDa			FRACHEBOUD; CANEVAS CINI, 2002

3.4. Aplicações das celulases

O uso industrial das celulases inclui a hidrólise enzimática; produção de glicose; tratamento de resíduos; indústria têxtil: remoção de manchas, clarificação e degomagem; indústria de alimentos: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, produção de Agar, como também no mercado de detergentes; na indústria de polpa de papel e na produção de bioetanol. Além disso, as celulases também têm grande potencial de aplicação na indústria de ração e suplementos para animais (RUEGGER; TAUKTORNISIELO, 2004; KIELING, 2002; TOLAN; FOODY, 1999).

3.4.1 Principais aplicações de celulases na indústria de alimentos

Segundo GANDRA *et al.* (2008), atualmente existe uma grande tendência em pesquisas com alimentos, ingredientes e aditivos naturais. Esta tendência tem aumentado a busca por novos métodos que visem a melhoria de características como maciez, textura e maior vida de prateleira dos pães, geralmente obtidas com a utilização de aditivos químicos. Nesse contexto, coadjuvantes tecnológicos "naturais", que não foram produzidos por síntese química, como as enzimas, vêm sendo cada vez mais utilizados (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002).

Durante as duas últimas décadas, o uso de celulases, hemicelulases e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose (BHAT, 2000).

A tecnologia enzimática desempenha um papel central nos processos de produção do vinho e da cerveja. Complexos enzimáticos contendo celulases, glucanases, hemicelulase e pectinases são utilizadas na indústria de vinho para acelerar o processo de vinificação e melhorar a qualidade do produto final (BHAT, 2000; ROLDÁN *et al.*, 2006).

Na indústria de alimentos, as celulases atuam na obtenção de sopas, cereais e vegetais desidratados, e são adicionadas de forma a aumentar a rehidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores (BHAT, 2000).

Na fabricação de pães, biscoitos e bolos, as celulases também são adicionadas, de forma a melhorar a textura, pela hidrólise de gomas e para permitir uma melhor distribuição dos aromas (TOLAN; FOODY, 1999). Celulases e hemicelulases são usadas para melhorar a qualidade de pão. A adição de celulases e hemicelulases ao processo de panificação leva a um aumento no volume do pão e melhora a porosidade no pão de trigo integral. Como consequência da ação hidrolítica da hemicelulases, pentosanases e xilanases, alguns açúcares livres como pentoses e hexoses podem ser liberados e utilizados pelos microrganismos (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002).

As preparações comerciais de enzimas destinadas à maceração enzimática de produtos obtidos a partir de frutas contêm um ou mais tipos de pectinases, além de atividades de celulases, hemicelulases, proteases e amilases, constituindo um coquetelenzimático. Esta combinação age sinergisticamente hidrolisando a parede celular das frutas (SILVA *et al.*, 2005).

Juntamente com as pectinases, as celulases e hemicelulases (xilanases, mananases e arabinases), são denominadas enzimas de maceração, sendo utilizadas para a extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais (BHAT, 2000; HAROS, ROSELL, BENEDITO, 2002). Celulases são adicionadas ao suco de frutas para promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos.

As celulasas podem ser utilizadas para aumentar a digestibilidade das rações. As enzimas estão envolvidas em todo o processo metabólico do organismo animal. No trato digestivo, a enzima adicionada à ração é ativada quando se mistura aos fluidos digestivos e sob a temperatura do organismo (ROTTER, 1990).

A utilização de enzimas, entre elas as celulasas, na alimentação de aves aumentou expressivamente nos últimos anos, principalmente pela elevação dos custos das matérias primas tradicionais e a busca por ingredientes alternativos como a cevada, aveia, arroz, trigo e seus subprodutos, entre outros (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005)

3.5. Processos de concentração de enzimas

Em relação à avaliação do custo envolvido para a obtenção de enzimas, as operações industriais representam um fator determinante para a economia do processo, e, portanto, tem um efeito muito grande na viabilidade técnico-econômica do processo.

O desenvolvimento de novos métodos e técnicas de separação e purificação de bioprodutos tem sido essencial para os avanços obtidos na área de pesquisas biotecnológicas (QUEIROZ *et al.*, 2001). Os critérios usados para a separação e purificação de uma enzima dependem da sua aplicação. Em indústrias de alimentos e detergentes, geralmente não é necessário um alto grau de pureza para a enzima produzida (MADAMWAR, 2005).

Para o processo de concentração de enzimas extracelulares, a primeira etapa para o isolamento é a separação das células do meio de cultura fermentado. Geralmente, a separação da enzima das células pode ser feita simplesmente por etapas de centrifugação ou filtração. Após essa etapa, caso a enzima esteja com baixa atividade, sugere-se uma etapa de concentração.

A etapa de concentração pode ser obtida pela remoção de água, através das seguintes maneiras: adição de um polímero do tipo Sephadex G-25; por ultrafiltração; liofilização ou precipitação (quando utilizado pequenos volumes para solubilização do “*pellet*”). Além da capacidade de concentração, os métodos de precipitação e de ultrafiltração também podem proporcionar, em alguns casos, uma purificação parcial da preparação enzimática de baixa resolução na amostra (NETO, 2007)

Os processos de separação com membranas vêm, cada vez mais, tornando-se importantes como alternativas aos processos convencionais de separação (tais como a destilação e a evaporação) nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos (LUCARINI; KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

A ultrafiltração tem se difundido e superado a utilização do processo de concentração por evaporação a vácuo. A disponibilidade de grande variedade de membranas com cortes de 2.000 a 300.000 Da acondicionadas em diferentes módulos (planos, tubulares e fibras ocas) tem permitido a crescente difusão das técnicas de separação por membranas no ambiente industrial. Esse processo vem sendo amplamente usado em bioprocessos, tanto na purificação quanto na concentração de proteínas e enzimas (SANT’ANA JR, 2001).

A liofilização é um método de desidratação de um material previamente congelado, em que o maior volume de água é removido por sublimação. Para facilitar a sublimação rápida, se mantém uma pressão muito baixa e o vapor deve ser eliminado por condensação à baixa temperatura. É reconhecidamente o melhor método para obtenção de produtos desidratados de alta qualidade, pois o material permanece congelado até estar completamente seco, retendo a forma original do material. É um método utilizado na produção de preparações enzimáticas, vacinas, frações de plasma e hormônios (PITOMBO, 2005).

A precipitação com sulfato de amônio é reconhecida por ser uma técnica eficiente na concentração de soluções protéicas diluídas no fracionamento de mistura de proteínas, sendo

a concentração de sal necessária para precipitação, variável para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal mais utilizado devido a sua alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade (LIMA *et al.*, 2008).

3.5.1. Processos de Separação por Membranas (PSM)

A membrana é definida como uma interface ou uma barreira semi-seletiva que separa duas fases (alimentação e permeado) e restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nestas fases. Elas podem ainda apresentar inúmeras características, podendo ser naturais ou sintéticas, neutras ou carregadas, espessas ou finas de estrutura homogênea ou heterogênea, com mecanismo de transporte ativo ou passivo, entre outras (MULDER, 1996).

No processo de separação por membranas, a corrente que atravessa a membrana é denominada permeado ou filtrado e a que fica retida pela membrana, que é a corrente enriquecida em um ou mais componentes, é chamada de retido ou concentrado (BAKER, 2004), como pode ser observado na Figura 3:

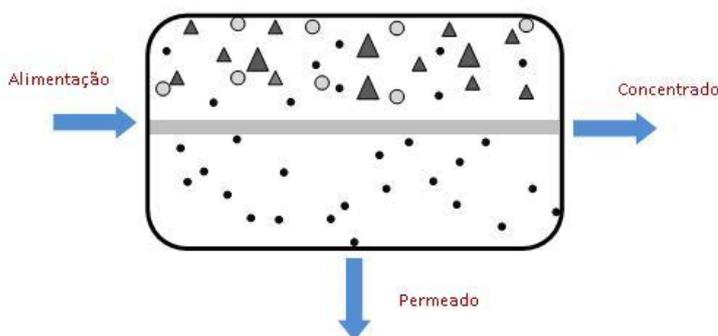


Figura 3. Esquema de um processo de separação com membrana.

Fonte: Adaptado de Harbert; Borges e Nóbrega, 2006.

O transporte de uma dada espécie através de membrana ocorre devido à existência de uma força motriz empregada. Nos processos com membranas, esta força motriz corresponde a uma diferença de pressão, de concentração, de temperatura ou de potencial elétrico do componente entre os dois lados da membrana (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2006).

O objetivo principal desses processos é a separação, a concentração e/ou a purificação de qualquer componente presente em solução. A separação é possível devido às diferenças existentes entre as propriedades físico-químicas das membranas e dos componentes que permeiam (MULDER, 1996).

Em processos que utilizam membranas porosas a capacidade seletiva esta diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. Em função do tipo de força motriz aplicada, o transporte das espécies através da membrana pode ser tanto convectivo como difusivo. No caso da ultrafiltração e microfiltração e nanofiltração, para os quais a força motriz é o gradiente de pressão através da membrana, o fluxo permeado é fundamentalmente convectivo (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2006).

Na realidade, o que ocorre é a utilização de processos combinados utilizando processos clássicos (como filtração, centrifugação, e outros) em conjunto com processos de

separação com PSM, utilizando cada tipo nas etapas onde possuem maior eficiência (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Os PSM são empregados largamente devido a algumas vantagens como: a economia de energia, visto que a maioria destes ocorre sem mudança de fase; a seletividade da membrana; a separação de compostos termolábeis, pois operam a temperatura ambiente e a simplicidade de operação e escalonamento (BAKER, 2004).

De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. A membrana é denominada porosa quando o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanho entre as partículas e os poros da membrana. Já as membranas densas não possuem poros, o transporte dos componentes envolve a sorção e a difusão através do material que constitui a membrana (BAKER, 2004).

As membranas devem apresentar características específicas conforme a separação desejada. As propriedades de separação das membranas dependem de fatores como: a natureza química do material constituinte, existência ou não de poros e, no caso de membranas porosas, o tamanho dos poros e sua distribuição (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

As membranas podem ser preparadas tanto na geometria plana quanto na cilíndrica. A partir dessas duas geometrias, diferentes tipos de módulos podem ser construídos. Membranas na geometria plana são usadas tanto em módulos de tipo placa e quadro quanto em módulos do tipo espiral. Os módulos preparados a partir de membranas com geometria cilíndrica podem ser divididos em três categorias segundo o diâmetro externo (DE) do cilindro: módulo Tubular, $DE > 3$ mm; módulo capilar, $0,5\text{mm} < DE < 3$ mm e módulo do tipo fibra oca, $DE < 0,5$ mm (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2006).

A vida útil das membranas pode ser afetada pelo tipo de agente de limpeza e procedimentos empregados. Esses, por sua vez, dependem da natureza do resíduo presente na membrana após o processamento. Nos processos com membranas, a redução de fluxo do permeado com o tempo, é um problema inevitável. Na prática, no entanto, há algumas técnicas de operação desses sistemas que resultam em recuperação, ao menos parcial, do fluxo permeado. A mais comum é a retrolavagem, que é a inversão, por um intervalo curto de tempo, do sentido de fluxo permeado. Quando o valor do fluxo permeado, após sucessivos ciclos de limpeza, cair abaixo de um valor crítico pré-determinado (que varia de caso a caso), deve-se proceder à substituição das membranas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

3.5.1.1. Tipos de escoamento

Nos processos com membranas, duas configurações de escoamento podem ser utilizadas: o escoamento de modo tangencial (*cross flow filtration*) ou o escoamento de modo convencional ou perpendicular (*dead end filtration*), ou seja, sem escoamento da alimentação (MULDER, 1996).

No modo tangencial, a solução de alimentação escoar em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a esta. A alimentação escoar ao longo da superfície da membrana, gerando o acúmulo de apenas parte das partículas retidas. A polarização de concentração continua presente, mas é possível minimizar seu efeito, em particular, alternando a velocidade de escoamento da corrente de alimentação (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Portanto, as membranas mais usadas, especialmente em ultrafiltração (UF) são aquelas em que o material alimentado escoar paralelamente à membrana, de forma a reduzir o fenômeno de polarização por concentração (CHERYAN, 1998).

No modo convencional, a solução de alimentação escoia perpendicularmente à superfície da membrana, promovendo a formação de uma camada na sua superfície, semelhante a uma torta, devido ao acúmulo das partículas retidas. Esse acúmulo próximo à superfície da membrana gera o fenômeno da polarização por concentração (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006)

Um esquema do escoamento tangencial e perpendicular é apresentado na Figura 4.

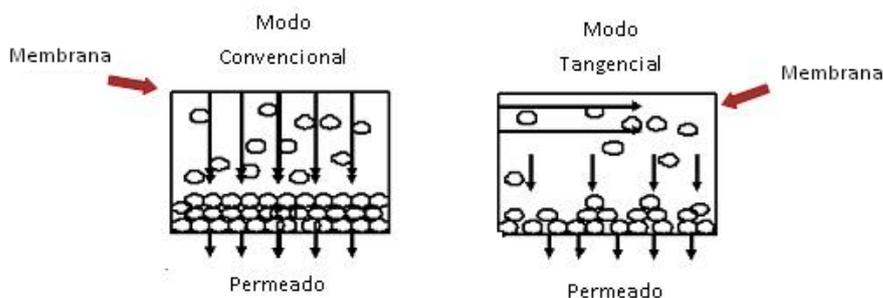


Figura 4. Esquema de escoamento convencional e tangencial.

Fonte: Adaptado de Coutinho *et al.*, 2009.

3.5.1.2. Ultrafiltração (UF)

A ultrafiltração (UF) é um PSM aplicado para concentrar ou fracionar macromoléculas, que podem ser retidas total ou parcialmente pela membrana, enquanto as pequenas moléculas atravessam a membrana livremente (MULDER, 1996).

A UF se baseia na seletividade entre as moléculas presentes e o tamanho dos poros da membrana, o que permite separar as partículas devido às diferenças de tamanho entre elas. O fluxo através da membrana é convectivo devido ao gradiente de pressão, que é a força motriz (NOBREGA; BORGES; HABERT, 2006).

Este processo é geralmente utilizado para retenção de macromoléculas e colóides presentes em solução e pode ser considerado como um processo intermediário entre os processos de microfiltração e nanofiltração, uma vez que o diâmetro de poros de membranas de UF varia entre 0,05mm e 0,001mm (MULDER, 1996).

Além de ser um método comercialmente viável, operacionalmente simples e de alta produtividade, permite uma purificação primária (purificação de baixa resolução), sob condições amenas de temperatura e pressão (KRSTIC *et al.*, 2007).

No processo de ultrafiltração também pode ocorrer a perda da atividade enzimática devido à força de cisalhamento gerada durante o processo de ultrafiltração. A força de cisalhamento é gerada pela rotação das moléculas de enzimas que, por sua vez, ocorre devido ao fluxo turbulento. As moléculas absorvem energia suficiente para quebrar as ligações químicas. A susceptibilidade das enzimas à força de cisalhamento e a consequente perda de atividade é um dos principais fatores a serem considerados e, portanto deve ser bem avaliada a condição de processo a ser empregado. Períodos longos de processamento utilizando a ultrafiltração podem causar perda significativa de atividade enzimática, estando, pois, as enzimas mais susceptíveis às forças de cisalhamento. Portanto, a escolha da membrana torna-se muito importante nos processos de ultrafiltração (KRSTIC *et al.*, 2007).

No trabalho feito por Rodrigues (2008), o preparado enzimático bruto produzido pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi concentrado por ultrafiltração em membrana com corte de 10 kDa. Neste processo, a preparação enzimática bruta foi fracionada em duas partes. A primeira definida como preparação enzimática concentrada por ultrafiltração ou

aquela que foi retida pela membrana de retenção e a segunda, definida como preparação enzimática ultrafiltrada. Na preparação enzimática concentrada, a recuperação foi de 23% e 50% da atividade da enzima β -1,3-glucanase e de protease, respectivamente. Já na preparação enzimática ultrafiltrada a recuperação foi de 8% da atividade somente de protease, o que indica que a linhagem produz uma fração da enzima com massa molar menor que 10 kDa.

Alberton *et al.* (2009) estudou a atividade da xilanase de *S. viridosporus* T7A produzida em fermentação submersa, após ultrafiltração seguida de liofilização com o filtrado congelado. A ultrafiltração foi considerada uma alternativa eficaz para concentrar a atividade enzimática do extrato bruto. Tal fato foi confirmado pelo aumento de cerca de três vezes na atividade enzimática, usando uma coluna com membrana de 30 kDa.

Faria (2010) utilizou o processo de ultrafiltração com fluxo tangencial para concentração de uma preparação bruta de lipase. O processo resultou na recuperação de cerca de 80% da atividade lipásica original na fração retida. Os resultados mostram uma boa recuperação da atividade lipásica na preparação lipásica concentrada. A fração permeada não apresentou atividade lipásica, indicando que toda a enzima presente no meio de cultura fermentado ficou retida na fração concentrada pelo processo de ultrafiltração.

3.5.2. Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A precipitação por adição de sal ocorre devido a um decréscimo de solubilidade resultante de um efeito *salting-out* (hidrofóbico) ou da combinação de um efeito *salting-in* (eletrostático) com um efeito *salting-out*. O efeito *salting-in* causa o aumento da solubilidade do soluto com o aumento da concentração de sal, enquanto o *salting-out* causa um decréscimo da solubilidade com aumento da concentração do mesmo (LADISCH, 2001).

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação interproteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação interproteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação das proteínas pelo efeito *salting-out* (LIMA *et al.*, 2008).

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína (LIMA *et al.*, 2008).

Os sais neutros têm efeito pronunciado sobre a solubilidade de proteínas, desta forma, os sais de íons divalentes, tais como cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), são muito mais eficientes na solubilização do que os sais de íons monovalentes como o cloreto de sódio (NaCl) (NELSON e COX, 2004).

