



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA
PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DA CASCA DE CAFÉ

THAÍS NARA FARIA

Orientador: Prof. Boutros Sarrouh

Ouro Branco

Dezembro/2014

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA
PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DA CASCA DE CAFÉ

THAÍS NARA FARIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientador: Prof. Boutros Sarrouh

Ouro Branco

Dezembro/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA
PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DA CASCA DE CAFÉ

THAÍS NARA FARIA

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Boutros Sarrouh – Orientador

José Carlos de Magalhães – Examinador 1

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Examinador 2

Ouro Branco, __/__/__

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Enzimas	2
2.1.1 O Mercado global de enzimas.....	2
2.1.2 Produção de enzimas fúngicas.....	4
2.1.3 <i>Aspergillus Niger</i>	7
2.1.4 <i>Cladosporium</i>	8
2.2 Celulases.....	10
2.1.5 Endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4, endocelulase)	11
2.1.6 Celobiohidrolases (EC 3.3.1.91, exocelulase)	11
2.1.7 β -glicosidase (EC 3.2.1.21)	12
2.3 Biodegradação de resíduos lignocelulósicos	12
2.2.1 A casca de café.....	18
2.2.2 Composição química do café	19
2.2.3 Composição dos resíduos lignocelulósicos.....	14
3. OBJETIVO GERAL.....	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Micro-organismos	21
5.2 Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa.....	21
5.3 Ensaio enzimático	21
5.3.1 Determinação da atividade de Endoglucanase.....	22
5.3.2 Determinação da atividade de β -D-glicosidase	22
5.4 Caracterização enzimática.....	23
5.4.1 Efeito do pH na atividade enzimática.....	23
5.4.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática	23

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6.1 Produção de Endoglucanase por fermentação submersa	23
6.2 Caracterização da atividade enzimática.....	25
6.2.1 <i>Efeito do pH na atividade enzimática da Endoglucanase e β-D-glicosidase.</i>	<i>25</i>
6.2.2 <i>Efeito da temperatura na atividade enzimática da Endoglucanase e β-glicosidase</i>	<i>28</i>
7. CONCLUSÕES	30
8. PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS	31
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
10. ANEXOS.....	37
ANEXO 1	37
ANEXO 2	38

RESUMO

Os processos enzimáticos têm conquistado, cada vez mais, aceitação na área industrial, uma vez que, eles exibem características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. As celulasas são um complexo de enzimas que atuam em sinergia para a hidrólise de substratos celulósicos, gerando açúcares fermentescíveis. Neste trabalho, foram quantificados e caracterizados as atividades enzimáticas de Endoglucanase e β -glicosidase obtidas a partir dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em diferentes condições de temperatura e pH. *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* apresentaram um pico máximo de crescimento após o nono e quinto dia de cultivo, respectivamente. A temperatura e pH ótimos encontrados na caracterização do extrato bruto produzido por *Aspergillus sp* referentes a Endoglucanase e β -glicosidase foram de 60°C e pH 5,0. A atividade celulolítica ótima do fungo *Cladosporium sp* foi observada a uma temperatura de 50°C e pH 6,0 no caso de Endoglucanase, e a 60°C e pH 4,0 para β -glicosidase.

Palavras chaves: Casca de Café, Celulasas; Endoglucanase, β -glicosidase, Fungos filamentosos, *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas de origem microbiana são utilizadas em inúmeros processos nas mais diversas áreas biotecnológicas. A utilização da diversidade e capacidade metabólica de micro-organismos, resultante de sua diversidade genética, coloca-se como um enorme potencial a ser explorado, ampliado pelo advento da engenharia genética.

As Endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4) e as β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolases; E.C. 3.2.1.21) formam uma classe de enzimas biologicamente importantes que ocorrem em inúmeros organismos, tanto procarióticos quanto eucarióticos, desempenhando diversas funções. Em condições fisiológicas, tais enzimas geralmente catalisam a hidrólise de ligações β glicosídicas.

As β -glicosidases microbianas têm recebido grande atenção devido à sua importância biotecnológica. Possíveis aplicações na liberação de compostos ricos em aroma em sucos e vinhos, liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de resíduos vegetais, síntese de oligossacarídeos e glicoconjugados, entre outras, vêm despertando crescente interesse.

Entre as possibilidades de aplicação das celulasas, a principal talvez seja sua utilização em processos de hidrólise enzimática de celulose. Neste sentido, a biomassa lignocelulósica surge como matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo para este processo de conversão, que tem por objetivo produzir de açúcares fermentáveis, visando à posterior produção de combustíveis, alimentos e compostos químicos. Existe um interesse mundial no potencial de comercialização do uso de celulasas em meios alimentícios e também na conversão química e biológica de materiais lignocelulolíticos.

Esta biomassa lignocelulósica, representada, por exemplo, pela casca de café, pode também ser utilizada como substrato para a produção de enzimas microbianas (celulasas, hemicelulasas, ligninases, entre outras) em larga escala, contribuindo para a diminuição do custo de produção destas enzimas e, por conseguinte, diminuindo os custos finais dos processos nos quais tais enzimas são empregadas.

A celulose é o carboidrato mais abundante atualmente, proveniente da biomassa terrestre e marítima, com uma taxa de síntese aproximadamente 4×10^{10} toneladas por ano, por isso tem atraído interesse de pesquisadores na sua utilização para o desenvolvimento de uma nova fonte renovável (BÉGUIN, 1990). Recentemente têm

aumentado as pesquisas voltadas para os mecanismos enzimáticos da celulose e os problemas envolvidos na conversão direta da biomassa em produtos úteis por meio de enzimas isoladas ou de micro-organismos lignocelulolíticos. Uma formulação artificial de lignocelulases capazes de trabalharem efetivamente, em concentrações baixas, é um objetivo ainda não alcançado (SCHWARZ, 2001).

Neste sentido, o presente trabalho caracterizou enzimas com atividade celulolítica, sendo elas Endoglucanase e β -glicosidase, produzidas por fungos isolados a partir da casca de café.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

2.1.1 O Mercado global de enzimas

Enzima é um produto muito bem estabelecido na área de biotecnologia em que as vendas foram de US\$ 1,3 bilhão em 2002, US\$ 5,1 bilhão em 2009 para 7 bilhão em 2013 (WALTON JD *et al.* 2010, SAHA BC 2004).

A demanda por enzimas industriais em economias amadurecidas, como os EUA, Europa Ocidental, Japão e Canadá foi relativamente estável durante os últimos tempos, enquanto que as regiões com economia em desenvolvimento como Oriente Médio, Ásia-Pacífico, Europa Oriental e África, emergiram como mercados que mais crescem para indústrias de enzimas. O aumento da procura de várias enzimas especiais, polimerases e nucleases, juntamente com o crescimento robusto nos mercados de alimentos para animais, são susceptíveis de orientar o crescimento no mercado de enzimas industriais. Estados Unidos e Europa comandam coletivamente uma parte importante do mercado mundial de enzimas industriais. Por outro lado, a Ásia-Pacífico está pronta para registrar a taxa anual de crescimento composta de mais de 8,0% durante o período analisado (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, Inc 2011).