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em *salting-out* devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à posição favorável de seus íons na série de *Hofmeister* com relação à efetividade de precipitação, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução, além de ser de baixo custo mesmo em alta pureza (LADISCH, 2001).

Uma desvantagem desse processo é a existência de sal em ambas as fases formadas. O sistema bifásico formado é constituído de uma fase líquida concentrada em eletrólito e uma

fase composta que contém a proteína precipitada com grande proporção de fase líquida salina, podendo também conter sal na fase sólida intrinsecamente ligado a ela. Assim, são necessárias operações como a diálise ou diafiltração para a eliminação do sal da fase precipitada e processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte final. Em alguns casos, esses tratamentos limitam em parte as aplicações do processo de precipitação por *salting-out* devido ao custo dos mesmos (LADISCH, 2001).

A precipitação com sulfato de amônio é comumente usada na primeira etapa da purificação para retirar as proteínas que precipitam em concentrações diferentes da proteína de interesse e ainda para concentrá-la (SLIVINSKI, 2007). Entretanto, esse procedimento pode levar muito tempo até que as partículas precipitadas decantem, e pode ocasionar a inativação da enzima em virtude da modificação da estrutura tridimensional. Trata-se, portanto, de um método agressivo para essas moléculas, pois sua função bioquímica depende de sua estrutura. A aplicação desse método só é viável, portanto, quando a adequada conformação da proteína é recuperada após a precipitação (LUCARINI; KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

A adição do sal, na quantidade correta, pode seletivamente precipitar algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. O fracionamento salino de enzimas ocorre, a uma faixa limitada, pelo uso de diferentes concentrações de sais, em que baixas concentrações precipitam algumas proteínas não desejadas, que são descartadas, e a adição em altas concentrações precipitam a proteína desejada (GERHARTZ, 1990).

3.5.3. Liofilização

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais, teoricamente, devem apresentar uma estabilidade adequada por um longo período de armazenagem em temperaturas ambientes (TATINI JUNIOR; PARRA; PITOMBO, 2006).

O processo de liofilização pode ser definido como um processo no qual a maior parte da água contida em um produto congelado é removida por sublimação. Ou seja, a água passa diretamente do estado sólido para vapor sem passar pelo estado líquido. O processo de secagem é realizado em temperatura baixa e sob pressão reduzida (PITOMBO, 2005).

O processo de liofilização tem sido descrito como método a ser utilizado após a purificação enzimática, para manutenção da atividade durante armazenamento (TATINI JUNIOR; PARRA; PITOMBO, 2006). Aplica-se à remoção de qualquer solvente, mas em biotecnologia, o interesse fundamental se prende à água (PITOMBO, 2005).

A liofilização divide-se em três etapas: na primeira, o material é congelado, a seguir a água é sublimada sob pressão reduzida e na terceira etapa ela é removida por dessorção, ou seja, uma secagem a vácuo (pressão reduzida) (PITOMBO, 2005).

Esse processo de secagem possui uma série de vantagens que torna o método preferido para a conservação de materiais biológicos. O material permanece congelado até estar completamente seco e, portanto, elimina-se o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, ou seja, o processo retém a forma original do material. As modificações físico-químicas são inibidas e são minimizadas as perdas de constituintes voláteis ou a perda de atividade biológica ou outra atividade na preservação da estrutura da molécula. O produto liofilizado possui estrutura porosa, sendo prontamente reconstituído a seus respectivos tamanho e forma originais, quando imerso em água. Possuem boa estabilidade durante o armazenamento resultando em longo tempo de vida de prateleira. Produtos liofilizados são altamente higroscópicos e de fácil dissolução em água (PITOMBO, 2005).

Entretanto, estudos recentes com espectroscopia por infravermelho têm documentado que os problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar ao desdobramento molecular da proteína. O desdobramento não somente pode levar à desnaturação irreversível da proteína, mesmo se a amostra é reidratada imediatamente, mas também pode reduzir a estabilidade durante o armazenamento da proteína liofilizada (CARPENTER; IZUTSU; RANDOLPH, 1999).

As proteínas raramente podem ser liofilizadas sem perda da atividade, geralmente associadas às alterações em sua conformação. Portanto, um agente estabilizante, por exemplo, um açúcar ou um poli-álcool, normalmente é exigido (WANG, 2000).

A finalidade do congelamento dentro do processo de liofilização consiste na imobilização do produto a ser liofilizado, interrompendo reações químicas e atividades biológicas (PITONBO, 2005).

O congelamento é uma das etapas mais críticas do processo de liofilização. A estrutura do produto, o tamanho e forma são determinados após o congelamento. Esta estrutura não deve ser alterada durante o processo de liofilização, correndo-se o risco de ocorrer danos ou mesmo, a perda do produto (MURGATROYD, *et al.*, 1997).

Rodrigues (2008) utilizou a liofilização como primeira etapa de purificação da β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1. Um volume de 4.000mL do sobrenadante do meio de cultivo resultou em 92g de pó liofilizado, contendo 352UI totais de β -1,3-glucanase, o qual foi utilizado como preparação enzimática bruta de β -1,3-glucanase. A preparação enzimática bruta liofilizada apresentou 61,5% de atividade residual após 30 horas à temperatura ambiente. Quando acondicionada a baixas temperaturas (congelador), a atividade de β -1,3-glucanase manteve-se estável por mais de seis meses.

Antes de submeter o extrato ultrafiltrado à liofilização, Alberton (2004) o congelou por 12 horas. Neste processo ocorreu uma perda de atividade da xilanase em torno de 20%. No entanto, após a liofilização conseguiu-se concentrar 45 vezes a atividade enzimática em relação à obtida após o congelamento. No processo de ultrafiltração seguido de liofilização encontrou-se uma alternativa eficaz para concentrar a atividade enzimática do extrato bruto. O processo de ultrafiltração (em membrana de 30 kDa) seguido de liofilização foi efetivo para concentração enzimática da xilanase (45 vezes, 2.272,0 UI/g).

Para a obtenção da lipase extracelular liofilizada de *Colletotrichum gloesporioides*, Faria (2010) submeteu a fração concentrada retida pela ultrafiltração ao processo de liofilização. Este processo foi utilizado, para que a preparação lipásica concentrada pudesse ser conservada por longo período de tempo e para que estivesse apta para o uso a qualquer momento, sem ter que repetir todo o processo de produção. A preparação lipásica liofilizada se apresentou como pó em tom palha, muito higroscópico e com 75 UI/mg de pó liofilizado, como atividade lipásica. A liofilização e o armazenamento da preparação lipásica liofilizada, a 4 °C, possibilitaram a sua utilização por um período de 80 dias, durante os quais se conservou bem e manteve-se estável.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

Para a produção das enzimas por fermentação no estado sólido foi utilizado farelo de trigo (*Triticum aestivum*) obtido em comércio local, triturado em moinho de facas com granulometria ≤ 5 mm.

4.2. Microrganismo utilizado

Como agente de fermentação foi utilizada a linhagem de *Aspergillus niger* 3T5B8, pertencente à coleção de culturas da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Trata-se de uma linhagem mutante obtida por melhoramento genético a partir de uma linhagem selvagem isolada da pimenta do Reino (COURI; FARIAS, 1995).

4.3. Meios de cultura e soluções utilizadas

4.3.1. Meio básico de gelose

O meio básico usado para a reativação do microrganismo foi o mesmo descrito por COURI; FARIAS (1995), substituindo a pectina por 5 g de Glicose Anidra e 5 g de Avicel (celulose microcristalina), como fonte de carbono (Tabela 3). A solução foi ajustada a pH 5,0 e autoclavada a 121°C por 15 minutos.

Tabela 3. Meio básico para reativação do microrganismo.

Nutriente	Concentração (g/L)
NaNO ₃	3,00
MgSO ₄	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	1,00
Avicel	5,00
Glicose	5,00
Ágar-agar	30,00

4.3.2. Meio de sabugo de milho (MSM)

O meio de sabugo de milho foi utilizado para a produção de conídios que foram utilizados na inoculação do meio de fermentação.

Conforme Gomes (1995), o meio é constituído de 4,6 g de sabugo de milho triturado (granulometria ≤ 6 mm) enriquecido com 6 mL da solução C (Tabela 4). Em seguida, o meio foi esterilizado a 121 °C por um período de 1 h.

Tabela 4. Meio de sabugo de milho.

Solução A: Preparo de 100mL	
KH ₂ PO ₄	20g
H ₂ O destilada	100mL
Solução B: Preparo de 100mL	
ZnSO ₄	3,96g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,60g
MnSO ₄	0,01g
H ₂ SO ₄ (95-97%)	0,5mL
H ₂ O destilada	100mL
Solução C: Preparo de 50 mL	
Peptona	2,80g
HCl 2N	0,05mL
Solução A	0,19mL
Solução B	0,025mL
H ₂ O destilada	50mL

4.3.3 Meio de fermentação no estado sólido

Como estratégia foram selecionadas com base em trabalhos anteriores realizados pela equipe do Laboratório de Processos Fermentativos, da Embrapa Agroindústria de Alimentos (COURI, *et al.* 2009) três condições de fermentação, tendo em vista a obtenção das maiores atividades de cada tipo de celulase. Após a produção das três condições (Tabela 5), os extratos enzimáticos obtidos foram misturados obtendo-se uma amostra única (Mistura) que foi armazenada a -18°C para futuramente ser concentrada.

O meio de fermentação consistiu basicamente de farelo de trigo triturado umidificado com solução de (NH₄)₂SO₄ em HCl 0,1N e celobiose. A composição variou para cada condição conforme descrito na Tabela 5. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. A aeração do sistema foi realizada com ar seco.

4.4. Reativação, produção de conídios e inoculação de linhagem para FES

O preparo da linhagem desde a sua condição inicial de estocagem até a sua utilização como uma suspensão de conídios está descrita nos itens abaixo (GOMES, 1995).

4.4.1. Reativação de linhagem

A linhagem foi reativada a partir de conídios preservados em solo estéril. Os conídios foram transferidos para tubos contendo meio básico (Tabela 3), e incubados a 32 °C por 7 dias. Após este tempo, os conídios foram novamente transferidos para tubos com meio básico e incubados sob mesma condição e período.

4.4.2. Produção de conídios e inoculação para fermentação no estado sólido

A partir da linhagem reativada (item 4.4.1.), obteve-se uma suspensão de conídios utilizando-se solução estéril de *Tween* 80 a 0,3%. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1mL

da suspensão e inoculou-se em meio de sabugo de milho (Item 4.3.2.), incubando-o a 32 °C por 7 dias. Após esse período, os conídios puderam ser extraídos do meio utilizando-se solução estéril de *Tween* 80 a 0,3%, e contados em câmara de *Neubauer* para determinação do volume de suspensão necessário à obtenção da concentração de conídios desejada.

A concentração de esporos utilizada para inocular o meio de fermentação variou de acordo com a condição utilizada, conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Condições de processo para produção de celulasas por fermentação no estado sólido, conforme descrito por Couriet *al.* (2009).

<i>Variáveis</i>	<i>Condição 1</i>	<i>Condição 2</i>	<i>Condição 3</i>
Temperatura	38 °C	30°C	30°C
Solução de Sulfato de amônio	80 mL*	80 mL*	40 mL*
Concentração de inóculo (esporos /g de meio)	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁸
Aeração	0,5 vvm	1,5 vvm	0,5 vvm
Nitrogênio (m/m)	0,1%	0,1%	0,3%
Celobiose (m/m)	0,2%	1,8%	0,2%

* Representa o volume adicionado de solução para cada 100 g de Farelo de trigo.

4.5. Fermentação em colunas aeradas

O meio de fermentação esterilizado e inoculado foi disposto em 10 colunas, com dimensões de 210 mm de altura e 22 mm de diâmetro, sendo adicionado aproximadamente 17 g de meio em cada coluna de vidro estéril. Em seguida, as colunas foram incubadas por 48 h na temperatura e aeração determinadas para cada condição de processo (Tabela 5). A aeração era realizada com ar natural, ou seja, sem processo de umidificação.

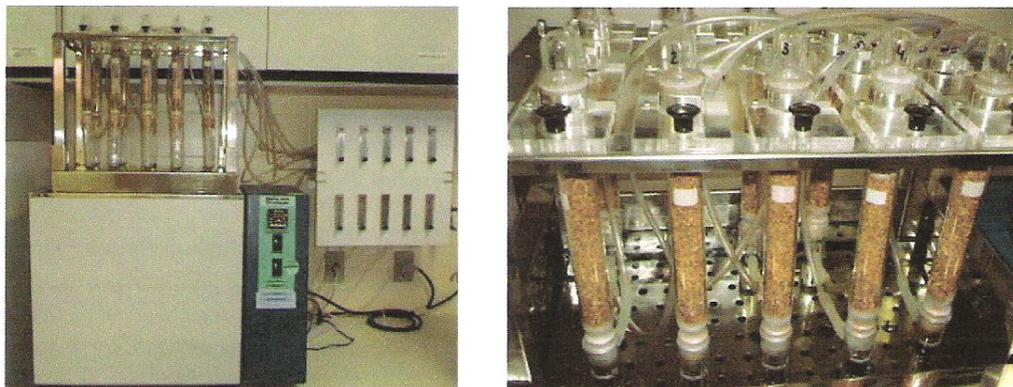


Figura 5. Sistema de produção de enzimas em colunas com aeração.

O equipamento para produção das enzimas (Figura 5) foi desenvolvido em projeto de pesquisa coordenado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.6. Extração de enzimas

As enzimas foram extraídas conforme Gomes (1995), substituindo o tampão acetado de sódio por citrato de sódio 0,05 M pH 4,8, a 32 °C por 1h. Utilizou-se uma relação de 100 mL de tampão para 40 g de meio fermentado. Após a extração, o sobrenadante passou por uma filtração rápida em papel de filtro, para retenção dos resíduos sólidos, e logo depois, foi refiltrado em membrana de microfiltração de nitrato de celulose (0,45 µm) para remoção dos

esporos fúngicos. Em seguida, os sobrenadantes de cada uma das condições de processo (Tabela 5) foram misturados e armazenados a -18°C .

4.7. Determinações de atividades enzimáticas

As atividades filter paper cellulase (FPase), carboximetilcelulase, β -glicosidase, poligalacturonase e xilanase das preparações enzimáticas obtidas com a mistura dos sobrenadantes foram quantificadas e os resultados das análises foram expressas em U/mL ou U/grama de massa seca (gms), sendo esta última gerada em função da umidade inicial do meio.

4.7.1. Determinação da Atividade Enzimática de FPase (C1)

A atividade filter paper cellulase (FPase) avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas endogluconases, exo-gluconases e β -glicosidases sobre um substrato celulósico cristalino (papel de filtro Whatman n 1). A mistura de reação consistiu de 1 mL do filtrado enzimático, 2 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 (anexo D) e uma tira de papel de filtro Whatman n^o1 (nas medidas de 1cm x 6 cm), reagindo por 3 min a 50°C (adaptado de WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990). Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do DNS. A mistura foi colocada em banho de água fervente por 5 min, sendo posteriormente resfriada e diluída, com a adição de 6,5 mL de água destilada, para a realização da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de glicose liberada pela ação das enzimas foi estimada a partir de uma curva padrão de glicose (anexo B) e a unidade de atividade FPásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1mmol de glicose $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ em pH 4,8 a 50°C .

4.7.2. Determinação da Atividade de carboximetilcelulose (CMCase)

A atividade enzimática de CMCase (EC 3.2.1.4) foi determinada a partir da quantidade de açúcares redutores liberados na reação enzimática e quantificados conforme o método do DNS (MILLER, 1959). A reação foi realizada em tubos contendo 250 μL de solução de carboximetilcelulose 4% e 250 μL do filtrado enzimático, por 10 min a 50°C (NOVO INDUSTRI, 1978). Após a reação em um tubo de ensaio adicionou-se 500 μL do hidrolisado a 500 μL de solução DNS. A mistura foi colocada em banho de água fervente por 5 min, sendo posteriormente resfriados, adicionados 6,5mL de água destilada e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540nm. A unidade de atividade CMCase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de produto liberado por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de glicose (anexo B).

4.7.3. Determinação da Atividade de β -glicosidase(β Gase):

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo metodologia de Wood e Garcia-Campayo (1990), utilizando a curva padrão para β -glicosidase (anexo C). A reação foi uma mistura de solução de celobiose 15 mM em tampão citrato de sódio 0,05M (anexo D), com o extrato enzimático, na proporção 1:1. A reação foi conduzida por 30 min a 50°C . Posteriormente, retirou-se uma alíquota desta mistura reacional adicionando-a ao reagente Glicose Oxidase/ Peroxidase (GOD-POD), na proporção de 1:100 e após 10 minutos a temperatura ambiente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 500 nm. A unidade de atividade enzimática β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose produzido por minuto de reação.

4.7.4. Determinação de atividade enzimática de poligalacturonase (PGase)

Conforme COURI (1993), a mistura de reação constituiu-se de 4mL de solução 0,25% de ácido poligalacturônico em tampão acetato 0,2 M e pH 4,5, e 0,1mL do extrato enzimático. As condições de reação foram por 30 min a 35°C, seguida com a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959), adicionando-se uma alíquota de 500 µL da mistura reacional a 500 µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS), e deixando a mistura em banho de água fervente por 5 min. Em seguida, a mistura foi resfriada, foram adicionados 6,5mL de água destilada, e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade enzimática foi expressa em U/mL, e unidade corresponde a 1µmol açúcar redutor (expresso como ácido galacturônico) produzido por minuto de reação.

4.7.5. Determinação de atividade enzimática xilanase

Para determinação da atividade de xilanase utilizou-se como substrato xilana oat spelt (Sigma) 1% diluída em tampão acetato 0,1M pH 5,0. A mistura de reação, constituída de 2 mL de substrato e 1 mL de filtrado enzimático, foi incubada a 50 °C por 30 min. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do DNS (MILLER, 1959), adicionando-se uma alíquota de 500 µL da mistura reacional em tubos contendo 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS). A mistura foi deixada em banho de água fervente por 5 min, e em seguida resfriada, adicionada 6,5mL de água destilada, e homogeneizada e feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Uma unidade de atividade xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (expressos como xilose) por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose ou glicose (GOMES *et al.*, 1992).

4.8. Curva padrão para determinação de proteína

As soluções foram preparadas conforme apresentado no anexo A, a partir da solução padrão de soro albumina bovina p. a. (SAB). Foram adicionados 1 mL de cada uma das soluções preparadas em dois tubos de ensaio, devidamente numerados. Em seguida, foi feita a dosagem de proteína pelo método de Lowry, usando como branco, 1mL de água destilada.

4.8.1 Determinação de proteína total no extrato enzimático

Esta determinação seguiu o método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951), onde a curva padrão concentrou-se em intervalos de 10 a 100 mg/L de solução padrão de soro albumina bovina.

O teor de proteína no extrato foi utilizado para o cálculo da atividade específica de cada enzima como a seguir:

$$\textit{Atividade específica} = \left(\frac{\textit{Atividade enzimática (UI/mL)}}{\textit{Conc. de proteína (mg/mL)}} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

4.9. Determinação de atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de Charney e Tomarelli (1947), utilizando 500 µL de azocaseína como substrato e 500 µL da enzima. Após 40 min de reação a 37 °C foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético (TCA), como agente de precipitação. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min, para

precipitação de sólidos em suspensão. Em seguida, foram recolhidos 1 mL do sobrenadante e adicionado a 1 mL de solução hidróxido de sódio 5 N, para formação do composto cromóforo.

A leitura da intensidade de cor ocorreu em espectrofotômetro a 428 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

4.10. Determinação da umidade

A amostra foi submetida a pesagem em balança analítica e a secagem em estufa sob temperatura de 80°C por um período de 24 h até obtenção de peso constante.

A umidade estabelece a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100, a fim de se expressar um valor percentual da mesma (Equação 1).

$$\% \textit{Umidade} = \left(\frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final}) \times 100}{\text{peso inicial}} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

4.11. Processos de concentração de enzimas

4.11.1. Processo de ultrafiltração (UF) com membranas

Todos os processos foram realizados em um sistema de separação por membranas em escala de laboratório. O sistema de UF utilizado foi constituído por uma célula de acrílico de módulo plano, alocado a uma membrana plana de polietersulfona (PES), tubos de aço inox, uma bomba de engrenagem (Marathon, modelo Power Wash XT) para circulação da alimentação, válvulas e manômetros para controle da pressão, um sistema de coleta do permeado e um banho termostático para a alimentação.

4.11.2. Ultrafiltração (UF) do extrato enzimático

O estudo da concentração do extrato enzimático por ultrafiltração foi realizado em um sistema de quadro e placas em aço inox, utilizando uma membrana plana de polietersulfona (PES) com massa molar de corte de 20 kDa, e área de 0,014m² (Figura 6). Foram realizados dois processos, chamados de processo A e processo B, sendo utilizados 800 e 500 mL de Amostra, respectivamente. Em todas as operações a pressão transmembrana foi mantida a 1bar. A amostra permanecia submersa em banho termostático a temperatura de 20 °C e a vazão de alimentação mantida a 136 L/h.

Em cada processo foram avaliados o comportamento do fluxo permeado, a concentração protéica, e a atividade das enzimas FPase, carboximetilcelulase, β-glicosidase, poligalacturanase, xilanase e protease. Também foi realizada a determinação de proteína visando cálculo da atividade específica para avaliar se houve além da concentração, uma pré-purificação da enzima.

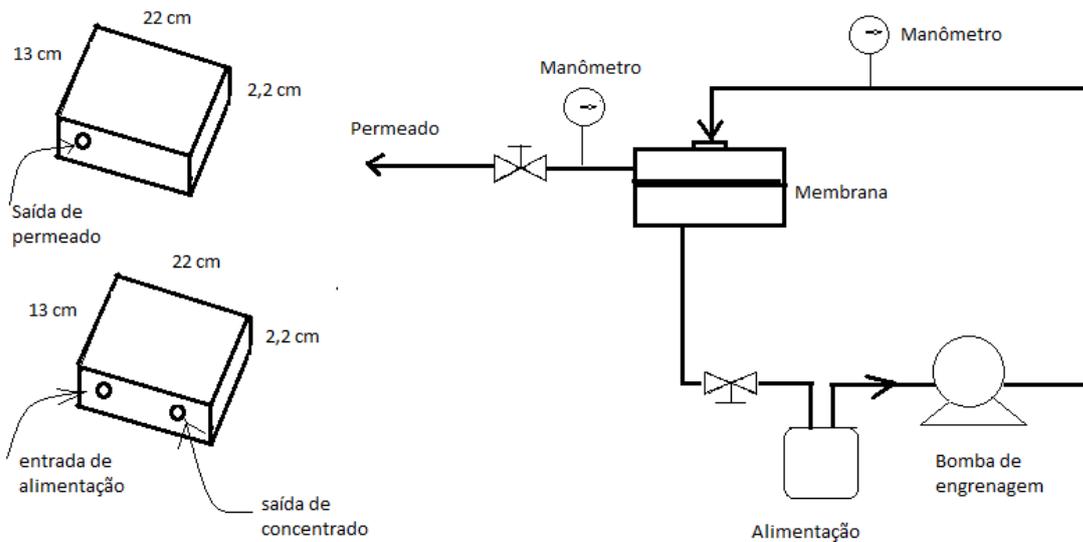


Figura 6. Resumo esquemático do sistema de ultrafiltração para os testes e medidas da célula de ultrafiltração com respectivas posições de entrada e saída das correntes.



Figura 7. Sistema de ultrafiltração onde foram realizadas as operações de concentração por membrana.

4.11.3. Sistema de Amicon

Para as operações de Zimografia, foi utilizada uma amostra concentrada 20 vezes, a 1bar, em um sistema de Amicon. Foi utilizada uma membrana milipore de PES (corte de 10kDa).

4.12. Precipitação com sulfato de Amônio

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada conforme a metodologia extraída de Bracht e Ishii-Iwamoto (2003). Para a operação foram utilizadas as seguintes concentrações de sal (sulfato de amônio): 20, 40, 50, 60 e 80% (p/v). O precipitado foi ressuspendido em tampão citrato pH 4,8 e dialisado durante 22 h com trocas de tampão.

4.12.1. Precipitação das enzimas e determinação de suas atividades enzimáticas

Para precipitação das enzimas, foi adicionado lentamente a quantidade determinada de sulfato de amônio a 30 mL do extrato enzimático, em frascos tipo Falcon, para obter soluções de 20, 40, 50, 60 e 80% (p/v) de saturação do sal. A adição era feita com agitação branda e em banho de gelo. Após completa solubilização, as amostras foram mantidas em geladeira *over night*, e em seguida foram centrifugadas a 4500rpm a 7°C por 10 min. O sobrenadante foi removido, e o precipitado ressuspendido em 5 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 (anexo D). Posteriormente, as amostras (precipitado e sobrenadante) de cada tratamento foram imediatamente submetidas à dessalinização por processo de diálise a 4°C por 20h com trocas sucessivas de tampão.

4.13. Liofilização do extrato enzimático bruto

A concentração das amostras em liofilizador da LIOTOP - L101 ocorreu com redução de 5 a 10 vezes do volume inicial, em liofilizador a - 55 °C, sob vácuo. Foram congelados 50 mL de amostras em nitrogênio líquido, antes de irem para o liofilizador. Após a concentração, o volume final foi medido, e determinadas as atividades e quantificados os teores de proteínas.

4.14. Rendimento dos processos de concentração e avaliação da purificação parcial:

O Fator de Concentração (FC) foi calculado conforme a equação 2.

A eficiência dos processos de ultrafiltração e precipitação com sulfato de amônio foi avaliada pela recuperação da atividade enzimática (RA) e pelo fator de purificação (FP), dados pelas equações 3 e 4, respectivamente (BIAZUS *et al.*, 2006, 2007; SANTOS, 2001; TOLEDO *et al.*, 2007).

$$FC = \frac{V_{inicial}}{V_{final}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$RA = \frac{\text{Atividade enzimática total do concentrado}}{\text{Atividade enzimática total da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$FP = \frac{\text{Atividade enzimática específica do concentrado}}{\text{Atividade enzimática específica da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

4.15. Caracterização bioquímica

4.15.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese com agente desnaturante (SDS) foi realizada segundo o método de Laemmli (1970), com gel de poliacrilamida a 12,5%, para determinar o perfil das proteínas no complexo enzimático. Foi utilizado o seguinte padrão de peso molecular: fosforilase b (94 kDa), soro albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa) (Sigma). A corrida foi realizada a 160 V por 2 h a 4° C. Em seguida, o gel foi corado com *Coomassie Blue R*.

4.15.2. Zimografia

A fim de se tentar estimar o peso molecular das enzimas estudadas, foram realizadas várias análises de zimografia, utilizando estratégias diferentes como tentativa de se buscar um procedimento adequado para cada atividade avaliada.

Foram realizadas diferentes estratégias para concentração da amostra utilizando diálise com polietilenoglicol (PEG 6000) (MAZOTTO *et al.*, 2010), com Centriprep (sistema de centrifugação com membrana) a 3000 rpm por 30 min, e utilizando um sistema de ultrafiltração da Amicon com membrana da Millipore de celulose regenerada (10000Da), e 1,5 bar de pressão.

O zimograma para protease foi realizado conforme o procedimento descrito por Mazotto *et al.*, (2010), utilizando gel de 10% e gelatina como substrato. Ao final da corrida, os géis para protease foram lavados com Triton, incubados em tampão citrato a 37°C por 24h e corados com solução vermelho congo.

Já para as outras atividades seguiu-se o mesmo procedimento que o descrito no item 4.15.1, para a separação das proteínas, porém sem a desnaturação da amostra. A separação das bandas foi realizada por aproximadamente 2h a 4°C com a finalidade de minimizar problemas com a atividade das enzimas e evitar a sua desnaturação durante a corrida. Foram preparados vários géis contendo os substratos específicos para cada enzima, variando-se a concentração de substrato (1 e 2%), tempo de incubação (0,5, 24 e 48 h), temperatura (37 e 50 °C), e concentração do corante vermelho congo (2, 1, 0.1 e 0.03%). A fim de se estimar os pesos moleculares das enzimas CMCase, betaglicosidase, Xilanase e poligalacturonase pela hidrólise dos substratos específicos para cada enzima presentes no gel, foram utilizados como substrato carboximetilcelulose, celobiose, xilana (*oat spelt*) e ácido poligalacturônico, respectivamente.

Após a eletroforese, o gel foi lavado com Solução de Triton X-100 por 1h, ou duas vezes a 15 min. Em seguida, os géis foram incubados com tampão citrato pH 4,8 a 37 e 50 °C por 24 e 48h. Em seguida, o gel foi corado com vermelho congo 0,03%, podendo, antes ser lavado com água destilada duas vezes por 15 min. Depois de corado, o gel foi mergulhado em solução de NaCl 1M, e deixado por 1 a 24h em geladeira.

Nos zimogramas para CMCase, β -glicosidase, Xilanase e poligalacturonase, foi utilizado solução de lugol como corante alternativo, sendo o gel escaneado imediatamente após corado.

4.16. Análise da composição de monossacarídeos

Os produtos de hidrólise de xilana (*oat spelts*), carboximetilcelulose, celobiose e ácido poligalacturônico pelo extrato enzimático bruto foram analisados qualitativamente por cromatografia de camada fina de alta eficiência (HPTLC) em placas de sílica gel 60 da

Merck, com tamanho de 20x20cm, sensibilizada com solução de fosfato de potássio dibásico 0,3M. Para o desenvolvimento da corrida foi utilizado um esquema de solventes composto por n-butanol-acetona-água (4: 5: 1) por volume. Como padrão de carboidratos foi utilizado uma mistura de monossacarídeos (ramnose, galactose, glucose e manose) a 2% em solução aquosa.

A hidrólise ocorreu em proporções variadas (idênticas as utilizadas nos itens de determinação de atividade) e após 18h de reação a 50°C, foram aplicados na placa 2 µL do padrão de carboidratos, do substrato, branco de reação e do material hidrolisado, seguindo-se ao desenvolvimento de três corridas para separação dos carboidratos. Realizou-se também o mesmo procedimento para o produto de hidrólise de ácido poligalacturônico, porém a temperatura de reação utilizada foi 35°C.

A cromatografia foi revelada com orcinol-H₂SO₄ (KANFER; HAKOMORI,1983) e posteriormente a placa foi exposta a 100 °C por 5 min.

4.17. Caracterização físico-química

4.17.1. Determinação do pH e da temperatura ótima de atividade para Carboximetilcelulase e β-glicosidase do extrato enzimático ultrafiltrado

O efeito do pH e da temperatura na atividade das enzimas carboximetilcelulase e β-glicosidase foi avaliado através de metodologia de planejamento experimental fatorial, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme a Tabela 6. O esquema utilizado foi um DCCR 2², incluindo quatro pontos centrais e quatro pontos axiais totalizando 12 ensaios.

Na Tabela 7 são apresentados os níveis codificados e reais utilizados no DCCR para avaliação do pH e temperatura ótimos nas atividades de CMCase e β-glicosidase.

A análise da matriz de respostas de atividade enzimática de CMCase e β-glicosidase foram feitas com auxílio do *software Statistica* versão 7.0. E os resultados obtidos foram comparados com os resultados de outros trabalhos.

Para a realização dos ensaios foi utilizado uma amostra de preparação enzimática concentrada por ultrafiltração. As determinações enzimáticas para CMCase e β-glicosidase ocorreram conforme descrito nos tópicos 4.7.2 e 4.7.3, mudando apenas a temperatura de reação e o pH das soluções de carboximetilcelulose e celobiose. Para os valores de pH de 3 a 5,5 utilizou-se tampão citrato de sódio (anexo D), já para os valores de 7,3 e 8,0 foi utilizado tampão fosfato (anexo E).

Tabela 6. Delineamento composto central rotacional 2^2 codificado para o estudo do efeito do pH e temperatura para as atividades de CMCase e β -glicosidase.

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura(°C)	pH
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 7. Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliação do pH e temperatura ótimos nas atividades de CMCase e β -glicosidase.

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	3,0	3,7	5,5	7,3	8,0
Temperatura (°C)	30	37	55	73	80

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comparação das três diferentes condições de produção de celulasas e enzimas correlatas por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação em estado sólido (FES)

Neste trabalho foram produzidos extratos enzimáticos de *A. niger* 3T5B8 por fermentação em estado sólido, utilizando-se três condições diferentes (Tabela 5), previamente selecionadas. Cada condição é melhor produtora de um tipo de celulase (CMCase, FPase, β -glicosidase). Os extratos enzimáticos obtidos nas 3 condições eram misturados gerando amostras que foram utilizadas para avaliação da eficiência dos processos de concentração por ultrafiltração, precipitação e liofilização. Durante o desenvolvimento do trabalho foram obtidas 3 amostras de celulasas, mas somente em uma das amostras (mistura 3) foram determinadas as atividades em cada uma das condições previamente definidas.

A Tabela 8 mostra os resultados das três condições separadamente para última amostra obtida (Mistura 3), onde, pode-se observar que na condição 1 obteve-se maior atividade de CMCase (94,9 UI/gms), e na condição 3 foi obtida maior atividade de β -glicosidase (416,5 UI/gms), corroborando as expectativas quando se propôs a estratégia de diferentes condições de produção da enzima para se obter um máximo de cada uma das celulasas. Entretanto, apesar de se esperar uma atividade maior de FPase na condição 2, não foi detectada nenhuma atividade de FPase em nenhuma das três condições para a mistura 3. Por este motivo, na Tabela 8, as atividades para FPase estão zeradas. Este resultado é discordante dos obtidos anteriormente pela equipe do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos (COURI et al, 2009) e também do resultado obtido pelas duas primeiras produções realizadas neste trabalho (Misturas 1 e 2 da tabela 11). Uma hipótese levantada seria a perda do domínio de ligação (CBD) de algumas enzimas durante a extração e preparo da amostra, resultando na ausência, ou drástica redução da atividade FPase, pelo fato dos CBDs exercerem um papel essencial para a hidrólise da celulose cristalina.

As atividades enzimáticas dos três extratos produzidos para composição da Mistura 3, são expressos em termos de unidade por volume (UI/mL) na Tabela 9. Ainda avaliando os resultados apresentados pelos três extratos produzidos para composição da Mistura 3, foi possível observar altas concentrações para as atividades das enzimas poligalacturanase e β -glicosidase na condição 3 sendo que esta última tem um papel importante no mecanismo de atuação das celulasas, pois atua sobre a hidrólise da celobiose, que é um inibidor da atuação das celulasas. Já na condição 1, obteve-se concentrações elevadas de CMCase e xilanase.

Zuñiga *et al.*, (2009) na produção de FPase, xilanase e endoglucanase empregando bagaço de cana de açúcar e *A. niger* com nutrientes (uréia, peptona, extrato de levedura e outros), à temperatura de 32°C, obteve atividades de 0,50, 43 e 41 UI/gms, respectivamente, após 72h de processo. Sukumaran *et al.* (2009) obtiveram 4,5 e 21,95U/g de massa seca para β -glicosidase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus niger* MTCC 7956, respectivamente, após 72h de produção. Os mesmos também conseguiram obter uma concentração máxima de 135,44 UI/g de CMCase produzidos por *Aspergillus niger* MTCC 7956, após 96h de produção, realizada por FES utilizando farelo de trigo como substrato.