Em relação ao mercado mundial de enzimas industriais, um relatório recente publicado pela BBC Research (BBC RESEARCH 2011) afirma que o mercado mundial

de enzimas industriais alcançou um valor de US\$ 3,3 bilhões em 2010. A expectativa é que este mercado atinja 4,4 bilhão de dólares em 2015, uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6% em relação ao período de previsão de 5 anos.

Enzimas técnicas foram avaliadas em mais de US\$ 1 bilhão em 2010. Esse setor irá crescer a uma taxa composta de crescimento anual de 6,6% (CAGR) para chegar a US\$ 1,5 bilhão em 2015. As maiores vendas de enzimas técnicas ocorrem no mercado de couro, seguido do mercado de bioetanol. Por outro lado, os segmentos de enzimas alimentares e de bebidas devem chegar a aproximadamente 1,3 bilhão de dólares até 2015, de um valor de 975.000 mil dólares em 2010, crescendo a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 5,1%. Dentro do segmento de enzimas alimentares e de bebidas, o mercado de leite e produtos lácteos teve as maiores vendas, com 401.800 mil dólares em 2009 (BBC RESEARCH 2011).

Os principais produtores de enzimas estão localizados na Europa, EUA e Japão. Dinamarca está dominando com empreendedores como Novozymes (45%) e Danisco (17%), seguida por Genencor (EUA), a DSM (Holanda) e BASF (Alemanha) (SAHA BC 2004, CHERRY JR *et al.* 2006). O ritmo de desenvolvimento em mercados emergentes sugere que as empresas da Índia e da China participem deste grupo restrito em um futuro muito próximo (SAHA BC 2004, PANDEY *et al.*, 2008).

Outro relatório de pesquisa publicado recentemente no mercado de enzimas (WALTON *et al.*, 2009) destacou o fato de que as proteases constituem o maior segmento do produto no mercado mundial de enzimas industriais e o mercado de carboidrases é projetada para ser o segmento de produtos que mais cresce, com uma taxa de mais de 7,0% em relação ao período de análise

Setores como a indústria farmacêutica e de bioetanol conseguiram chamar a atenção significativa dos investidores e são auto-suficientes na realização de novas atividades de desenvolvimento de produtos e no lançamento de produtos inovadores no mercado, oferecendo assim novas oportunidades para os fabricantes de enzimas industriais. No entanto, segmentos como produtos químicos de tratamento de águas residuais e de papel e celulose não têm recursos suficientes para a realização de novos desenvolvimentos de produtos (WALTON JD *et al.*, 2009).

De acordo com Pitman S. (2011), um relatório recente sobre o uso de enzimas na indústria de cosméticos aponta que para este segmento é estimado um crescimento de 5% a cada ano até 2015. Pesquisadores deste mercado destacam o fato de que as

demandas industriais para enzimas estão sendo impulsionadas pelas novas tecnologias e pelo aumento de uso de compostos orgânicos no lugar de ingredientes à base de petroquímicos.

2.1.2 Produção de enzimas fúngicas

Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, vegetais, grãos, animais, e usualmente crescem na superfície destes materiais ou seres (IWASHITA, 2002). Estes micro-organismos apresentam morfologia complexa, exibindo diferentes formas estruturais durante seus ciclos de vida. A estrutura vegetativa básica de crescimento consiste em um filamento tubular denominado hifa, originado da germinação de um esporo reprodutivo. Com o crescimento da hifa, esta se ramifica repetidamente, formando uma massa de hifas denominada micélio. Quando em cultivo submerso, estes fungos exibem diferentes formas morfológicas, variando de filamentos miceliais dispersos até massas miceliais densamente entrelaçadas (PAPAGIANNI, 2004).

A utilização microbiana da celulose é responsável por um dos maiores fluxos de matéria na biosfera (LYND *et al.*, 2002). Os fungos filamentosos exercem papel fundamental na degradação dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza (como a celulose) e são, portanto, essenciais para a manutenção do ciclo do carbono. A capacidade de fungos filamentosos em degradar eficientemente polímeros vegetais fornece tópicos interessantes para estudos relativos, por exemplo, à ecologia microbiana e aos mecanismos básicos de regulação nutricional, bem como estabelece diversas possibilidades de aplicações industriais (ARO *et al.*, 2005).

Além do papel significativo desempenhado pelos fungos filamentosos na reciclagem de compostos orgânicos, estes micro-organismos apresentam outras propriedades importantes, participando da produção de alimentos e produtos relacionados à saúde humana (HAJJAJ *et al.*, 2000). A utilização de fungos na produção de produtos comerciais é antiga, e a produção de bebidas alcoólicas, biomassa e a manufatura de compostos terapêuticos, juntamente com a produção de compostos orgânicos simples,

ainda continuam sendo os principais campos nos quais os fungos são utilizados (PAPAGIANNI, 2004).

Entretanto, vem crescendo o número de produtos comercialmente importantes produzidos por fungos. Diversos fungos filamentosos são utilizados como eficientes produtores de inúmeras enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e outros metabólitos comercialmente importantes. Estes micro-organismos têm sido amplamente explorados na produção de proteínas homólogas e, mais recentemente, proteínas heterólogas, devido à alta capacidade de seus mecanismos de secreção de proteínas (SUTO & TOMITA, 2001; IWASHITA, 2002; NG *et al.*, 2004; PAPAGIANNI, 2004).

Na produção industrial de enzimas, cultivos submersos são normalmente utilizados, devido à facilidade de manejo e controle do processo (IWASHITA, 2002). Contudo, o acúmulo de produtos finais inibe o crescimento celular e a formação do produto desejado na maioria destes processos (SRINIVASAN *et al.*, 2001).

Em relação à produção industrial de enzimas fúngicas, Fellows (1994) recomendou que fossem observados os seguintes requisitos: micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

As enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, por exemplo: casca de café, farelo de trigo, milho, casca de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha, como também podem ser obtidas por cultivo submerso com emprego de substratos líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, podem ser necessários também nutrientes específicos e determinados minerais para crescimento (FELLOWS, 1994).

A produção pelo cultivo submerso exige a preparação prévia de um inóculo que é obtido nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para produção da enzima. Após a fermentação, as enzimas extracelulares podem ser recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação destes métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que, neste caso, a recuperação da

enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer associada à célula.

As indústrias produtoras de enzimas comercializam enzimas específicas ou complexos multienzimáticos para serem adicionados a matérias primas ou para serem suplementadas nas dietas, buscando melhorar o valor nutritivo das rações de animais. (CARVALHO, 2006).