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram uma produção de β -glicosidase por *A. niger* 3T5B8 19 vezes superior a obtida por Sukumaram *et al.*(2009), e uma produção de xilanase quase 7 vezes maior que a obtida por Zuñiga *et al.* (2009).

Considerando que este trabalho obteve em 48h a produção máxima de aproximadamente 95UI/g de CMCase, metade do tempo descrito por Sukumaran *et al.* (2009), observa-se que a linhagem mutante de *A. niger* 3T5B8 possui grande potencial para produção desta enzima, visto que obteve uma boa produtividade.

Tabela 8. Atividades enzimáticas em UI/g de massa seca na Mistura 3 para as três condições utilizadas.

Atividade (UI/g)	Extratos produzidos para composição da mistura 3		
	Condição 1 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)	Condição 2 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)	Condição 3 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)
FPase	0	0	0
CMCase	94,9 ± 0,3 (0,4)	41,3 ± 1,4 (3,4)	71,2 ± 0,6(0,9)
PGase	297,4 ± 6,3 (2,1)	221,4 ± 6,0 (2,7)	406,8 ± 0,0 (0,0)
βGase	293,8 ± 0,70 (1,6)	232,8 ± 7,1 (3,1)	416,5 ± 5,6 (1,3)
Xilanase	289,3 ± 4,4 (1,5)	15,1 ± 2,1 (13,9)	61,2 ± 1,0 (1,6)
Protease	54,4 ± 0,1 (0,3)	46,6 ± 1,2 (2,5)	51,7 ± 1,2 (2,3)

Onde: \bar{X} - média aproximada; σ - variância; CV % - coeficiente de variação

Os resultados obtidos para β-glicosidasas nas três condições trabalhadas demonstram uma alta atividade desta enzima (Tabela 9).

Tabela 9. Atividades enzimáticas do extrato líquido em UI/mL na Mistura 3 para as três condições utilizadas.

Atividade (UI/mL)	Extratos produzidos para composição da mistura 3		
	Condição 1 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)	Condição 2 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)	Condição 3 $\bar{X} \pm \sigma$ (CV %)
FPase	0	0	0
CMCase	18,3 ± 0,1 (0,4)	8,4 ± 0,3 (3,40)	16,1 ± 0,1 (0,9)
PGase	57,2 ± 1,2 (2,1)	45,1 ± 1,2 (2,7)	91,9 ± 0,0 (0,0)
βGase	56,5 ± 0,9 (1,6)	47,4 ± 1,4 (3,1)	94,1 ± 1,3 (1,3)
Xilanase	55,6 ± 0,9 (1,5)	3,1 ± 0,4 (13,9)	13,8 ± 0,2 (1,6)
Protease	10,5 ± 0,1 (0,5)	9,5 ± 0,1 (0,6)	11,7 ± 0,2 (1,4)

Onde: \bar{X} - média aproximada; σ - variância; CV % - coeficiente de variação

Através do método de Lowry, utilizado para a determinação da concentração de proteínas, obteve-se para cada uma das três condições utilizadas, concentrações de proteínas correspondentes a aproximadamente 4, 6 e 7 g/L para as condições 1, 2 e 3, respectivamente. De posse dos valores obtidos foram calculadas as atividades específicas aparentes (Tabela 10) das celulasas e enzimas correlatas. Os melhores resultados para CMCase e β-glicosidase continuaram sendo obtidos pelas condições 1 e 3, respectivamente, apesar de no caso da β-glicosidase, na condição 1 ter sido obtido praticamente a mesma atividade específica da condição 3.

Tabela 10. Determinação das atividades específicas aparentes (U/mg de proteína) do extrato líquido da Mistura 3 para as três condições utilizadas.

Mistura 3	Atividades específicas aparentes (U/mg)					Proteína (g/L) $\bar{X} \pm \sigma$
	CMCase $\bar{X} \pm \sigma$	β Gase $\bar{X} \pm \sigma$	PGase $\bar{X} \pm \sigma$	Xilanase $\bar{X} \pm \sigma$	Protease $\bar{X} \pm \sigma$	
Condição 1	4,2 \pm 0,1	13,1 \pm 0,9	13,2 \pm 1,2	12,9 \pm 0,9	2,4 \pm 0,1	4,3 \pm 0,0
Condição 2	1,3 \pm 0,3	7,5 \pm 1,4	7,2 \pm 1,2	0,5 \pm 0,4	1,5 \pm 0,1	6,3 \pm 0,1
Condição 3	2,3 \pm 0,1	13,2 \pm 1,3	12,9 \pm 0,0	1,9 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	7,1 \pm 0,1

De acordo com trabalhos anteriores realizados pela equipe da Embrapa CTAA, foi observado que o período de 48h era um período de alta produção das celulasas. Embora muitos trabalhos cite produções de 96 a 192 h, optou-se por uma produção de 48h visando dessa forma uma melhor produtividade.

Os resultados obtidos por Rocha (2010) para avaliação da produção das enzimas invertase, amilase e celulase por diferentes linhagens de *Aspergillus niger* apontaram que as maiores produções da enzima celulase ocorreram até o terceiro dia (72 h), havendo um decréscimo a partir do quarto dia (96 h).

Na Tabela 11 estão apresentadas as atividades enzimáticas obtidas após a mistura das três condições produzidas, para todas as amostras obtidas. Analisando-se os resultados, verifica-se que as amostras apresentaram variações em relação às diferentes atividades enzimáticas avaliadas. O principal motivo que pode explicar esta variação consiste no fato de cada amostra ter sido obtida pela mistura das 3 condições de processo e que a extração da enzima de cada condição não é homogênea, ou seja, não se pode garantir que cada amostra seja fruto da mistura dos mesmos volumes extraídos das diferentes condições. Outros motivos de cunho operacional que podem influenciar esta variação são temperatura do banho, temperatura ambiente e sistema de aeração.

Tabela 11. Valores das atividades enzimáticas das misturas 1, 2 e 3.

Misturas	Atividades enzimáticas (UI/mL)						Proteína (g/L) $\bar{X} \pm \sigma$
	FPase $\bar{X} \pm \sigma$	CMCase $\bar{X} \pm \sigma$	β Gase $\bar{X} \pm \sigma$	PGase $\bar{X} \pm \sigma$	Xilanase $\bar{X} \pm \sigma$	Protease $\bar{X} \pm \sigma$	
1	11,1 \pm 0,2	18,2 \pm 0,0	56,9 \pm 0,9	202,0 \pm 1,7	55,5 \pm 0,4	21,0 \pm 1,1	11,0 \pm 0,1
2	12,6 \pm 0,0	13,1 \pm 0,0	81,8 \pm 1,3	154,8 \pm 1,7	75,2 \pm 0,4	14,3 \pm 1,1	7,0 \pm 0,0
3	0	21,6 \pm 0,3	77,6 \pm 1,8	115,1 \pm 0,5	66,3 \pm 0,9	7,0 \pm 0,3	8,2 \pm 0,1

Hesseltine (1987) apontou que a ausência de agitação nos fermentadores estáticos e a baixa condutividade térmica dos materiais biológicos são os principais responsáveis pela elevação da temperatura do leito sólido e, conseqüentemente, pela redução da atividade microbiana. Desta forma, o principal problema operacional da FES está ligado à transferência de calor produzido pela atividade microbiana que se acumula durante a fermentação.

Raimbault (1998) mencionou que a aeração na FES mantém as condições aeróbicas, regula a temperatura do substrato e o nível de umidade, além de atuar na dessorção do dióxido de carbono formado durante a fermentação. Pelo processo de aeração, também é possível induzir reações metabólicas, seja por estresse hídrico, estresse térmico ou mudanças de

temperatura, podendo estes processos alterar drasticamente o comportamento bioquímico ou metabólico.

Sukumaran et al.(2009) obtiveram 1,14 UI/mL de FPase , 14,98 UI/mL de CMCase, 0,22 UI/mL de β -glicosidase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30. Os mesmos autores obtiveram 0,22 UI/mL para FPase, 6,77 UI/mL de CMCase e 2,84UI/mL de β -glicosidase utilizado *Aspergillus niger* MTCC 7956.

Com base nos resultados de atividade enzimática obtidos por *A. niger* 3T5B8 (Tabela 11) conclui-se que esta linhagem desponta como um grande produtor de celulases, pois diferentemente da maior parte das linhagens de *Aspergillus* e de *Trichoderma* reportadas na literatura, a 3T5B8 consegue produzir os 3 tipos de celulase de forma eficiente e com altas atividades, apesar de problemas com a produção ou estabilidade da FPase ainda precisarem ser resolvidos.

5.2. Avaliação dos processos de concentração

Esta seção é dividida em três tópicos, onde são apresentados os resultados das operações de concentração por ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e liofilização.

5.2.1 Concentração do extrato enzimático por ultrafiltração

Foi utilizada inicialmente uma membrana “virgem” de PES, sendo esta caracterizada através de sua permeabilidade antes de ser utilizada no processo. A mesma membrana foi reutilizada no segundo processo e a sua permeabilidade inicial foi utilizada para comparação das permeabilidades realizadas após a limpeza e antes do segundo processo. Dessa forma pode-se observar se a membrana manteve as suas características, ou se houve alteração de suas propriedades de fluxo, devido ao entupimento dos poros, ou a uma alteração de sua estrutura.

Permeabilidade da Membrana

Antes de iniciar as operações de concentração, a membrana “virgem” foi submetida a uma etapa de compactação com recirculação com água durante aproximadamente 1h, para que ocorresse a compactação da estrutura morfológica da membrana, reduzindo problemas de alteração ao longo da concentração. Em seguida, a permeabilidade hidráulica da membrana foi determinada através da medida do fluxo de permeado em três pressões diferentes (1, 2 e 3 Bar), conforme demonstrado na Figura 8. Esse procedimento foi repetido antes e após os processos de concentração do preparado enzimático a fim de verificar a limpeza e a integridade da membrana.

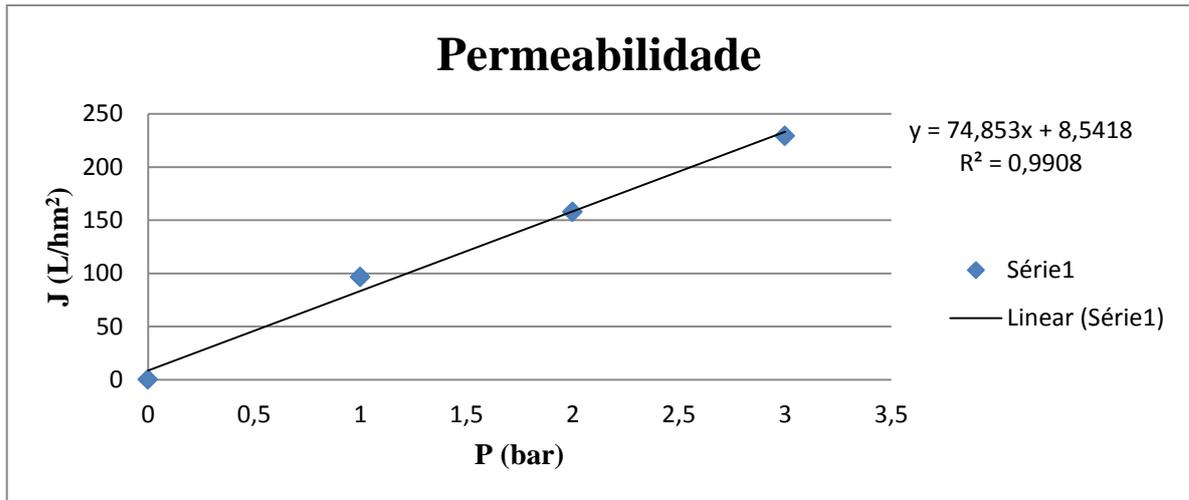


Figura 8. Permeabilidade hidráulica da membrana de Polietersulfona.

Observou-se um aumento do fluxo permeado com o aumento da pressão, porém isto não é uma regra, e nem sempre o aumento de pressão é sucedido pelo aumento do fluxo permeado.

Comportamento do fluxo permeado

O comportamento do fluxo permeado foi semelhante nos dois processos realizados, conforme pode ser observado no gráfico da Figura 9. Observou-se um decréscimo no fluxo permeado nos primeiros 40 min do processo, apresentando uma queda de quase seis unidades. O decréscimo no fluxo do permeado está relacionado ao aumento da resistência da membrana à transferência de massa devido à formação de incrustações, fenômeno também conhecido como *fouling*

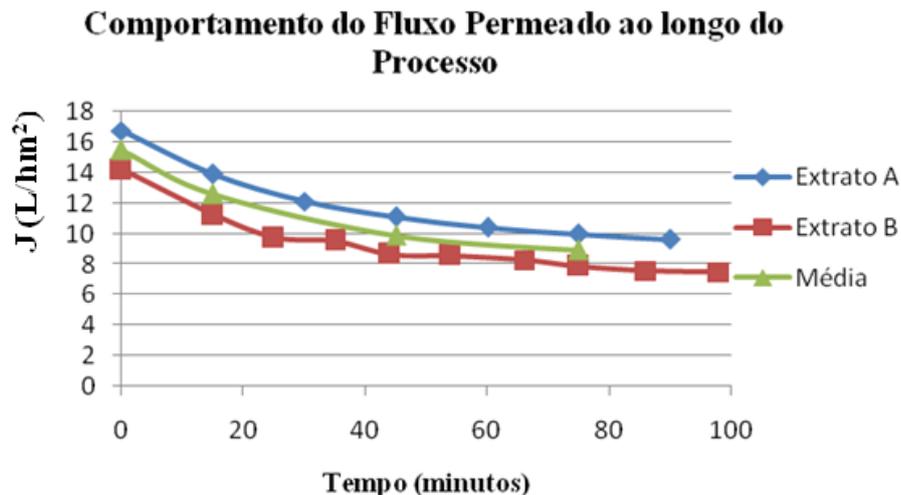


Figura 9. Comportamento do fluxo permeado ao longo do tempo de processamento do extrato enzimático com a membrana de corte de 20 kDa.

5.2.1.1. Comparação das atividades enzimáticas no concentrado obtido por UF e no extrato enzimático

Para as concentrações dos extratos enzimáticos foram realizadas duas operações sob as mesmas condições de temperatura (20°C) e pressão (1bar). Na primeira operação foram utilizados 800 mL da Mistura 1 e na segunda operação foram utilizados 500 mL da Mistura 2 (Tabela 11). O processo de ultrafiltração originou duas frações: a fração retida (preparação celulolítica concentrada) e a fração permeada. Ao final da ultrafiltração, a preparação celulolítica concentrada apresentou um volume de 400 e 250 mL, na primeira e na segunda operações, respectivamente, obtendo-se uma concentração em relação ao volume, de 50% nos dois processos.

A Tabela 12 mostra as atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos A e B, que correspondem às Misturas 1 e 2, respectivamente e após a concentração (concentrados e permeados A e B). À exceção da FPase, todas as enzimas apresentaram aumento de suas atividades no concentrado obtido tanto pelo processo A, bem como pelo B. Estes resultados indicam que houve uma significativa retenção pela membrana das enzimas CMCase, β -glicosidade, poligalacturanase, xilanase e protease tendo como consequência o aumento da concentração das mesmas (Tabela 12).

Considerando que o extrato enzimático foi concentrado de 800 mL para 400 mL no processo A, e de 500 mL para 250 mL no processo B, ou seja, metade do volume inicial, verificou-se uma boa eficiência do processo de UF, visto que a atividade das enzimas estudadas aproximou-se ao dobro do observado no extrato enzimático bruto para a maioria das atividades estudadas (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação entre as atividades do extrato bruto, concentrado e permeado dos processos A e B após a ultrafiltração.

Amostras	Atividades enzimáticas (UI/mL)						
	FPase $\bar{X} \pm \sigma$	CMCase $\bar{X} \pm \sigma$	β Gase $\bar{X} \pm \sigma$	PGase $\bar{X} \pm \sigma$	Xilanase $\bar{X} \pm \sigma$	Protease $\bar{X} \pm \sigma$	Proteína (mg/ml) $\bar{X} \pm \sigma$
Extrato A (Mistura 1)	11,1 \pm 0,2	18,2 \pm 0,0	56,9 \pm 0,9	202,0 \pm 3,4	55,5 \pm 0,4	21,0 \pm 1,1	11,0 \pm 0,0
Concentrado A	10,7 \pm 0,3	27,4 \pm 0,7	102,6 \pm 0,2	363,5 \pm 2,2	88,3 \pm 0,4	40,9 \pm 4,8	12,8 \pm 0,1
Permeado A	0	1,9 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0	0	5,9 \pm 0,0
Extrato B (Mistura 2)	12,6 \pm 0,0	13,1 \pm 0,4	81,8 \pm 1,3	154,8 \pm 1,7	75,2 \pm 0,5	14,3 \pm 1,1	7,0 \pm 0,1
Concentrado B	9,4 \pm 0,3	26,0 \pm 0,0	152,4 \pm 0,0	276,5 \pm 4,4	133,8 \pm 0,4	27,2 \pm 1,1	7,4 \pm 0,1
Permeado B	0	0	0	1,8 \pm 0,0	0	0	3,8 \pm 0,1

Onde: x - média aproximada; σ - desvio padrão

Um aspecto positivo a ser apontado é a recuperação das atividades enzimáticas, que, com exceção da atividade de FPase, apresentaram valores percentuais na faixa de 88 a 100% para o processo B (Tabela 13).

Contudo, o processo A apresentou um percentual de recuperação um pouco inferior para as atividades CMCase e xilanase (Tabela 13). Dois fatos podem ter influenciado estes resultados: a passagem de pequena quantidade de enzima pela membrana, visto que no

primeiro processo foi utilizada uma membrana virgem; outro fato é a elevada velocidade da vazão de circulação, considerada alta em relação a maioria dos trabalhos realizados, e o maior tempo de processo (devido ao maior volume de amostra no processo A).

No permeado do processo B foi encontrada atividade apenas para PGase, sendo determinado 1,8 UI/mL. Uma possível explicação seria uma alteração da estrutura da membrana até completa compactação, retendo melhor as enzimas no segundo processo, o que pode ser constatado pela detecção de atividade para CMCCase (1,9 UI/mL), β -glicosidase (0,1 UI/mL) e PGase (0,6 UI/mL) no permeado do processo A, enquanto que no processo B não foi detectada atividade de CMCCase e β -Gase.

Também deve ser destacado que, devido ao fluxo elevado, houve uma formação de espuma nos sete primeiros minutos do processo A. Já no processo B, este fato, minimizado pelo aumento gradual da circulação da amostra no sistema antes da aplicação da carga de pressão para o segundo processo (processo B).

Com exceção da atividade FPase, todas as outras enzimas tiveram um fator de purificação no segundo processo de 1,7 a 1,9, mostrando que além do aumento da atividade enzimática também houve uma purificação parcial das amostras (Tabela 13). Considerando que o aumento da concentração de proteína foi quase insignificante no segundo processo, deve-se considerar a possibilidade de uma remoção de agentes inibidores de atividade enzimática durante a ultrafiltração.

Tabela 13. Comparação das atividades específicas, percentuais de recuperação e fatores de purificação após a UF, para os processos A e B.

	Ativ. Específica ¹ (Amostra) (UI/mg)		Ativ. Específica ¹ (concentrado) (UI/mg)		Recuperação ² (%)		Fator de purificação ³	
	A	B	A	B	A	B	A	B
FPase	1,01	1,79	0,83	1,28	48,07	37,54	0,83	0,71
CMCase	1,65	1,87	2,14	3,51	75,13	98,93	1,29	1,88
βGase	5,17	11,64	8,02	20,59	90,08	93,15	1,55	1,77
PGase	18,34	22,02	28,40	37,37	89,98	89,30	1,55	1,70
xilanase	5,04	10,75	6,90	18,08	79,61	88,89	1,37	1,68
Protease	1,91	2,03	3,19	3,68	97,32	98,68	1,68	1,82

¹A Atividade específica foi calculada dividindo a atividade enzimática pela massa de proteína; ²Calculado conforme equação 3 (item 4.14); ³Calculado conforme equação 4 (item 4.14).

A concentração de proteína no permeado foi de 12,8 e 7,4mg/mL para os processos A e B, respectivamente (Tabela 12). Essa massa pode estar ligada a passagem de outras enzimas de massa molecular menor presentes no meio. Como foram encontrados valores de atividade de 0,1, 1,9 e 0,6 UI/mL no permeado do processo A, mesmo sendo valores pequenos, essa massa de proteínas pode estar relacionada à passagem de pequenas quantidades de enzimas. Outro fator que pode estar influenciando a presença dessa massa de proteína no permeado seria a presença de fragmentos de proteína oriundos da hidrólise causada pela ação de proteases sobre a FPase e outras enzimas que não as avaliadas, já que as atividades de CMCCase, β Gase e enzimas correlatas não foram reduzidas.

A determinação da concentração de proteína possibilitou a realização do balanço de massa do processo. Foram observadas perdas de 1,3 g e 0,7 g de proteínas para os processos A e B, respectivamente. Essa massa de proteína, provavelmente, ficou retida na membrana, seja pelo entupimento dos poros ou adsorção, podendo ser responsável pela redução do fluxo, conforme observado no gráfico apresentado na Figura 9.

5.2.2. Avaliação da concentração por precipitação com sulfato de amônio seguido de diálise

A concentração do extrato enzimático com sulfato de amônio foi testada conforme descrito no item 4.12 e em seguida foi realizada a retirada de sal das amostras através de diálise. Posteriormente, foram determinadas as atividades das enzimas presentes no extrato enzimático (mistura 2) e a concentração de proteínas utilizando metodologia descrita em materiais e métodos.

A quantificação de proteína ocorreu antes e após a concentração por precipitação, segundo a metodologia descrita no item 4.8. Ela serviu para determinar às atividades específicas das enzimas presentes na preparação enzimática antes e após a precipitação, possibilitando dessa forma avaliar se ocorreu algum grau de purificação das amostras.

Após as diálises foram medidos os volumes das amostras, para a determinação da recuperação percentual das atividades avaliadas, podendo comparar de forma proporcional a atividade realmente obtida com a atividade esperada.

Para a diálise foram testadas inicialmente três membranas diferentes, duas de celulose regenerada, com *cut-off* de 12.000-16.000 Da e outra de 12.000-14.000 Da. Porém, antes do término do processo, as membranas se romperam. Provavelmente, isso ocorreu devido a uma possível alteração da estrutura da membrana, causada pela atividade celulolítica uma vez que a membrana é constituída de celulose regenerada e, portanto, não teria resistido à ação das celulasas presentes na preparação enzimática. Portanto, foi realizado outro teste com membrana de Ester celulose (CE) de 500 Da, que suportou bem ao processo de diálise.

Foram realizadas cinco condições de saturação (20, 40, 50, 60 e 80%), com o propósito de avaliar qual condição de saturação seria mais eficiente para concentração e pré-purificação das enzimas presentes. Através de uma avaliação visual observou-se que à medida que o valor da concentração de sulfato de amônio aumentava, o sobrenadante obtido ficava mais claro e a altura (quantidade) do precipitado aumentava (Figura 10). Para a amostra saturada com 20% de sal (sulfato de amônio), não foi possível observar nenhuma precipitação, e a amostra submetida a uma saturação de 40% apresentou uma altura de precipitado insignificante. Portanto estas duas condições foram descartadas.



Figura 10. Amostras das três condições de saturação, 60%, 50% e 80% da esquerda para a direita, respectivamente, após a precipitação e centrifugação.

Comparação entre as diferentes condições de saturação

Avaliando-se as atividades enzimáticas obtidas após precipitação com 50% de sulfato de amônio, verificou-se que os valores encontrados foram menores ou próximos aos do seu sobrenadante, portanto não houve uma boa precipitação (Figura 11).

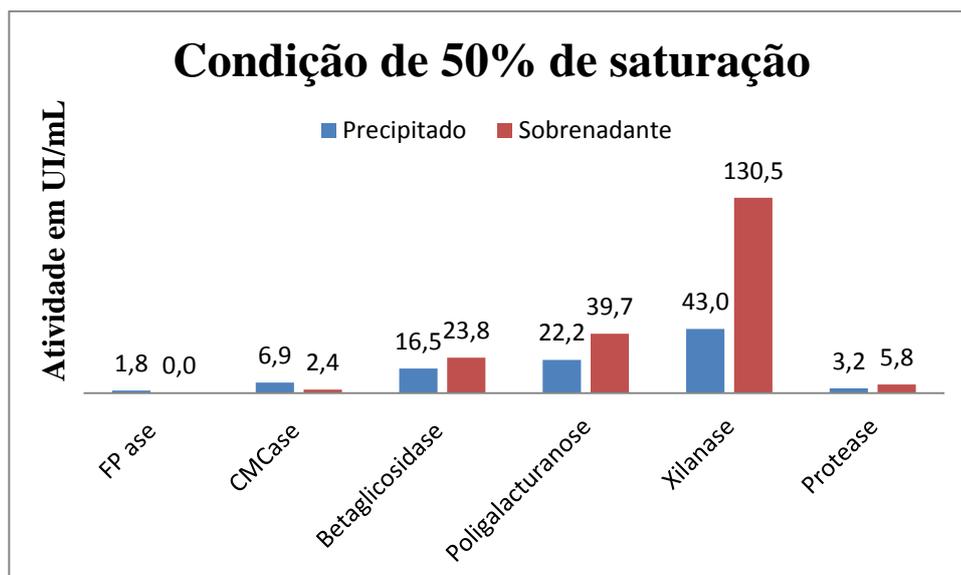


Figura 11. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 50% de saturação em UI/MI

Já nas amostras precipitadas a 60 e 80%, todas as atividades foram maiores que nos seus sobrenadantes (Figuras 12 e 13). No sobrenadante da condição de 80%, as concentrações enzimáticas foram mais baixas comparado com o sobrenadante da amostra saturada a 60%, apresentando atividade apenas para xilanase e poligalacturanase. Este resultado demonstra que a precipitação foi mais eficiente em 80% do que em 60% de saturação com sulfato de amônio.

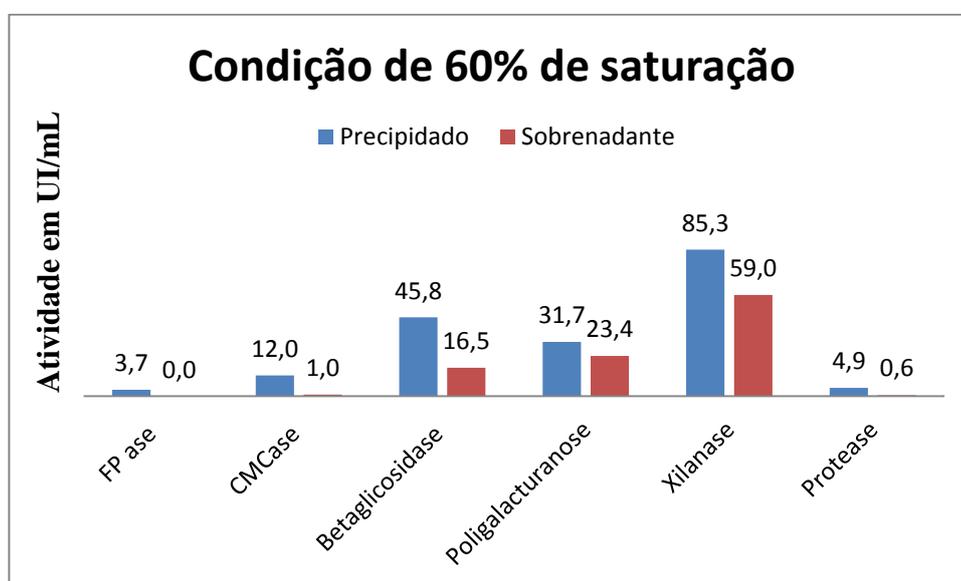


Figura 12. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 60% de saturação.

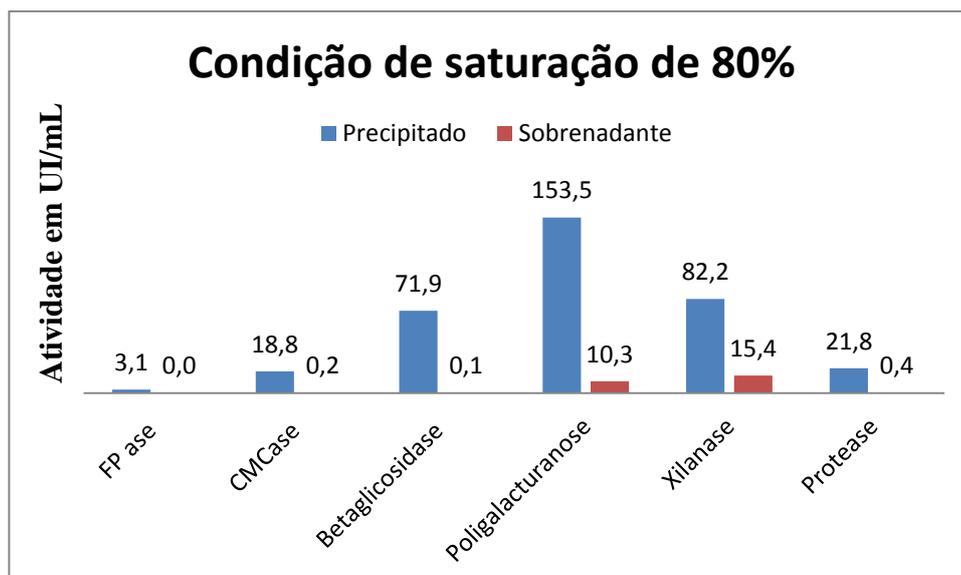


Figura 13. Atividades do sobrenadante e do precipitado para a condição de 80% de saturação em UI/mL.

Analisando-se o fator de purificação na condição de 80 % de saturação (Tabela 14), pode-se observar que a CMCase e a xilanase foram as que obtiveram maiores valores 2,8 e 3,8, respectivamente. No entanto, a xilanase obteve melhor purificação nas condições de 50 e 60%. Pelas determinações de protease, observou-se um aumento na condição a 80% de saturação. A protease presente no extrato enzimático, pode ter influenciado na perda de atividade enzimática, principalmente da FPase, visto que esta apresentou recuperação máxima de 14 % da sua atividade inicial.

As proteases produzidas por determinado organismo podem inibir a ação de outras enzimas, uma vez que estas são proteínas (AZEREDO *et al.*, 2001; RAJMOHAN *et al.*, 2002). Castro (2006) observou em seu estudo que de todos os extratos analisados, o único que apresentou atividade proteásica sobre o substrato avaliado foi o produzido por *A. niger* ATCC 16404, o que é coerente com o relatado pela literatura, visto que diversas espécies desse gênero, como *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. saitoi* são utilizadas na obtenção de proteases comerciais (SIGMA 2002).

Analisando o baixo percentual de recuperação obtido, pode-se supor perda de uma parte da atividade enzimática ocasionada por algum processo de desnaturação irreversível das enzimas ou pela ação da protease presente.

Tabela 13. Avaliação da recuperação enzimática e do fator de purificação obtidos para a condição de saturação a 50%, 60% e 80%.

Enzima	Atividade enzimática (UI/mL)			Atividade específica¹ (UI/mg)			Recuperação² %			Fator de Purificação³				
	Amostra (mist. 2)	Saturação			Amostra (mist. 2)	Saturação			Saturação			Saturação		
		50%	60%	80%		50%	60%	80%	50%	60%	80%	50%	60%	80%
FP ase	12,6	1,8	3,7	3,1	1,8	1,3	1,4	0,8	5,1	13,1	18,3	0,7	0,8	0,4
CMCase	13,1	6,9	12,0	15,8	1,8	5,2	4,7	4,0	19,4	41,3	88,4	2,9	2,6	2,2
βGase	81,8	16,5	45,8	71,9	11,6	12,3	17,9	18,3	7,4	25,2	64,4	1,1	1,5	1,6
PGase	154,8	22,2	31,7	153,5	22,0	16,5	12,3	33,3	5,2	9,2	61,9	0,7	0,5	1,5
Xilanase	75,2	42,9	85,3	82,2	10,7	32,0	33,2	20,9	20,9	51,0	80,1	3,0	3,1	1,9
Protease	14,3	3,2	6,4	21,75	2,0	2,4	2,5	5,5	8,2	20,2	108,6	1,2	1,3	2,7

¹A atividade específica – calculada dividindo as atividades enzimáticas pela massa de proteína.

² Calculado conforme equação 3 (item 4.14); ³ Calculado conforme equação 4 (item 4.14).

Analisando os resultados de atividade específica e fator de purificação (Tabela 14), as saturações a 60 e 80% demonstraram ser melhores para concentração das enzimas avaliadas, apesar de em termos de protease que é indesejável no extrato enzimático, o processo a 60% seria o mais aconselhável. Paralelamente, analisando as atividades enzimáticas após a diálise observou-se que, de forma geral, para as celulases, a condição de 80% de saturação foi a que proporcionou o melhor resultado, obtendo-se atividades de 15,8 e 72 UI/mL para CMCase e β -glicosidase após concentrar 1,3 vezes em relação ao volume (Tabela 15). No entanto, o volume final após a diálise foi considerado alto e, portanto, a amostra não apresentou um aumento acentuado da atividade após precipitação.

De posse dos valores de atividade enzimática e de proteína antes e após a concentração, foi possível calcular as atividades específicas aparentes das enzimas no extrato bruto e nas três condições de saturação (Figura 14). Com os valores de atividade específica pode-se avaliar se o processo além de concentrar o extrato também foi capaz de pré-purificar o extrato enzimático.

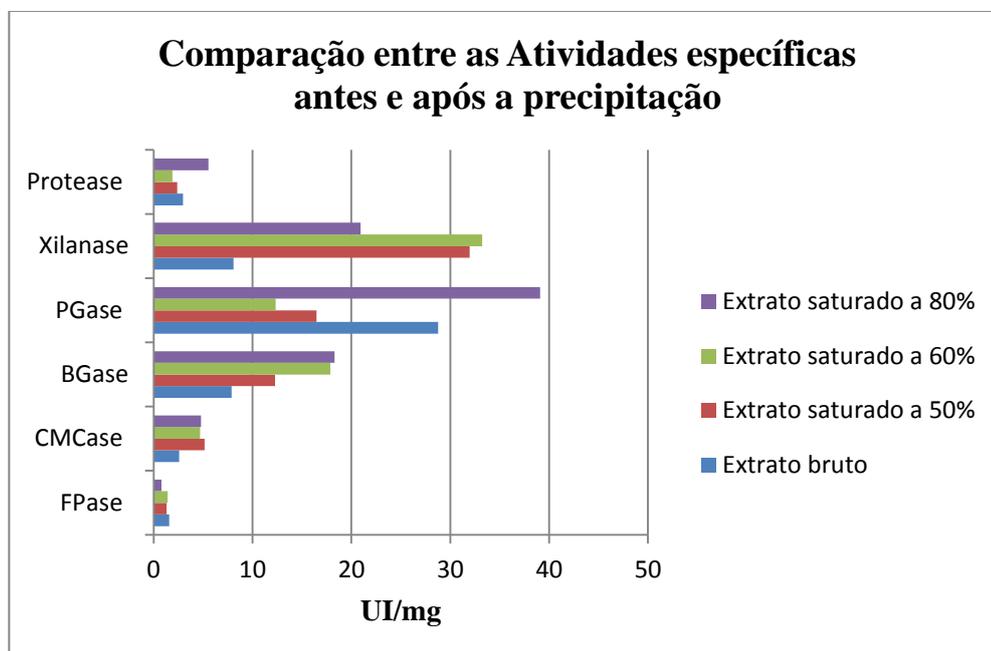


Figura 14. Comparação entre as atividades específicas das preparações enzimáticas concentradas por precipitação e a preparação enzimática bruta.