Os fungos de interesse biotecnológico são normalmente encontrados em seu hábitat natural como frutas, solos e materiais vegetais. Estes, e uma infinidade de outros substratos naturais, permitem o isolamento e seleção de linhagens fúngicas com grande potencial biotecnológico. Dessa forma, a bioprospecção de fungos filamentosos a partir da casca de café apresenta-se como uma perspectiva de grande importância, uma vez que as cepas isoladas poderão produzir enzimas com aplicação em diversos processos biotecnológicos voltados para a indústria alimentícia, química e de biocombustíveis.

Dentre as enzimas de interesse industrial produzidas por fungos filamentosos, estão as celulasas. As celulasas formam um complexo de enzimas que atuam em sinergia para a hidrólise de substratos celulósicos, gerando açúcares fermentescíveis, porém sua produção e aplicação são tecnologias em fase de desenvolvimento.

Os micro-organismos predominantemente encontrados nos grãos de café em coco pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Cladosporium*. Alguns trabalhos citam, ainda, a presença de fungos dos gêneros *Rhizopus* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* e *Mucor* (BEUX; SOCCOL, 2004; BOZZA *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2013; FERREIRA, 2010; SIMÕES, 2009).

Em trabalhos anteriores realizados por o grupo de pesquisa do Prof. Boutros, foi observado que fungos do gênero *Aspergillus* e *Cladosporium*, isolados a partir da casca de café, mostraram maior índice enzimático em relação às suas capacidades em hidrolisar a celulose (NATIVIDADE, 2014). Sendo assim, nesse trabalho será avaliada e caracterizada a atividade celulolítica (Endoglucanase e β -glicosidade) dos extratos enzimáticos brutos obtidos a partir desses fungos.

2.1.3 *Aspergillus* sp

Fungos do gênero *Aspergillus* constituem um grupo de fungos filamentosos hialinos de crescimento rápido comumente encontrados no solo. Apresentam colônias granulosas, em geral amarelas, verde-amareladas, castanho-amareladas ou verdes e uma banda periférica branca. Microscopicamente são caracterizados pela produção de hifas septadas hialinas e uniformes. Os conídios podem ser observados em um corpo de frutificação especializado que consiste de uma dilatação vesicular na extremidade do conidióforo (Figura 1). A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é feita observando-se o comprimento e a largura dos conidióforos, o tamanho e o contorno da vesícula, e a cor, tamanho e comprimento das cadeias de conídios (KONEMAN *et al.*, 2001).



Figura 1 – Representação de conidióforo de *Aspergillus* sp.(KONEMAN *et al.*, 2001).

Uma grande variedade de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são considerados como sendo degradantes primários da celulose, pois expressam atividades de endo e exoglucanases, em diferentes níveis de acordo com o método de fermentação e as diversas fontes de carbono empregadas (FLACHNER e RECZÉI, 2004; SCHEUFELE, 2012).

Em trabalho realizado por Flachner e Reczéli (2004) investigaram-se a atividade de β -glicosidases e celobiohidrolases por cepas de *Aspergillus phoenicus*, *A. niger*, *A.*

foetidus, *A. phoenicis* e *Trichoderma reesei*. A fonte de carbono utilizada no meio de cultivo foi polpa de papel pré-hidrolisada. Solução preparada com p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) em tampão citrato pH 4.8 foi utilizada como substrato no ensaio de avaliação enzimática. Os valores de atividade enzimática para β -glicosidase obtidos para as cepas de *Aspergillus* ficaram entre 3,3 e 3,4 IU/mL após nove dias de incubação, resultado mais de cinco vezes maior que o valor encontrado para *T. reesei*. No mesmo trabalho, foi verificado que estas cepas de *Aspergillus* não só apresentaram melhor produtividade de β -glicosidasas comparadas à cepa de *T. reesei*, como também exibiram melhor desempenho na hidrólise de celobiose. Segundo os mesmos autores, os resultados obtidos confirmaram a viabilidade do uso industrial dos sobrenadantes de fermentação não purificados das cepas de *Aspergillus* investigadas, para fins de suplementação enzimática e redução dos custos da hidrólise enzimática da celulose.

Santos *et al.* (2013) estudaram a aplicação do fungo *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir da fermentação em estado sólido de farelo de cacau. Em outro trabalho, Monteiro (2012) realizou teste qualitativo para a enzima celulase com 135 espécies pertencentes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de solos preservados do cerrado com base nas técnicas FPase (Papel filtro Whatman nº 1) e CMCase (Carboximetilcelulose) recomendadas por Ghose (1987). Segundo os resultados alcançados, a espécie que apresentou maior potencial de degradação da celulose foi *Aspergillus sulphureus* dentre todas as espécies isoladas e identificadas.

2.1.4 *Cladosporium sp*

As cepas de *Cladosporium* apresentam micélio bastante denso de superfície acamurçada, verde-escuras, cinzas, marrom-acinzentadas ou negro-amarronzadas, com pregas irregulares (KONEMAM *et al.*, 2001). Em preparações microscópicas se observam os conídios de *Cladosporium sp* com forma e tamanho variados, escuros, globosos, com ou sem septos, formando longas cadeias ramificadas (Figura 2) (MAPA, 2009).

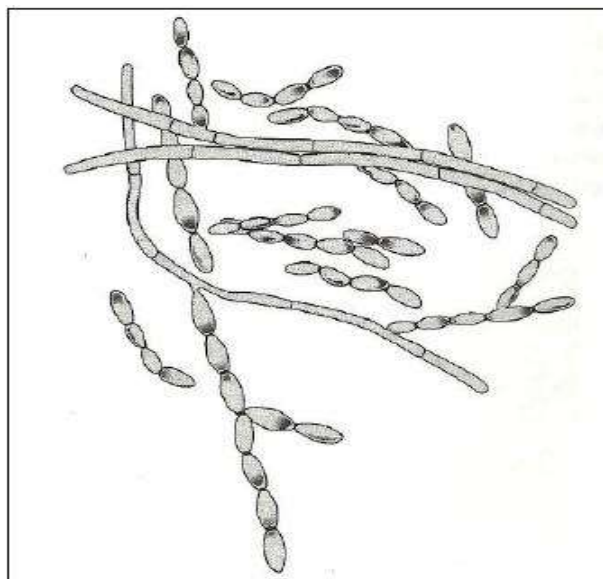


Figura 2 – Representação microscópica de *Cladosporium* sp. (KONEMAM *et al.*, 2001).