Comparando as atividades específicas das amostras concentradas por precipitação e dos extratos brutos, observou-se que nenhuma condição testada foi capaz de pré-purificar a FPase. A condição de 50% de saturação foi suficiente para aumentar a atividade específica somente da CMCCase e da Xilanase. Na condição de 60%, tanto CMCCase, xilanase como β -glicosidase foram pré-purificadas. No entanto, na condição de 80%, além destas enzimas, para poligalacturonase também se obteve resultado positivo (Tabela 14). Em relação às celulases FPase, CMCCase e β -glicosidase, as condições de 60 e 80% proporcionaram praticamente o mesmo desempenho.

5.3. Concentração do extrato enzimático bruto por liofilização

Visando a concentração do extrato enzimático por liofilização foram realizadas duas operações, processo A e B, sendo submetidos 50 mL da preparação enzimática em

liofilizador, pelo tempo de 7 e 9 horas, respectivamente. Após liofilização, foram obtidos volumes finais de 6,5 e 11 mL da preparação enzimática concentrada.

De forma geral, a liofilização demonstrou ter concentrado as enzimas (Tabela 15), no entanto a perda de atividade das enzimas durante o processo foi significativa, exceto para xilanase, pois enquanto o volume de amostra foi diminuído em 7,6 vezes (processo A), o aumento de atividade foi de no máximo 5,9 vezes (CMCase). Sugere-se que com a concentração do extrato possa ter ocorrido também a concentração de inibidores da ação destas enzimas. Esta justificativa ganha força com relatos da atuação de algumas proteínas na inibição de PGase, e alguns carboidratos como celobiose, D-frutose, D-glucose, D-xilose e D-manose, como inibidores de enzimas com atividade β -glicosidase (CERVONE et al., 1987; CUIXIA et al., 2009; SEIDLE et al., 2004; SEIDLE et al., 2006; PARK et al., 2001)

Por outro lado, o processo que obteve uma redução maior do volume apresentou (processo A) uma recuperação superior a 100% para a atividade xilanase. Sugere-se que esse fato pode ter ocorrido pela presença de ativadores da atividade da enzima na amostra, que também foram concentrados pela liofilização e com isso atuaram de forma mais significativa na estrutura da enzima. Como existem carboidratos na amostra, esta hipótese fica ainda mais fortalecida, visto que existem alguns trabalhos relatando a atuação de glicose e maltose, como ativadores de algumas xilanases (MATSUI & BAN-TOKUDA, 2008; KHANNA & GAURI, 1993).

A quantidade de proteínas na preparação liofilizada era de aproximadamente 50 e 28 g de proteína/L de enzima para os processos A e B, respectivamente. Observando-se os valores de atividade específica obtidos, pode-se observar que, exceto para xilanase, houve uma redução da atividade específica das enzimas (Tabela 15), fato que já era esperado, em virtude do processo de liofilização apenas retirar água do processo.

Tabela 14. Avaliação da recuperação da atividade enzimática após a liofilização para os processos A e B.

Enzimas	Atividade enzimática (UI/ml)			Atividade específica ¹ (UI/mg)			Recuperação ² (%)	
	Extrato bruto	Liofiliz A	Liofiliz B	Extrato bruto	Liofiliz A	Liofiliz B	Liofiliz A	Liofiliz B
FPase	0	0	0	0	0	0	0	0
CMCase	21,6	127,9	57,7	2,7	1,8	2,1	77,0	61,5
β -gase	77,6	337,4	199,5	9,6	4,7	7,1	56,5	59,1
PGase	115,1	570,2	441,2	14,2	8,0	15,7	64,4	88,2
Xilanase	66,3	762,5	275,8	8,2	10,7	9,8	149,5	95,7
Protease	7,0	39,0	25,5	0,9	0,5	0,9	72,4	83,8

¹Calculado conforme equação 3 (item 4.14); ² Calculado conforme equação 4 (item 4.14)

5.4. Comparação entre os processos de concentração

Analisando-se os resultados obtidos nos processos, ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e liofilização foram selecionados os melhores resultados de cada um deles visando identificar qual é o mais indicado para concentrar o extrato celulolítico produzido por *A. niger* 3T5B8.

A comparação foi feita em termos de atividade específica, recuperação (%) e fator de purificação, exceto para liofilização, em virtude de neste processo ocorrer apenas remoção de

água, não havendo purificação. A comprovação deste fato pode ser observada na Tabela 16 em virtude da redução da atividade específica após liofilização. Adicionalmente, no tocante a recuperação (%), os resultados obtidos com a liofilização, em geral, foram inferiores aos dos 2 outros processos. Com base nestes dados, o processo de liofilização, nas condições em que foi executado, não se mostrou adequado para concentrar as celulases.

Em relação ao parâmetro fator de purificação, pode ser verificado que nos processos de ultrafiltração e precipitação houve uma purificação parcial do extrato enzimático. (Tabela 16). Os resultados obtidos para ambos os processos foram semelhantes, exceto para protease que foi maior para o segundo processo. Como a protease é uma enzima indesejável no extrato enzimático, pode-se considerar que em relação a purificação, a ultrafiltração foi o melhor processo de concentração.

Avaliando-se o desempenho dos processos de ultrafiltração e precipitação em relação a recuperação da atividade enzimática, os melhores resultados foram obtidos no processo de ultrafiltração. Portanto, comparando-se os três processos de concentração utilizados, pode-se afirmar que o processo de ultrafiltração foi o que apresentou melhor eficiência, visto que apresentou elevada recuperação da atividade enzimática e ainda apresentou uma purificação parcial do extrato enzimático.

Tabela 16. Comparação entre os melhores processos de concentração.

<i>Enzima</i>	<i>Atividade específica Das amostras (UI/mL)</i>			<i>Atividade específica dos concentrados (UI/mg)¹</i>			<i>Recuperação %²</i>			<i>Fator de Purificação³</i>		
	<i>UF</i>	<i>PPT 80%</i>	<i>Liof.</i>	<i>UF</i>	<i>PPT 80%</i>	<i>Liof.</i>	<i>UF</i>	<i>PPT 80%</i>	<i>Liof.</i>	<i>UF</i>	<i>PPT 80%</i>	<i>Liof.</i>
FPase	1,8	1,8	0	1,3	0,8	0	37,5	18,3	0	0,7	0,4	-
CMCase	1,8	1,8	2,7	5,2	4,0	1,8	98,9	88,4	77,0	1,9	2,2	-
βGase	11,6	11,6	9,6	12,3	18,3	4,7	93,2	64,4	56,5	1,8	1,6	-
PGase	22,0	22,0	14,2	16,5	33,3	8,0	89,3	61,9	64,4	1,7	1,5	-
Xilanase	10,7	10,7	8,2	32,0	20,9	10,7	88,9	80,1	149,5	1,7	1,9	-
Protease	2,0	2,0	0,9	2,4	5,4	0,5	98,8	108,6	72,4	1,8	2,7	-

UF: ultrafiltração, PPT 80%: precipitação com 80% de saturação com sulfato de amônio, Liof: liofilização

¹ Atividade específica – calculada dividindo as atividades enzimáticas pela massa de proteína.

² Calculado conforme equação 3 (item 4.14);

³ Calculado conforme equação 4 (item 4.14);

5.5 Determinação do pH e Temperatura ótimos através de planejamento experimental

O extrato celulolítico utilizado para os experimentos de determinação do pH e da temperatura ótimos foi o concentrado por ultrafiltração. A escolha deste extrato em específico, se deve ao fato da ultrafiltração ter sido selecionada como o melhor processo de concentração e também ter sido capaz de pré-purificar as enzimas presentes.

5.5.1 Determinação do pH e da temperatura ótimos para a atividade da CMCase

Os resultados de atividade enzimática de CMCase obtidos com a aplicação do delineamento composto central rotacional 2^2 estão expressos na Tabela 17.

Tabela 15. Atividades de carboximetilcelulase obtidas com o delineamento composto central rotacional 2^2 .

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	CMCase (U/mL)
1	37	3,7	19,16
2	73	3,7	45,97
3	37	7,3	5,99
4	73	7,3	15,22
5	30	55	14,16
6	80	55	38,19
7	55	3,0	30,12
8	55	8,0	10,43
9	55	55	36,27
10	55	55	34,36
11	55	55	35,82
12	55	55	33,85

Os dados de atividade enzimática foram inseridos no programa computacional Statistica e os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão para a atividade de CMCase, com 5% de significância estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Coeficientes de regressão e desvios padrão do planejamento fatorial composto central rotacional 2^2 para a atividade de CMCase.

	Coefficiente de regressão	Desvio Padrão	t(6)	p-valor
Média*	35,08	1,31	26,76	0,000
(1)Temperatura (L)*	8,77	0,93	9,44	0,000
Temperatura (Q) *	-4,87	1,04	-4,68	0,003
(2) pH (L) *	-8,99	0,93	-9,68	0,000
pH (Q) *	-7,84	1,04	-7,54	0,000
1L x 2L*	-4,39	1,31	-3,35	0,015

*Fator estatisticamente significativo (95% de confiança)

A análise dos resultados da atividade de CMCase demonstrou que todas as variáveis foram significativas, a um nível de confiança de 95% e, portanto, todas foram consideradas para a avaliação da análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido para este planejamento foi de 0,9775.

A Tabela 19 mostra a análise de variância (ANOVA) para determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima CMCase.

Tabela 16. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e Temperatura na atividade da CMCase.

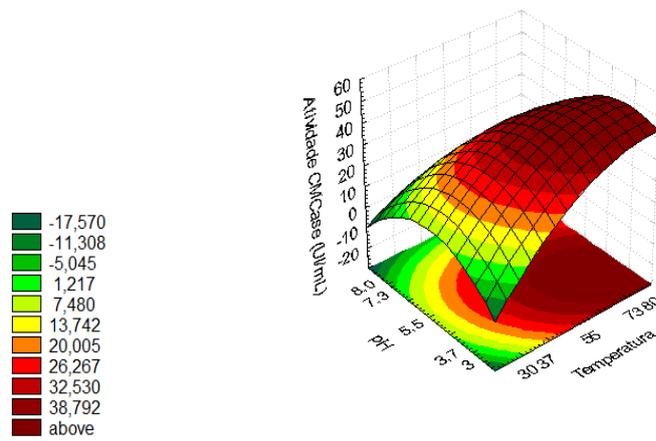
Fonte de variação	Soma dos quadrados (SS)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática	F _{cal}	F _(0,05; 5; 6)
Regressão	1797,71	5	359,54	52,29	3,11
Resíduos	41,25	6	6,88		
Total	1838,97	11			

Para a atividade de CMCase através do teste F de Snedecor realizado, observou-se um F calculado ($F_{\text{modelo}} = 52,3$) 16,8 vezes maior que o F tabelado ($F_{0,05;5;6} = 3,11$). De acordo com avaliação realizada, pode-se dizer que o modelo matemático obtido é preditivo e significativo a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A adequação do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98$). Os resultados obtidos para os pontos centrais mostraram uma boa repetibilidade, devido ao baixo erro puro (1,3). Esses resultados foram satisfatórios para a obtenção de um modelo que representa a relação real entre as variáveis independentes (temperatura e pH) e a atividade da enzima CMCase na preparação enzimática ultrafiltrada.

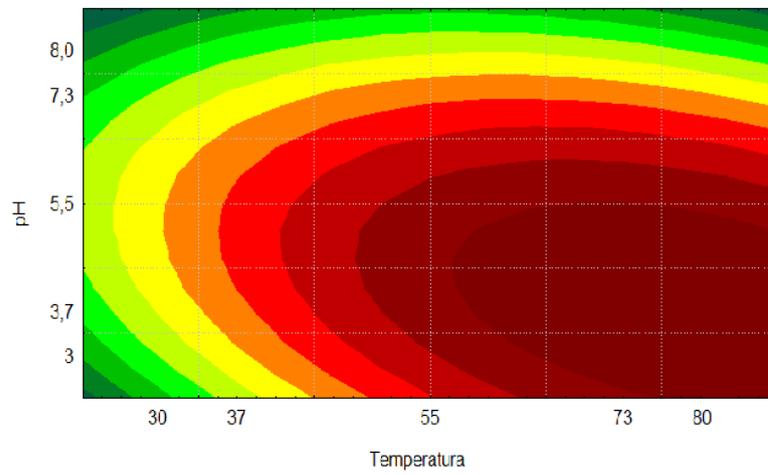
Após a validação do modelo através da ANOVA, pôde-se obter o modelo de segunda ordem (equação 5) que representa a atividade da enzima CMCase em relação as variáveis estudadas (pH e temperatura).

$$\text{Atividade CMCase} = 35,08 + 8,77 T - 4,87T^2 - 8,99 \text{ pH} - 7,84 \text{ pH}^2 - 4,39 \text{ TpH} \quad \text{Eq.(5)}$$

Verificou-se através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno que valores maiores de pH influenciaram negativamente a atividade da CMCase, enquanto perfil contrário foi obtido para a temperatura. Com base nas condições de processo estudadas, pode-se afirmar que a faixa que aumentará a atividade da enzima fica, aproximadamente, entre 60 e 80°C e pH entre 3 e 5,5 (Figura 15).



(a)



(b)

Figura 6. Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade de CMCCase.

5.5.2 Determinação do pH e da temperatura ótimos para a atividade da β -glicosidase

Os resultados de atividade enzimática da β -glicosidase para o delineamento composto central rotacional 2^2 estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20. Atividades de β -glicosidase obtidas com o delineamento composto central rotacional 2^2 .

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	β -glicosidase (UI/mL)
1	37	3,7	17,35
2	73	3,7	5,02
3	37	7,3	0,00
4	73	7,3	0,00
5	30	55	6,65
6	80	55	1,50
7	55	3,0	24,68
8	55	8,0	2,00
9	55	55	31,40
10	55	55	31,33
11	55	55	31,67
12	55	55	30,16

Na tabela 21 estão apresentados todos os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão para a atividade de β -glicosidase, considerando-se 5% de significância.

Tabela 21. Coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial composto central rotacional 2^2 , para a atividade de β -glicosidase.

	Coeficiente de regressão	Desvio Padrão	t(6)	p-valor
Média*	31,1508	0,33	93,24	0,000
(1)Temperatura (L)*	-2,46	0,24	-10,39	0,002
Temperatura(Q)*	-14,37	0,27	-54,17	0,000
(2) pH (L)*	-6,81	0,24	-28,80	0,000
pH (Q)*	-9,71	0,27	-36,60	0,000
1L x 2L*	3,08	0,33	9,23	0,003

*Fator estatisticamente significativo (95% de confiança)

A análise dos resultados da atividade de β -glicosidase demonstrou que todas as variáveis foram significativas, a um nível de confiança de 95%. A tabela 22 mostra a análise de variância (ANOVA) para determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima β -glicosidase.

Tabela 22. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e Temperatura na atividade da β -glicosidase

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SS)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática	F _{cal}	F _(0,05;5;6)
regressão	2079,02	5	415,80	73,16	3,11
resíduos	34,10	6	5,68		
total	2113,12	11			

Na análise dos resultados observou-se que a atividade de β -glicosidase apresentou um $F_{\text{calculado}}$ ($F = 73,2$) 23,5 vezes maior que o tabelado ($F_{0,05;5;6} = 3,11$) e coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98$). Os resultados obtidos para os pontos centrais mostraram uma boa repetibilidade, devido ao baixo erro puro (0,45). Desta forma, pode-se obter o modelo de segunda ordem (equação 6) que descreve o comportamento da atividade de β -glicosidase.

$$\text{Atividade } \beta\text{-glicosidase} = 31,151 - 2,457 T - 14,369 T^2 - 6,813 \text{ pH} - 9,71 \text{ pH}^2 + 3,082 T \text{ pH} \quad \text{Eq.(6)}$$

O modelo foi altamente significativo, sendo possível construir as superfícies de resposta (Figura 16) e definir as regiões de interesse.

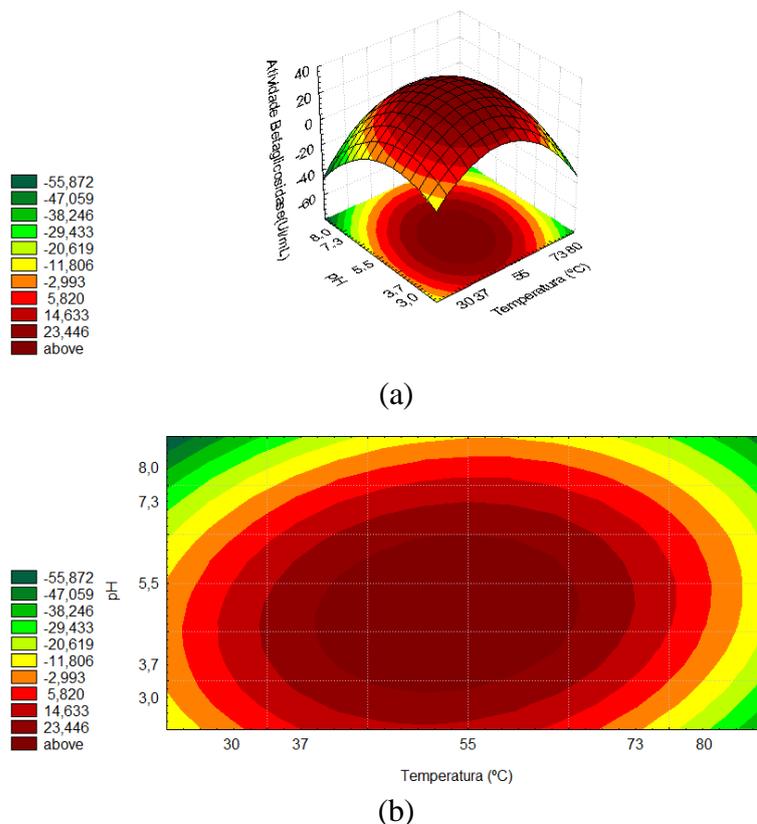


Figura 7. Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade de β -glicosidase.

Verificou-se através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno que valores extremos de pH e temperatura, dentro da faixa estudada, influenciaram negativamente a atividade da β -glicosidase. Com base nas condições de processo avaliadas pode-se afirmar que a faixa que aumentará a atividade da β -glicosidase fica aproximadamente entre 40 e 65°C e pH entre 3,7 e 6,0.

Levando-se em consideração que, normalmente, estas enzimas são aplicadas em processos biotecnológicos conjuntamente, o ideal é que a faixa de pH e temperatura utilizada seja a mesma para ambas as enzimas. Neste caso, 3,7 a 5,5 e 60 a 65 °C, respectivamente. Tanto a CMCase como a β -glicosidase apresentaram pH ótimo ácido. Resultado semelhante foi relatado por Lechner e Papinutti (2006) que verificaram pH ótimo de 3,5 para CMCase e 4,5 para β -glicosidase produzidas por *Lentinus tigrinus* por FES com farelo de trigo como substrato.

Gao *et al.* (2008) estudando as características de celulases produzidas por *A. Terreus* em fermentação no estado sólido utilizando palha de milho como substrato, observaram atividade ótima em pH 2 e pH 3 para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente. Ambas apresentaram temperatura ótima em 70°C.

Facchini *et al* (2011) observaram a temperatura ótima entre 50 - 55 °C para CMCase de *Aspergillus japonicus*, com pH ótimo em 4,0.

A grande maioria dos microrganismos de interesse para a área de alimentos, incluindo a maior parte dos patógenos, pertencem ao grupo dos mesófilos, possuindo temperatura ótima de crescimento entre 25 e 40°C, e temperatura máxima entre 40 e 50°C. Portanto, em alguns casos, são necessários uso de temperatura numa certa faixa que não favoreça o crescimento desses microrganismos. A faixa de Temperatura ótima verificada para as enzimas CMCase e β -glicosidase se apresenta fora da faixa ótima para os microrganismos mesófilos, e a faixa de pH ótimo está compatível com os valores de pH encontrados em vários alimentos, desde muito ácidos, até os de pouca acidez. Portanto, os resultados de temperatura e pH ótimos obtidos pelas enzimas em estudo são considerados promissores para futuras aplicações em alimentos, embora seja ainda necessário avaliar a estabilidade a temperatura e ao pH para se avaliar o potencial de uso das celulases em alimentos.

Analisando-se a Tabela 23 pode-se verificar que os resultados para temperatura e pH ótimos das enzimas CMCase e β -glicosidase foram concordantes com os resultados encontrados na maioria dos trabalhos avaliados.

Tabela 23 - Comparação dos resultados encontrados para temperatura e pH ótimos de CMCase e β Gase com os obtidos em outros trabalhos:

Tipo de enzima	Condições de produção	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Referência
CMCase parcialmente purificadas de <i>A. terreus</i> M11	Produzidas por FES com palha de milho por 96 h a 45°C, pH 3, 80% de umidade e 0,8% de extrato de levedura.	70	2,0	Gao <i>et. al</i> (2008)
CMCase de <i>T. viride</i> purificada por cromatografia	Preparação celulásica comercial	50	4,2	Liu e Xia (2006)
CMCase produzida por <i>A. niger</i>	Produzido por FS por três semanas.	47-61	4,8-5,5	Castro (2006)
CMCase purificada de <i>A. niger</i>	Produzida por FS em 3% de farelo de trigo, a 30°C por 96h.	50	4,5	NADEEM (2009)
CMCase parcialmente purificada de <i>A. niger</i> 3T5B8	Mistura de 3 produções Produzidas por FES por 48h, sob condições otimizadas.	60-80	3,0-5,5	Este trabalho
β -Gase de <i>A. pulverulentus</i> purificada	Produzido por FES em meio farelo de trigo, a 29°C por 4 dias.	60	4,0	Mase, Mori e Yokoe (2004)
β -Gase de <i>P. occitanis</i> mutante	Produzida em por FS a 28 °C por 7 dias.	60	4,5	BHIRI <i>et al.</i> (2008)
β -Gase de <i>A. japonicus</i>	Preparação enzimática desidratada	65	5,0	Korotkova <i>et al.</i> (2008)
β -Gase de <i>T. reesei</i>	Preparação enzimática desidratada	70	5,0	Korotkova <i>et al.</i> (2008)
β -Gase de <i>P. verruculosum</i>	Preparação enzimática desidratada	60	5,5	Korotkova <i>et al.</i> (2008)
β -Gase parcialmente purificadas de <i>A. terreus</i> M11	Produzidas por FES com palha de milho por 96 h a 45°C, pH 3, 80% de umidade e 0,8% de extrato de levedura.	70	3,0	Gao <i>et. al</i> (2008)
β -Gase parcialmente purificadas de <i>A. niger</i> 3T5B8	Mistura de 3 produções Produzidas por FES por 48h, sob condições otimizadas.	40-65	3,7-6,0	Este trabalho

5.6. Caracterização bioquímica das celulases

5.6.1. Determinação do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático de *A. niger* através de eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel desnaturante é uma ferramenta muito utilizada para caracterização de componentes protéicos e detecção de proteínas após separação do polipeptídeo desnaturado. Entre as principais vantagens desse método incluem a identificação de proteínas particulares na mistura, a rápida estimativa do peso molecular da enzima e uma medida semi-quantitativa de isoenzimas específicas (LACKS e SPRINGHORN, 1980).

Através desta técnica foi realizada a detecção do peso molecular de proteínas do extrato enzimático obtido por *A. niger* 3T5B8 em FES, conforme descrito no item 4.14.1.

Procedeu-se a separação das bandas de proteínas em SDS-PAGE (12,5%) da amostra bruta e outra concentrada 4 vezes em sistema Amicon, ambas coradas com *Coomassie blue*, o

que possibilitou a obtenção de até 15 bandas visíveis, com pesos moleculares que variaram entre 13,3 e 104,6 kDa (Figura 17). Destas bandas, 10 estão fortemente coradas e 5 apresentam baixa intensidade. Com base nestes resultados, sugere-se que as bandas fortemente coradas podem estar relacionadas com enzimas que foram induzidas em resposta ao substrato utilizado no processo fermentativo em estudo.

A alta atividade proteásica presente no extrato bruto, como relatado anteriormente, pode indicar que algumas bandas visualizadas no SDS-PAGE podem ser de fragmentos de proteínas liberados pela atuação de proteases.

Dyka *et al.* (2009) analisando a separação das bandas de proteínas de um sistema celulolítico e hemicelulolítico de *Bacillus licheniformis* SVD1 com presença de atividades de avicelase, CMCase e mananase, observou a presença de 14 bandas no sobrenadante bruto, que variam de 14 a 122 kDa, enquanto a amostra purificada por cromatografia de exclusão molecular teve 8 bandas entre 14 e 70 kDa. Embora muitas não tenham apresentado atividades de CMCase e de xilanase em testes de zimografia, sugere-se que possam haver bandas relacionadas a outras enzimas.

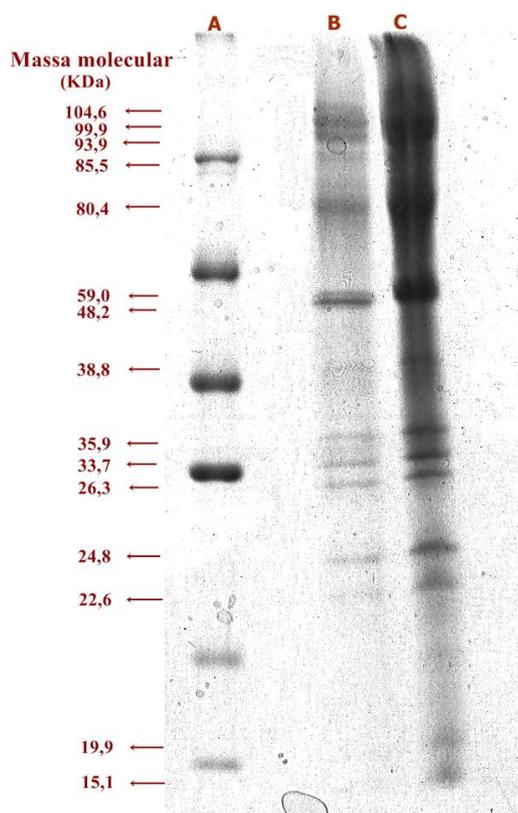


Figura 8. Perfil eletroforético de proteínas em SDS-PAGE da amostra bruta e concentrada e a relação de peso molecular por banda de proteína. (A) Padrão; (B) Extrato Bruto; (C) Extrato concentrado pelo sistema Amicon.

5.6.2. Determinação do peso molecular das enzimas presentes no extrato enzimático de *A. niger* através de zimografia

Com o intuito de determinar o peso molecular das celulasas e enzimas correlatas presentes no extrato enzimático de *A. niger*, realizou-se a zimografia, conforme descrito no item 4.15.2 usando diferentes substratos de acordo com a atividade de interesse.

Como estratégia inicial para concentração da amostra para posterior procedimento da zimografia foi realizada a diálise por PEG 6000 (MAZOTTO *et al.*, 2010), porém sem sucesso, visto que após 22h de processo, a membrana (celulose regenerada) dividiu-se em fragmentos, provavelmente devido a atuação das celulasas da amostra. Outros métodos foram utilizados, mas a melhor concentração obtida foi de 16 vezes utilizando um sistema da Amicon.

Na formulação do gel inicial contendo glicerol, os géis corados com vermelho congo 0,03% ficaram muito claros. Posteriormente, com a substituição do glicerol por água, os géis ficaram com aspecto mais homogêneo. Já para a coloração com Lugol ocorreu o contrário, obtendo-se géis com um aspecto mais homogêneo com glicerol. Foram testados vários géis com condições diferentes, variando-se quantidades de amostra e de substrato, tempo e temperatura de incubação e corantes (lugol e vermelho congo).

Para a enzima protease foi obtido resultado positivo usando malha de 10%, com a visualização de três bandas próximas das faixas de 145, 103 e 88 kDa (Figura 18).

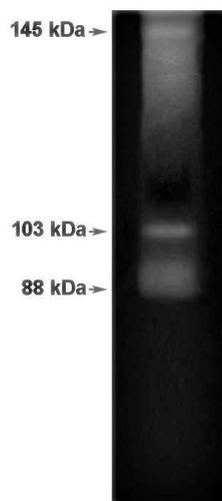


Figura 18. Zimograma em gel de poliacrilamida em malha de 10% copolimerizado com gelatina.

No entanto, os resultados não foram favoráveis para as celulasas e enzimas correlatas, não sendo possível visualização das bandas para determinação dos pesos moleculares destas enzimas. Sugerem-se novos testes futuros, com variação de tempo de incubação, concentração dos corantes e uma maior concentração da amostra. Provavelmente, também seja necessário utilizar malha com diâmetros maiores (menor concentração de acrilamida), reduzindo o tempo de separação das bandas ou até mesmo a utilização de outro método de separação.

Caso todos os pesos moleculares das celulasas, enzimas correlatas e protease presentes no extrato enzimático tivessem sido identificados, tentar-se-ia a utilização de uma estratégia muito interessante para separar a protease (enzima indesejável por hidrolisar proteínas e

consequentemente as outras enzimas) das demais enzimas do extrato, que consistiria na seleção de uma membrana que possibilitasse a remoção da protease durante o processo de concentração por ultrafiltração.

5.6.3. Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography*-TLC) é um dos instrumentos mais utilizados para o acompanhamento do desenvolvimento de reações químicas orgânicas e para o ensaio de pureza dos compostos orgânicos.

Utilizando esta técnica (item 4.15) foi possível acompanhar o desenvolvimento da hidrólise dos substratos específicos para as enzimas CMCase, β -glicosidase, xilanase e poligalacturonase.

Após a separação dos carboidratos e revelação das placas, foram comparadas amostras do substrato, branco de reação (amostra inativada com substrato) e da mistura após reação enzimática para avaliação da atuação das diferentes enzimas testadas.

Na avaliação da hidrólise de xilana (*oat spelt*), observou-se no material hidrolisado uma redução drástica da xilana presente e formação de um carboidrato de baixo peso molecular. Como xilana (*oat spelt*) consiste em 52% de xilose, 22% arabinose, 16% glicose e 10% galactose (LI, 2000), provavelmente o carboidrato formado foi xilose, confirmando a presença da enzima xilanase e demonstrando uma boa atuação sobre a hidrólise de xilana (Figura 19).

Na hidrólise de celobiose, comparando com a aplicação de substrato e com o branco, foi observado o desaparecimento da celobiose e aumento da concentração de glicose no material hidrolisado, confirmando a ação eficaz da enzima β -glicosidase (Figura 19).

Já para CMCase e poligalacturonase não foi possível verificar nenhuma mudança na composição dos carboidratos. Deve-se destacar que como as endoglucanases agem de forma aleatória nas regiões internas da molécula de celulose liberando celo-oligossacarídeos com diversos graus de polimerização, possivelmente, os produtos da hidrólise não foram devidamente identificados. Fato semelhante pode ter ocorrido também durante a cromatografia com poligalacturonase.

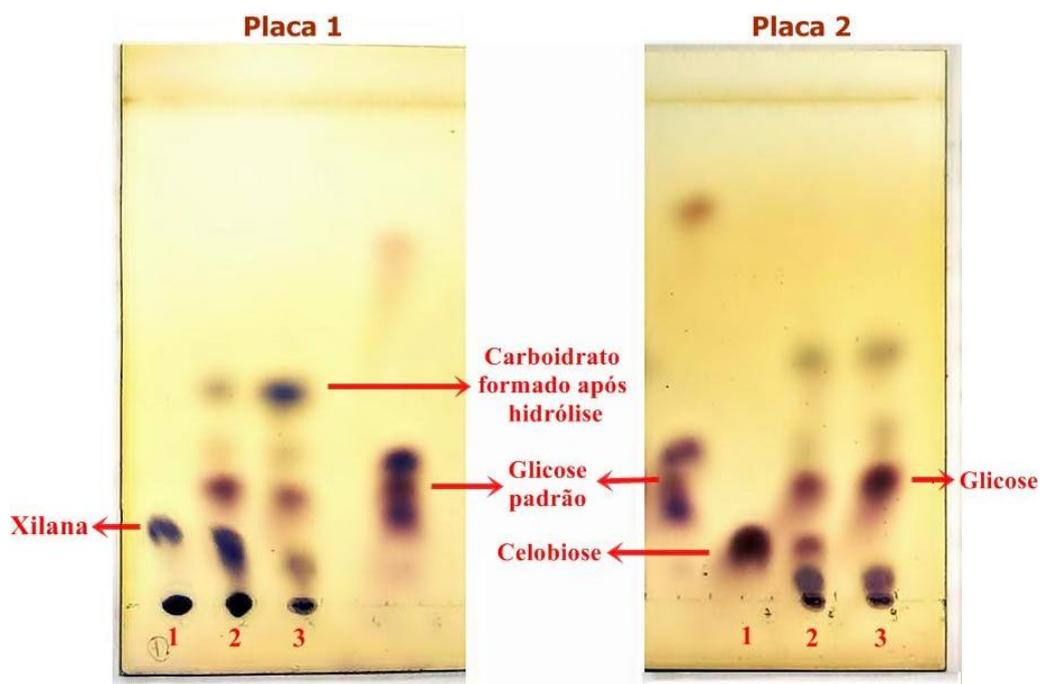


Figura 99. Avaliação da eficiência de hidrólise das enzimas xilanase e β -glicosidase sobre os substratos específicos de atuação. 1) substrato de reação, 2) branco de reação (amostra inativada + substrato, 3) mistura após a reação enzimática para avaliação da atuação das diferentes enzimas testadas.

6. CONCLUSÕES

- A produção do extrato enzimático por fermentação no estado sólido em colunas aeradas utilizando *Aspergillus niger* 3T5B8 foi adequada, sendo observada uma melhor produção das enzimas β -glicosidase, poligalacturanase e xilanase;
- Apesar de não ter ocorrido aumento da atividade FPase, a concentração do extrato enzimático utilizando o processo de ultrafiltração apresentou-se eficiente, proporcionando uma purificação parcial e recuperação das atividades enzimáticas em torno de 75% a 99% para todas as outras atividades avaliadas;
- Entre as 5 condições de saturação avaliadas nos processos de precipitação com sulfato de amônio, a condição de 80% de saturação foi a melhor condição utilizada, apresentando um maior aumento das atividades, e uma purificação parcial da amostra;
- A concentração pelo processo de liofilização apresentou um aumento considerável da atividade enzimática e um resultado excelente para xilanase, no entanto apresentou um baixo rendimento, considerando as baixas percentagens de recuperação das atividades e o aumento da concentração das impurezas, demonstrado pela redução da atividade específica;
- Dentre os processos de concentração avaliados, a ultrafiltração proporcionou melhor desempenho, apresentando uma boa concentração e recuperação das enzimas presentes na amostra, além de ter pré-purificado o extrato enzimático, embora a concentração de FPase não ter sido satisfatória;
- O extrato enzimático analisado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), apresentou 15 bandas visíveis de proteína, com pesos moleculares que variaram na faixa entre 13,3 e 104,6 kDa. Dentre as bandas detectadas, obteve-se 10 bandas fortemente coradas, sugerindo-se estarem relacionadas com as enzimas CMCase, β -glicosidase, poligalacturonase, xilanase e FPase;
- A caracterização do extrato enzimático pelo processo de zimografia identificou 3 bandas (88, 103, 145 kDa) para atividade proteolítica.
- A faixa de pH entre 3,7 e 5,5 e a de temperatura entre 60 a 65 °C foram consideradas ideais para a atividade conjunta de carboximetilcelulase e β -glicosidase produzidas por *A. niger* 3T5B8, em processos biotecnológicos.