Segundo estudo realizado por Lynch *et al.* (1981), de todos os micro-organismos isolados da palha de trigo sendo eles fungos, leveduras e bactérias, apenas os fungos apresentaram atividade celulase, de forma que a mais expressiva foi em fungos *Cladosporium cladosporoide*. O crescimento dos micro-organismos foi testado em três meios minerais (A, B e C) com diferentes de fonte de carbono, como carboximetilcelulose (CMC), glicose, palha de celulose e sem nenhuma fonte. O meio A continha KH_2PO_4 1,0%, KCl 0,5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%, CaCl_2 0,1%, HCl 0,001%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, meio B com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% e o meio C foi o mesmo do isolamento, com a palha. O crescimento dos isolados em substratos de palha e CMC foi classificado em pobre e moderado nos três meios de cultivo. Em relação ao substrato glicose, obviamente foi de bom à abundante em todos os meios testados. A atividade enzimática das celulases presente no *Cladosporium cladosporoides* também foi quantificada no extrato celular e nas culturas filtradas com o substrato de CMC, apresentando a maior atividade no filtrado sendo este valor de $8,40 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que no extrato celular foi de $0,52 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$.

Outro estudo feito por Barbosa *et al.* (2001), que teve como objetivo investigar o antagonismo de espécies de *Trichoderma* contra *Cladosporium herbarum*, e estudar a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares pelo patógeno e os antagonistas,

mostraram que todos os isolados de *C. herbarum* foram capazes de produzir atividade celulolítica. Apresentando um halo de atividade enzimática de aproximadamente 2,0 mm.

Gautam *et al.* (2010) também avaliaram e analisaram a atividade celulolítica de 1,4-Endoglucanase presente em *Cladosporium sp* através da redução na viscosidade da solução de carboximetilcelulose (CMC), nas temperaturas de 30 a 80°C e pH entre 4,0 e 8,0. A maior redução da viscosidade ocorreu na temperatura de 50°C (redução de 42,29%) e pH 6 (45,78%).

2.2 Celulases

Celulase é o nome geral dado à enzima envolvida na degradação da celulose. Ela é produzida por diversos micro-organismos, em condições de aerobiose e anaerobiose e são extremamente importantes para obtenção de açúcares a partir da celulose como fonte de carbono. Seu emprego ocorre na indústria de alimentos, bebidas e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentáveis, utilizados para produção de biocombustíveis (FERREIRA, 2012).

As celulases de origem fúngica são produzida quando o micro-organismo é inoculado em meios de cultura que contenham celulose, agarose, lactose ou celobiose como fonte de carbono (FERREIRA, 2012).

As celulases são usualmente uma mistura de diversas enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três maiores grupos de celulases que participam do processo de hidrólise são: endoglucanases; exoglucanases ou celobiohidrolase e β -glicosidase (SUN e CHENG, 2002)

Endoglucanases podem hidrolisar ligações glicosídicas internamente em celulose, enquanto as celobiohidrolases agem preferencialmente nas extremidades da cadeia. Os produtos da reação enzimática são, na sua maioria, um dissacarídeo conhecido como celobiose e, em menor quantidade, celo-oligosacarídeos, que serão hidrolisados por um terceiro grupo de enzimas chamadas β -glicosídeses (KUMAR *et al.*, 2008). Geralmente, as endoglucanases e as celobiohidrolases trabalham em conjunto na hidrólise da celulose (RABINOVICH *et al.*, 2002).

2.1.5 *Endo-1,4-β-glucanases (EC 3.2.1.4, endocelulase)*

É a enzima responsável por iniciar a hidrólise, catalisando a hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose, liberando glicose, celobiose e celodextrinas. Tal enzima hidrolisa de forma aleatória as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, o que abre outros sítios para o ataque posterior das celobiohidrolases (PERCIVAL ZHANG *et al.*, 2009).

Endoglucanases (EGs) fúngicas são geralmente monômeros com nenhuma ou baixa glicosilação e possuem a extremidade de ligação ao substrato aberta. Elas têm pH ótimo entre 4,0 e 5,0 e temperatura ótima entre 50 e 70 ° C. Estudos têm mostrado que muitos fungos produzem EGs múltiplas, por exemplo, *T. reesei* produz pelo menos 5 EGS, enquanto três EGs foram isoladas do fungo de podridão branca *P. chrysosporium* (SANDGREN *et al.*, 2005).

2.1.6 *Celobiohidrolases (EC 3.3.1.91, exocelulase)*

Celobiohidrolases, muitas vezes chamadas exoglucanases, são os principais componentes do sistema de celulasas totais produzidas por fungos, compondo 40-70% destas, e podem hidrolisar eficientemente celulose cristalina (ESTERBAUER *et al.*, 1991). Celobiohidrolases (CBH) hidrolisam preferencialmente ligações β-1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia, produzindo celobiose, como produto principal.

Semelhantemente às EGs, CBHs são monômeros com pouca ou nenhuma glicosilação, com valores de pH ótimo entre 4,0 e 5,0, possuindo faixa de temperatura ótima mais larga, de 37 a 60 ° C (FERREIRA *et al.*, 2012)..

Estudos têm demonstrado que algumas CBHs podem agir a partir das extremidades não redutoras e outras nas extremidades redutoras das cadeias de celulose, o que aumenta a sinergia entre as enzimas que atuam em posições diferentes (FERREIRA, 2012).

2.1.7 β -glicosidase (EC 3.2.1.21)

As β -glicosidases (BGLs) hidrolisam celobiose e celodextrinas a glicose, e são assim competitivamente inibidas por glicose. BGLs são classificadas nas famílias 1 e 3 das glicosídeo hidrolases, com base em suas seqüências de aminoácidos. A família 3 inclui β -glicosidases de fungos, bactérias, e plantas, enquanto a família 1 inclui β -glicosidases de bactérias, plantas e mamíferos que possuem atividade de galactosidase, em adição a atividade de β -glicosidase. BGLs de ambas as famílias hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas utilizando o mecanismo de retenção descrito por Henrissat (1991).

BGLs apresentam grande variabilidade em relação a outras enzimas celulolíticas, devido à sua estrutura e localização. Enquanto algumas BGLs possuem estrutura monomérica simples com cerca de 35 kDa de massa molecular, algumas outras são diméricas ou mesmo triméricas com mais de 450 kDa (CAO *et al*, 1993). Além disso, a maioria das BGLs são glicosiladas.

Quanto à localização, BGLs podem ser agrupadas em três formas diferentes incluindo intracelular, associadas à parede e extracelular (EVANS, 1985). Valores de pH ótimo para esta enzima variam de acordo com sua localização, e a temperatura ótima varia de 45 a 75 °C.

BGLs vêm sendo estudadas quanto à possibilidade de liberar compostos fenólicos a partir de suas formas glicosiladas em resíduos do processamento de vegetais. Esses compostos ocorrem amplamente em frutas e outros vegetais, podendo ser utilizados como antioxidantes, nutracêuticos e agentes flavorizantes.

2.2 Biodegradação de resíduos lignocelulósicos

O processo de degradação de resíduos lignocelulósicos tem sido bastante estudado com vistas à sua utilização como fonte renovável de energia em substituição ao uso de combustíveis fósseis, para produção de combustíveis líquidos, principalmente

etanol. Além da redução dos problemas ambientais ligados ao acúmulo desta biomassa abundante e de baixo custo, há diversas possibilidades de uso, inclusive a geração de bioprodutos por meio de processos fermentativos. No entanto, a dificuldade da consolidação desses processos se deve justamente à complexidade da estrutura lignocelulósica que confere um alto custo às etapas de hidrólise, inviabilizando ainda economicamente tal utilização (SCHEUFELE, 2012).

O grupo de organismos capazes de degradar materiais lignocelulósicos é limitado, já que a celulose, a hemicelulose e a lignina estão intimamente associadas para a formação da parede celular, que é altamente coesa. A infiltração de moléculas de elevada massa molar é dificultada em função de sua baixa porosidade. Segundo Srebotnik (1988) e Flounoy *et al.*, (1993), proteínas não infiltram a parede celular lignificada.

O processo de hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo celulolítico, normalmente de fungos, formado por endoglucanases, exoglucanases e β -D-glicosidases; porém, esse processo apresenta alto custo e baixa produtividade (ZHANG *et al.*, 2006). Apesar disso, uma grande variedade de micro-organismos tem sido usada para cultivo em bagaço de cana, com o objetivo de produção de celulasas. Os fungos filamentosos, especialmente *Basidiomycetes*, são os mais utilizados para a produção dessas enzimas (PANDEY *et al.*, 2000).

A grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo no Brasil estimula a busca por micro-organismos mais eficientes no uso desse resíduo. Para a produção de etanol, a hidrólise química apresenta baixo rendimento, em razão da degradação parcial desses resíduos pelo uso de ácido e pela formação de compostos que, além de não serem fermentescíveis, podem inibir a atividade das leveduras. Ademais, o uso frequente de ácido causa corrosões nos equipamentos e aumenta os riscos de acidentes pelo seu manuseio (MENEZES, 1980). Dessa forma, a hidrólise enzimática tem sido a mais utilizada.

2.2.1 Composição dos resíduos lignocelulósicos

A lignocelulose é o componente estrutural predominante de todas as plantas e possui três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, que estão fortemente interligados e quimicamente ligados por forças não-covalentes e ligações covalentes (DASHTBAN *et al.*, 2009; SANCHEZ, 2009).

A composição química desses materiais está relacionada principalmente ao crescimento excessivo da planta, bem como a fertilidade do solo e as condições climática à que ela está sujeita (SOUZA & SANTOS, 2003).

A celulose é o composto orgânico mais comum na natureza, localizada principalmente na parede secundária das células vegetais, constitui entre 40 e 50% de quase todas as plantas (OGEDA e PETRI, 2010). É um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas através de ligações β -(1-4)-glicosídicas (Figura 3) com graus de polimerização entre 5.000 a 7.500 de unidades de D-glicoses, sendo para madeira em média 10.000 e para o algodão em média 15.000 unidades (CARVALHO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010).

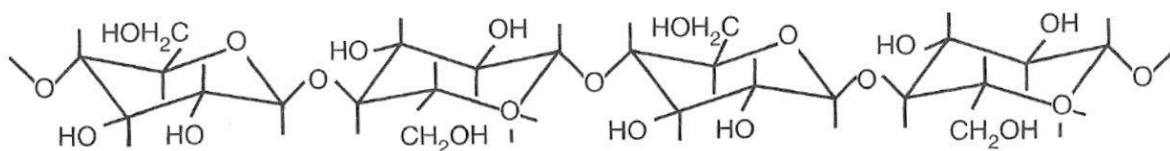


Figura 3 – Estrutura de um fragmento de celulose (LIMA *et al.*, 2001).

Estudos sobre a hidrólise enzimática da celulose levam em consideração a existência de duas formas distintas da molécula nativa: a cristalina e a amorfa (CARVALHO, 2011). A forma cristalina da celulose é resultante das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, a qual é atribuída sua alta resistência à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (SANTOS *et al.*, 2012). Os polímeros de glicose se encontram alinhados e ligados entre si formando uma fita altamente ordenada, essas fitas

por sua vez, se agregam e dão origem às microfibrilas celulósicas responsáveis pela caracterização da celulose cristalina como forte, estável e resistente à degradação. Portanto, a reatividade da celulose é determinada pela existência das interações físico-químicas existentes entre as macromoléculas e de grupos funcionais presentes na estrutura, que dificultam o acesso de reagentes e catalisadores. Sobretudo, nos materiais lignocelulósicos, a ação de catalisadores é dificultada ainda mais, devido à presença da hemicelulose e da lignina (Figura 4). Posto isso, torna-se necessário um tratamento prévio para a remoção da lignina e hemicelulose, a fim de facilitar o acesso dos catalisadores à celulose (SANTOS *et al.*, 2012).

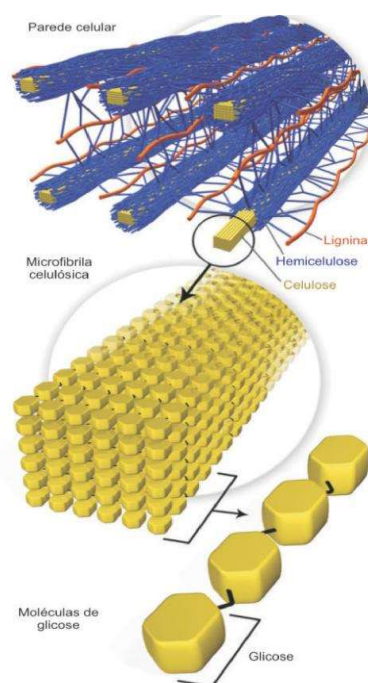


Figura 4 – Esquema da estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (Adaptada de SANTOS *et al.*, 2013).

A hemicelulose, ou poliose, é um polímero heterogêneo composto por hexoses (glicose, manose e galactose) e por pentoses (xilose e arabinose), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em algumas espécies de vegetais (CARVALHO, 2011; LIMA *et al.*, 2001). São altamente ramificadas, amorfas e com baixo grau de polimerização, entre 50 e 300 unidades monoméricas (ARANTES e MILAGRES, 2009). As hemiceluloses são depositadas na

parede celular vegetal em um estágio anterior à lignificação e quando comparadas à celulose apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, característica atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (CARVALHO, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no seu esqueleto. Assim, a xilana é uma hemicelulose constituída principalmente por unidades de β -D-xilose (Figura 5) unidas por ligações do tipo β -1,4. Porém, se o resíduo de açúcar principal for β -D-manose ou β -D-glicose, tem-se as hemiceluloses mananas e glucanas, respectivamente. As hemiceluloses em geral possuem um importante papel na estrutura e função da parede celular porque estão envolvidas no suporte e reticulação da matriz celulósica através de ligações de hidrogênio com a celulose, com outras hemiceluloses e também pectinas. A composição química e características estruturais das hemiceluloses variam amplamente entre as espécies, localizações sub-celulares e estágios de desenvolvimento (OGEDA e PETRI, 2010).