7. SUGESTÕES

- Sugere-se a realização de novos testes de produção da enzima utilizando-se inibidores de atividade para protease;
- Para avaliar a aplicabilidade do extrato enzimático em aplicações biotecnológicas, sugere-se a realização de testes para avaliação da estabilidade das enzimas ao pH e à temperatura.
- Como tentativa de se obter melhores resultados na concentração e uma diminuição do tempo de processo, sugere-se a realização de novos testes de precipitação com sulfato de amônio, utilizando cromatografia em gel ou de troca iônica, ao invés de diálise para a dessalinização.
- Para o processo de ultrafiltração, sugere-se uma otimização das condições de operação, através de um planejamento experimental.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, jan./jun.2000.

AGUIAR, C.M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR. 2010.

ALBERTON, L.R. **Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por *Streptomyces viridosporus* T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária**. 2004. 132f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; ASSMANN, R.; FENDRICH, R. C.; RODRIGUÉZ-LEÓN, J. SOCCOL, C.R. Xylanase Production by *Streptomyces viridosporus* T7A in Submerged and Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Residues. **Brazilian archives of biology and technology**. Vol. 52, Special Number, p. 171-180, Nov. 2009.

ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A.; Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCAR, R. B. de; COELHO, R. R. R., **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. – Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-271, 2008.

AZEREDO, L. A. I.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; BENCHETRIT, L. C.; COELHO, R. R. R. Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 207-212, July 2001.

BAKER, R.W. **Membrane technology and applications**. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. 2ed. 538 p. 2004.

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

BHIRI, F.; CHAABOUNI, S.E.; LIMAM, F.; GHRIR, R.; MARZOUKI, N.; Purification and biochemical characterization of extracellular beta-glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.149, p. 169-182, 2008.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J.C.C. ; SOUZA, R.R.; JORDÃO, E.; TAMBOURGI, E.B., Continuous extraction of α - and β -amylases from Zea mays malt in a PEG 4000/ CaCl₂ ATPS. **Journal of Chromatography B**, v. 858, n. 1, p. 227-233, 2007.

BIAZUS, J. P. M.; SEVERO, J.B., Jr.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R.; TAMBOURGI, E.B., Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1786-1791, 2006.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA Jr., N., Enzimas na produção de etanol. In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCAR, R. B. de; COELHO, R. R. R., **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. – Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-271, 2008.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, p. 241-271. 2008.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Ed. Manole, São Paulo, 2003.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n°6, p.259-272, 2005. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/050V5N1P498_503_JAN2008.pdf>. Acesso em: 18 out 2011.

CARPENTER, J. F.; IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives. In: Rey, L., **Freezing-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products**, Louis Rey (ed.), 1999.

CASTRO, A.M. **Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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

CERVONE, F.; LORENZO, G.; DEGRA, L.; SALVI, G.; BERGAM, M. Purification and Characterization of a Polygalacturonase-Inhibiting Protein from *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, v.85, p. 631-637, 1987.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 23, p. 501-505, 1947.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, 1998.

COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application, **Biotechnology e genetic reviews**, v. 3, p. 39-109, 1985.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993, 199 p., Tese (Doutorado), UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Brazilian journal of microbiology**, v. 26, p. 314–317. 1995.

COURI, S.; TERZI, S.C.; FARIAS, A.X.; FRAGA, M.; PEIXOTO, V.C.; DAMASO, M.C.T. Production of Cellulases by Filamentous Fungi and Characterization of the Crude Enzyme. In: 5th INTERNATIONAL TECHNICAL SYMPOSIUM ON FOOD PROCESSING, MONITORING TECHNOLOGY IN BIOPROCESSES AND FOOD QUALITY MANAGEMENT, 2009, Potsdam, Alemanha. **Anais. GIGR-ATB**, v. 1, p. 1-4, 2009.

COUTINHO, C.M., MING, C.C., BASSO, R.C., RIBEIRO, A.P.B., GONÇALVES, L.A.G., VIOTTO, L.A. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**, v. 42, p. 536–550, 2009.

COUTO, S. R.; SANDROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, n. 3, p. 211 – 219, 2005.

CUIXIA DI, MING LI, FENG LONG, MUQUN BAI, YAJIE LIU, XIAOLIN ZHENG, SHIJIAN XU, YUN XIANG, ZHENGLONG SUN AND LIZHE AN, Molecular cloning, functional analysis and localization of a novel gene encoding polygalacturonase-inhibiting protein in *Chorispora bungeana*, **Planta**, v. 231, n 1, p.169-178, 2009.

D'ALMEIDA, M.H. **Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação do papel**, 2 vol. 2 ed. São Paulo, SENAI/IPT, 1988.

DILLON, A. Cellulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270, 2004.

DYKA, J S V; SAKKAB, M.; SAKKAB, K.; PLETSCHKEA, B. I., The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.372–378, 2009.

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.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCEI, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. DE M., Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 347–355, 2011.

FARIA, L.A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. del; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.28, n.1, p. 182-192, 2008.

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

GERHARTZ, W. (ed.) General production methods. In: **Enzymes in industry: production and applications**. Weinheim (Alemanha): VCH, Cap.3, p. 43-53. 1990.

GOMES, C.A.O. **Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8**, 1995. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 1995.

GOMES, J.; GOMES, I.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p. 701-707, 1992.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: Ed. e-papers, 180 p., 2006.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, n. 5, p. 425-430, 2002.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentation: an overview. **International Biodeterioration**, v. 23, p.78-79, 1987.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S., Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 48, p. 162-168, 2011.

JEFFRIES, T.W.. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**. Vol. 1, p.163-176, 1990.

KANFER, J.N.; HAKOMORI, S. **Sphingolipidoses; Glycosphingolipids; Metabolism**. New York: Plenum Press, 435 p., 1983.

KHANNA, S.; GAURI. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 990-995, 1993.

KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2002. Disponível em:

<http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais.pdf>. Acessado em 08 dez. 2010.

KOROTKOVA, O.G.; SEMENOVA, M.V.; MOROZOVA, V.V.; ZOROV, I.N.; SOKOLOVA, L.M.; BUBNOVA, T.M.; OKUNEV, O.N.; Sinitsyn, A.P.; Isolation and properties of fungal β -glucosidases, **Biochemistry** (Moscow), v.74, p. 569-577, 2009.

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*. **Bioresource Technology**. V. 100, p. 1350-1357, Fev. 2009.

KRSTIC, D.M.; ANTOV, M.G.; PERICIN, D.M.; HOFLINGER, W.; TEKIC, M.N. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 10–15, 2007.

LACKS, S.A.; SPRINGHORN, S.S. Renaturation of enzymes after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 255, p.7467-7473, 1980.

LADISCH, M. R. **Bioseparations Engineering**. New York: Wiley-Interscience, 753 p., 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685. 1970.

LECHNER, B.E.; PAPINUTTI, V.L., Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw, **Process biochemistry**, v. 41, p.594-598, 2006.

LIMA, M. R.; SILVA, V. P. A.; FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I.F.; DUTRA, R. A. F.; Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, ENERGIA E RICINOQUÍMICA, 2008, Salvador. **Anais**. Salvador, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/OLEO%20E%20CO-PRODUTOS/OCP%2007.pdf>>

LIU, J.; XIA, W., Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 82-87, 2006.

LOWRY, O H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A L., RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.

LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A. Precipitação. In: KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A. (Ed.) **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, p. 89-113, 2005.

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

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 77, p. 467-475. fev. 2002.

MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization, **Process Biochemistry**, v.40, p.1763–1771, 2005.

MASE, T.; MORI, S.; YOKOE, M. Purification, characterization, and a potential application of beta-glucosidase from *Aspergillus pulverulentus* YM-80, **Japanese Society of Applied Glycoscience**, v.51, p.211-216, 2004.

MATSUI, H.; BAN-TOKUDA, T. Studies on carboxymethyl cellulase and xylanase activities of anaerobic fungal isolate CR4 from the bovine rumen. **Current Microbiology**, v. 57, p.615-619, 2008.

MAZOTTO, A. M. ; MELO, A. C. de ; MACRAE, A. ; ROSADO, A. S. ; PEIXOTO, R. ; CEDROLA, S. M. L. ; COURI, S. ; ZINGALI, R. B. ; VILLA, A. L. ; RABINOVITCH, L. ; CHAVES, J. Q. ; VERMELHO, A. B., Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp., **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 2010.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428., 1959.

MULDER, M. Basic **Principles of Membrane Technology**. 2 Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 564 p. 1996.

MURGATROYD, K.; BUTLER, L. D.; KINNARNEY, K.; MONGER, P. **Good pharmaceutical freeze-drying practice**, Peter Cameron (ed.), 1997.

NADEEM, M. T. **Production, Purification And Characterization Of Carboxymethyl Cellulase For Food Applications**, 2009, 204 f., thesis (PhD), University of Agriculture, Faisalabad, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lenhinger: Principios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Savier. 1119p, 2004.

NETO, J.A. Purificação de enzimas. In: URGEL, A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, V.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**, v. 3, São Paulo: Ed. Blucher, 2007.

NOVO INDUSTRI S.A.(Dinamarca), **Celulasedetermination: Division Enzymes**, N. AF 149/5 GB,1978.

PARK, S.Y.; BAE, E.A.; SUNG, J.H.; LEE, S.K.; KIM, D.H. Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing beta-glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. v.65, p.1163-1169, 2001.

PARRY, N. J.; D. E. BEEVER, D. E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; BEEUMEN, J. V.; BHAT, M. K., Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,v. 404, p. 243–253, 2002.

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

PAULO, A.M.C. **Influência da Agitação Mecânica e da Composição Enzimática no Tratamento do Algodão com Celulases**. 1995. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Guimarães, Portugal. 1995.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.P.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, p. 332-348, 2005.

QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C. T., CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, 87, p. 143-159, 2001.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol.1, n.3, pp. 26-27. 1998.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 205-213, 2002.

ROBSON, L.M. & CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**. V.11, p. 626-644. 1989.

RODRIGUES, G.A. **Produção de β -1,3-glicanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 para lise enzimática da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* e obtenção de β -galactosidase**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

ROLDÁN, A.; PALACIOS, V.; PENATE, X.; BENITEZ, T.; PEREZ, L. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, N. 75, p. 375–382. 2006.

ROTTER, B.A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Informations**, v.11, p.15-17, 1990.

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

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.

SANT'ANNA Jr., G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Editora Edgard Blücher Ltda: São Paulo, Brasil, p. 351-362, 2001.

SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido**. Campinas, 2001, 152 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 2001.

SEIDLE, H.F.; MARTEN, I.; SHOSEYOV, O.; HUBER, R.E. Physical and kinetic properties of the family 3 beta-glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown, **Protein Journal**, v.23, p.11-23, 2004.

SEIDLE, H.F.; ALLISON, S.J.; GEORGE, E.; HUBER, R.E.; Trp-49 of the family 3 beta-glucosidase from *Aspergillus niger* is important for its transglucosidic activity: creation of novel beta-glucosidases with low transglucosidic efficiencies, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.455, p.110-118, 2006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SIGMA. **Catálogo Bioquímicos e Reagentes para Pesquisa em ciências da Vida**. Brasil. 2002.

SILVA, E. G.; BOERGES, M. de F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F., Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v.5, n.9, p.859-865, 2005.

SLIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação por fermentação em estado sólido**. 2007. Dissertação (Mestrado ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade estadual de ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2007.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**. v. 34, p. 421-424. 2009.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, p. 367-375, 1996.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood: Cellulase enzyme production**. 2000. 61 f. Tese (Doutorado. em Engenharia Química), Lund University, Suécia, 2000.

TATINI JUNIOR, V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.1, p.127-136. 2006.

THONGEKKAEW, J., IKEDA, H., MASAKI, K., IEFUJI, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 60, p. 140- 146, 2008.

TOLAN, J.S.; FODDY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 65, p. 41-67. 1999.

TOLEDO, A. L. et al. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1, p. 51-56, 2007.

VALENTE, S.S.; SANTIAGO, G.S., FERREIRA, W.M.; DIAS, J.C.C.A. Desempenho de coelhos em crescimento recebendo dietas com suplementação enzimática. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, vol.52, n.2, 2000.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v.203, p.1-60, 2000.

WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzimology of cellulose degradation. **Biodegradation**, v. 1, p. 147-161. Dordrecht, 1990.

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

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.

ZUÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; GONÇALVES, F. M. N.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulases em Fermentação Semi-Sólida do Bagaço de Cana-de-Açúcar por *Aspergillus niger* In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais**, Natal, RN, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO DE LOWRY)

Solução-mãe (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mg / L)
10	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90

ANEXO B

PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CURVA PADRÃO DE GLICOSE (DNS)

Tubos	Solução de Glicose (10μmol glicose/ml) (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μmol / mL)	DNS (mL)
0	0,0	1,0	0,0	1
1	0,1	0,9	1	1
2	0,2	0,8	2	1
3	0,3	0,7	3	1
4	0,4	0,6	4	1
5	0,5	0,5	5	1
6	0,6	0,4	6	1
7	0,7	0,3	7	1
8	0,8	0,2	8	1
9	0,9	0,1	9	1
10	1,0	0,0	10	1

ANEXO C

PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CURVA PADRÃO DE β -GLICOSIDASE

Tubo	Solução de Glicose (10μmol glicose/ml) (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μmol / mL)
1	0,1	0,9	1
2	0,2	0,8	2
3	0,3	0,7	3
4	0,4	0,6	4
5	0,5	0,5	5
6	0,6	0,4	6
7	0,7	0,3	7
8	0,8	0,2	8
9	0,9	0,1	9
10	1,0	0,0	10

ANEXO D

PREPARO DE TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO 0,05M

Solução (A) : Solução ácido cítrico 0,1M

Solução (B): Solução citrato de sódio 0,1M

Solução A (mL).	Solução B (mL).	pH
46,5	3,5	3,0
43,7	6,3	3,2
40,0	10,0	3,4
37,0	13,0	3,6
35,0	15,0	3,8
33,0	17,0	4,0
31,5	18,5	4,2
28,0	22,0	4,4
25,5	24,5	4,6
23,0	27,0	4,8
20,5	29,5	5,0
18,0	32,0	5,2
16,0	34,0	5,4
13,7	36,3	5,6
11,8	38,2	5,8
9,5	40,5	6,0
7,2	42,8	6,2

OBS: Todas as Soluções devem ser mantidas em geladeira.

ANEXO E

PREPARO DE TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,1M

Solução (A): Solução fosfato de sódio monobásico 0,2M

Solução (B): Solução fosfato de sódio dibásico 0,2M

Solução A (mL)	Solução B (mL)	pH
93,5	6,5	5,7
92,0	8,0	5,8
90,0	10,0	5,9
87,7	12,3	6,0
85,0	15,0	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2
23,0	77,0	7,3
19,0	81,0	7,4
16,0	84,0	7,5
13,0	87,0	7,6
10,5	90,5	7,7
8,5	91,5	7,8
7,0	93,0	7,9
5,3	94,7	8,0

OBS: Todas as soluções devem ser armazenadas em geladeira.

ANEXO F

REAGENTES UTILIZADOS

REAGENTES	FORNECEDORES
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	Reagen
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	Reagen
Cloreto de potássio (KCl)	Vetec
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Baker Chemical
Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄)	Grupo Química
Ágar-ágar	Isofar
Acetona	Isofar
Etanol	Vetec
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck
Goma arábica	Vetec
Biftalato de potássio (KOH)	Isofar
Azocaseína	Sigma
Hidróxido de potássio (KOH)	Reagen
Ácido tricloracético	Carlo Erba
Fosfato de sódio monobásico (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Fosfato de sódio dibásico (NaHPO ₄)	Merck
Citrato de sódio	Merck
Ácido cítrico	Grupo Química
Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	Vetec
Twen 80	Reagen
Ácido sulfúrico	Vetec
Ácido clorídrico	Isofar
Ácido acético	Merck
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Vetec
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	Reagen
Sulfato de manganês (MnSO ₄ H ₂ O)	Reagen
Carbonato de sódio	Isofar

ANEXO G

MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS DURANTE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM FÚNGICA E/OU FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

MATÉRIA-PRIMA	FORNECEDORES
Farelo de trigo	Bunge Alimentos S.A
Sabugo de milho	Comercial

ANEXO H

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DA LINHAGEM

COMPONENTES	FORNECEDORES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Nitrato de sódio (NaNO_3)	Reagen	3,00
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	Reagen	0,5
Cloreto de potássio (KCl)	Vetec	0,5
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Baker Chemical	0,01
Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4)	Grupo química	1,0
Agar-ágar	Isofar	30,0
Óleo de oliva	Faisão	20,0 (mL/L)

(COURI e FARIAS, 1995).

ANEXO I

EQUIPAMENTOS E SEUS RESPECTIVOS FABRICANTES

Equipamentos	Fabricantes	Modelo
Autoclave	Prismatec	–
Estufa para secagem	Ética	–
Estufa B.O.D.	Fanem	347CDG
Fluxo laminar	Nuaire	425-200
Titulador automático	Metrohm	794 basic titrino
Espectrofotômetro	Perkin Elmer	–
Centrífuga	Sorvall	–
Banho Maria com circulação	Marconi	–
Banho Maria com agitação	Precision ScientificCarl	–
Microscópio	Zeiss Jena	–
Balança analítica	Mettler	AT201
Placas de agitação	Nova Tecnica	–
Mix	Philips Walita	–
Potenciômetro	Analyser	pH300M
Capela	Scientech	–
Câmara de Neubauer	Boeco Germany	–
Bomba de engrenagem	Marathon eletric	Power Wash XT - Washdown
Liofilizadorde bancada	Liotop	Modelo <i>L101</i>