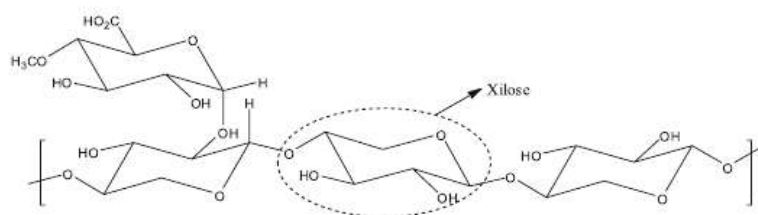


Figura 5 – Representação esquemática da xilana (SANTOS *et al.*, 2012).

A lignina é a substância química que confere rigidez à parede da célula, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. É a macromolécula mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos depois da celulose, e representa entre 20 e 30% da massa total desses materiais. Além da função de enrijecimento, age como material adesivo e como barreira contra degradação enzimática ou microbiana da parede celular vegetal (CARVALHO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010).

A lignina é um heteropolímero amorfo, composto basicamente de unidades de fenilpropano conectadas por ligações não hidrolisáveis, que formam uma molécula tridimensional altamente complexa (Figura 6), contendo entre 10 e 20% de subestruturas

fenólicas e entre 80 e 90% de não fenólicas (ARANTES e MILAGRES, 2009; LIMA *et al.*, 2001; SCHEUFELE, 2012). É insolúvel em água e em ácidos, porém pode ser solubilizada em soluções básicas concentradas ou solventes orgânicos (SCHEUFELE, 2012). O mecanismo de biossíntese da lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmicos (Figura 7): p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (CARVALHO, 2011). A proporção desses precursores varia entre diferentes espécies de plantas, e estas diferenças podem ser usadas com propósitos taxonômicos. Por exemplo, as ligninas de coníferas são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico, enquanto as ligninas das espécies folhosas contêm resíduos derivados tanto do álcool coniferílico quanto do sinapílico. Já espécies de gramíneas possuem ligninas derivadas dos três alcoóis precursores citados (MARTINS, 2005).

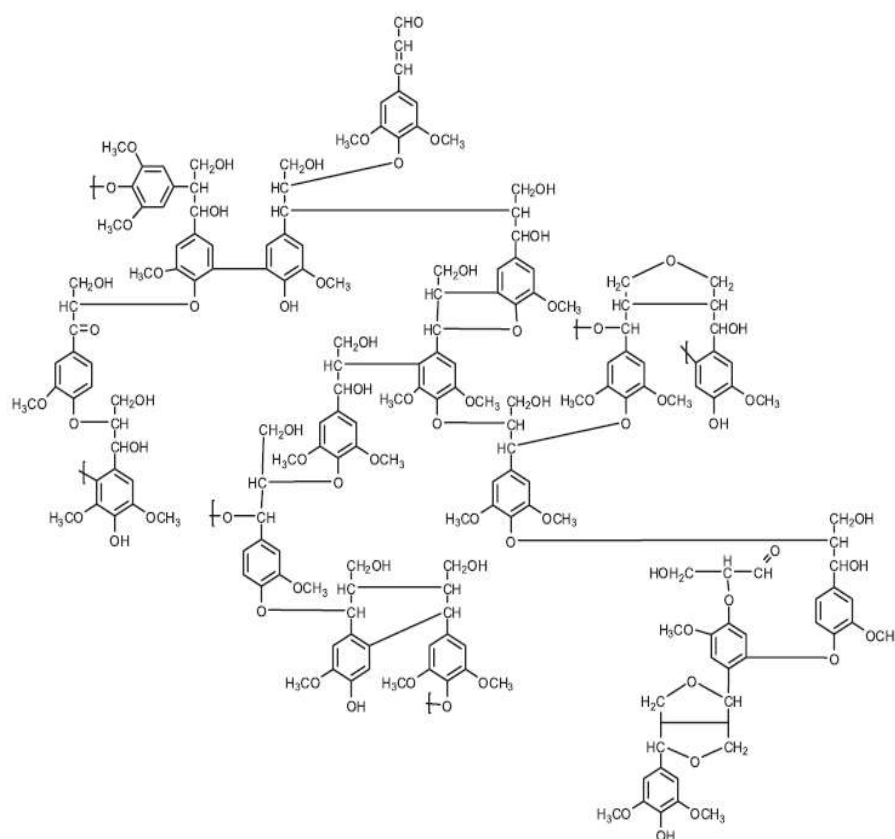


Figura 6 – Modelo de estrutura de lignina de eucalipto (SANTOS *et al.*, 2012).

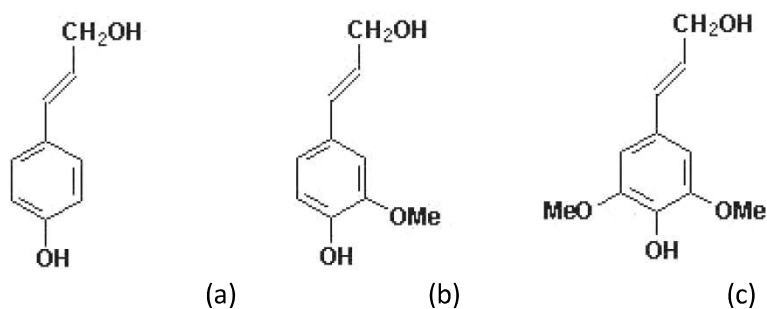


Figura 7 – Estrutura dos alcoóis precursores da lignina: álcool p-cumarílico (a), álcool coniferílico (b) e álcool sinapílico (c) (MARTINS, 2005).

A produção de enzimas celulolíticas microbianas é fortemente dependente da natureza do substrato, e a eficiência na produção destas enzimas depende também de outros fatores relacionados à composição química da matéria-prima, como a acessibilidade e suscetibilidade de vários componentes, bem como suas associações químicas ou físicas. Logo, é importante a escolha do substrato indutor apropriado para a produção destas enzimas. O substrato lignocelulósico ideal deve ser barato, facilmente processável, disponível em grandes quantidades, e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas – bem como para uma possível hidrólise comercial posterior (KANG *et al.*, 2004; JUHÁSZ *et al.*, 2005).

2.2.2 A casca de café

A casca de café, também conhecida como palha de café, é um resíduo fibroso, obtido durante o processamento dos grãos de café na via seca (PANDEY *et al.*, 2000).

Os usos alternativos para este resíduo incluem: a queima para geração de energia, suplementação de rações animais, cobertura de solo destinado ao plantio, entre outros (RATHINAVELU e GRAZIOSI, 2005). No entanto, com avanços na tecnologia bioenergética e biotecnológica, este resíduo pode ser fonte abundante e de baixo custo para a produção de bioprodutos de alto valor agregado, bem como geração de energia renovável.

2.2.3 Composição química da casca de café

A casca de café é uma matéria-prima lignocelulósica muito rica em diferentes biomoléculas, sendo os carboidratos constituintes mais de 50% do seu peso seco, seguidos pelas pectinas e proteínas, respectivamente (Tabela 1). Em resíduos vegetais, os carboidratos predominantes são a celulose e a hemicelulose.

Tabela 1 – Composição da casca e da polpa de café em porcentagem (%) de peso seco.

Componente	% peso seco
Carboidratos	57,8
Proteínas	9,2
Lipídeos	2,0
Cafeína	1,3
Taninos	4,5
Pectinas	12,4

Fonte: Soccol (2000).

A composição da casca de café pode variar com o processamento e sua eficiência, variedade do cultivar, e das condições de cultivo. Do ponto de vista bromatológico, Barcelos *et al.* (2001) analisaram três diferentes cultivares de café e encontraram os valores médios apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Composição bromatológica da casca de café e matéria seca.

Componentes	Casca (%)
Matéria Seca (MS)	88,37
Celulose	37,26
Hemicelulose	24,98
Proteína Bruta (PB)	9,92
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	77,19
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	52,20
Extrato Étereo (EE)	10,18
Matéria Mineral	8,52

Fonte: Adaptado de Barcelos *et al.* (2001).

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo caracterizar as enzimas com atividade celulolítica, sendo elas a Endoglucanase e β -glicosidase, produzidas por fungos isolados a partir da casca de café.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as atividades enzimáticas de Endoglucanase e β -glicosidase obtidas a partir dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*;
- Caracterizar as atividades enzimáticas de Endoglucanase e β -glicosidase em diferentes condições de temperatura e pH.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Micro-organismos

Neste estudo, colônias de *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* previamente isoladas da casca de café foram utilizadas. As culturas foram mantidas em placas contendo o meio BDA (Ágar Batata Dextrose). Periodicamente, a cada 30 dias, estas culturas eram inoculadas em novas placas, incubadas por sete dias a 28 °C e posteriormente armazenadas a 4 °C. O meio foi preparado adicionando-se 7,8g de BDA em 200mL de água destilada.

5.2 Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa

Para a inoculação em meio líquido, foram retirados com auxílio de uma espátula, três discos de cada placa de Petri contendo os fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*. Em seguida, foram inoculados em *erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido mineral e CMC (Carboximetilcelulose) 2% (p/v). O meio mineral foi composto de KH_2PO_4 0,7%, NaH_2PO_4 0,4%, MgSO_4 0,02%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% e extrato de levedura 0,06% (SINGH *et al*, 2009, modificado) o qual foi previamente autoclavado a 120 atm por 20 min.

Os frascos foram colocados em um agitador sob temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm. As amostras dos dois inóculos foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de, aproximadamente, 24h durante dez dias. As mesmas foram transferidas para um microtubo tipo *eppendorf*, e centrifugadas. O extrato enzimático obtido a partir do sobrenadante foi armazenado no refrigerador a 4°C.

5.3 Ensaio enzimáticos

As atividades das enzimas foram determinadas pela quantificação dos produtos de degradação de seus substratos sintéticos.

5.3.1 Determinação da atividade de Endoglucanase

A atividade de Endoglucanase foi determinada com base na capacidade de degradação de carboximetilcelulose (CMC), sendo que o açúcar redutor liberado foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), assim como descrito por Miller, G. L. (1959) e em ensaio adaptado por Ghose (1987).

Foi retirado 0,5 mL do extrato enzimático bruto dos dois fungos e colocados em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de carboximetilcelulose. Para o controle, colocou-se em substituição ao extrato enzimático, 0,5 mL do tampão acetato 0,1M pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se nos tubos 1,5 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que posteriormente foram direcionados novamente para banho fervente a 100°C por 5 minutos. Finalmente os tubos foram completados com 7,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, Bioespectro SP 22®, a 540 nm.

Para a construção da curva padrão, utilizou-se uma solução de glicose, com concentrações entre 0,1 a 1,0 g/L. Em um tubo de ensaio adicionou-se 1,5mL do reagente de DNS a 1 mL dessa solução, em seguida esse tubo foi levado a fervura por 5 minutos e completado com água destilada para um volume de 10 mL (GHOSE, 1987). A leitura foi realizada a 540 nm. A curva padrão se encontra no anexo 1.

Os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose a partir de curva padrão previamente construída (anexo 1); considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 μ mol de glicose liberada por minuto (BASSO *et al.*, 2010). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

5.3.2 Determinação da atividade de β -D-glicosidase

A avaliação da atividade β -glicolítica foi realizada utilizando o substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G).

Primeiramente, foram adicionados 2,0 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo nos tubos e aquecidos em banho-maria a 30°C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado 0,5mL dos extratos enzimáticos e para o controle 0,5mL de tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5,0. Todos os tubos foram colocados novamente em banho-maria a 30°C

por 30 minutos. A reação foi interrompida acrescentando 2,5 mL da solução de bicarbonato de sódio 0,5M. A leitura da absorbância foi realizada a 420 nm.

Uma unidade Internacional (IU) de atividade β -D-glicosidase é definida como quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol do substrato por minuto. Assim, para a quantificação, construiu-se a curva padrão utilizando água, bicarbonato de sódio e *p*-nitrofenol (20-160 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$). A curva padrão se encontra no anexo 2. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

5.4 Caracterização enzimática

5.4.1 Efeito do pH na atividade enzimática

A atividade da enzima foi estudada frente a diferentes valores de pH de 4,0 a 7,0. A variação no pH foi realizada utilizando-se os tampões acetato e fosfato-citrato para caracterização das enzimas Endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente.

5.4.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

As atividades das enzimas Endoglucanase e β -glicosidase foram avaliadas em temperaturas de 30 a 60°C. Os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente, alterando-se apenas a temperatura na qual o ensaio foi incubado, seguindo os protocolos referentes para cada enzima.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção de Endoglucanase por fermentação submersa

O método da fermentação submersa foi utilizado para os estudos cinéticos, tendo como parâmetros o crescimento celular e a quantidade de enzima produzida pelos micro-organismos.

Iniciou-se o experimento determinando a atividade de endoglucanases dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* presentes no meio de crescimento. No gráfico tempo em função a atividade enzimática, Figuras 8 e 9, observa-se uma rápida adaptação dos fungos no meio CMC utilizado.

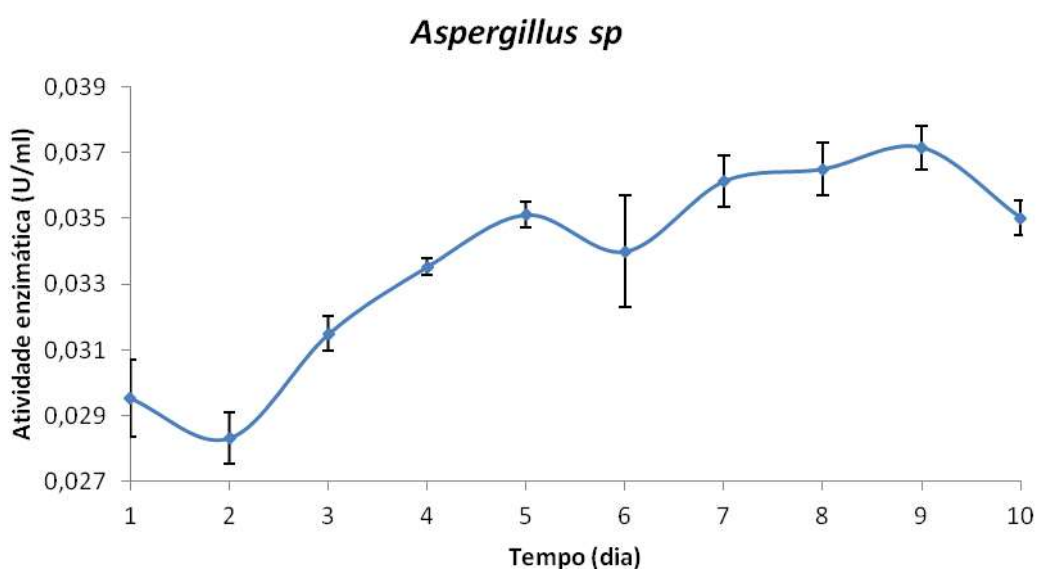


Figura 8 – Produção de Endoglucanase por *Aspergillus sp* em função do tempo de cultivo. Inóculo feito em meio líquido, contendo meio mineral e CMC 2% (p/v), autoclavado a 120 atm por 20 min.

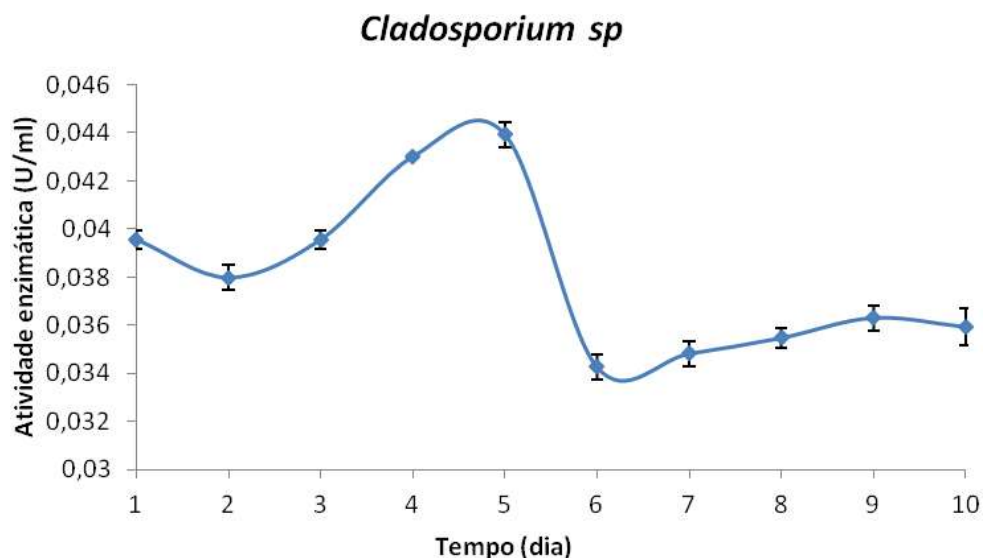


Figura 9 – Produção de Endoglucanase por *Cladosporium sp* em função do tempo de cultivo. Inóculo feito em meio líquido, contendo meio mineral e CMC 2% (p/v), autoclavado a 120 atm por 20 min.

Segundo as Figuras 8 e 9 observa que, a produção de Endoglucanases do fungo *Aspergillus sp* foi máxima após 9 dias de cultivo, sendo que a sua atividade enzimática foi de $0,037 \pm 0,00065$ U/mL. Por outro lado, a máxima atividade de Endoglucanases produzidas pelo *Cladosporium sp* foi alcançado após 5 dias do cultivo, apresentando um valor de $0,044 \pm 0,00052$ U/mL.

Aguiar & Menezes (2000), ao utilizar *Aspergillus niger* IZ-9 aos sete dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram valores de atividade de celulase total de $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$, valor próximo ao observado com o isolado deste trabalho.

6.2 Caracterização da atividade enzimática

6.2.1 Efeito do pH na atividade enzimática da Endoglucanase e β -D-glicosidase.

O pH apresenta papel importante nas reações de hidrólise catalisadas por enzimas. Sua variação pode ser relacionada a possíveis mudanças conformacionais,

alterações do estado de ionização e dissociação da enzima no meio reacional (macroambiente) levando à perda na função da enzima até se tornar inativa (SIMÕES *et al.*, 2011).

Os dados obtidos nos ensaios de caracterização da atividade das enzimas Endoglucanase e β -glicosidase sob diferentes valores de pH estão representados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Atividade enzimática da Endoglucanase obtida a partir dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em diferentes valores de pH.

Fungo	pH	Atividade Enzimática (U/mL)
<i>Aspergillus sp</i>	4	0,051 $\pm$ 0,001
	5	0,092 $\pm$ 0,005
	6	0,069 $\pm$ 0,003
	7	0,062 $\pm$ 0,002
<i>Cladosporium sp</i>	4	0,069 $\pm$ 0,008
	5	0,088 $\pm$ 0,0002
	6	0,105 $\pm$ 0,005
	7	0,088 $\pm$ 0,001

Tabela 4- Atividade enzimática da β -glicosidase obtida a partir dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em diferentes valores de pH.

Fungo	pH	Atividade Enzimática (U/mL)
<i>Aspergillus sp</i>	4	2,196 $\pm$ 0,274
	5	2,745 $\pm$ 0,061
	6	2,325 $\pm$ 0,065
	7	2,366 $\pm$ 0,008
<i>Cladosporium sp</i>	4	2,351 $\pm$ 0,021
	5	1,891 $\pm$ 0,061
	6	1,387 $\pm$ 0,283
	7	2,017 $\pm$ 0,004

Da mesma forma, as Figuras 10 e 11 apresentaram a influência do pH nas atividades enzimáticas da Endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente.

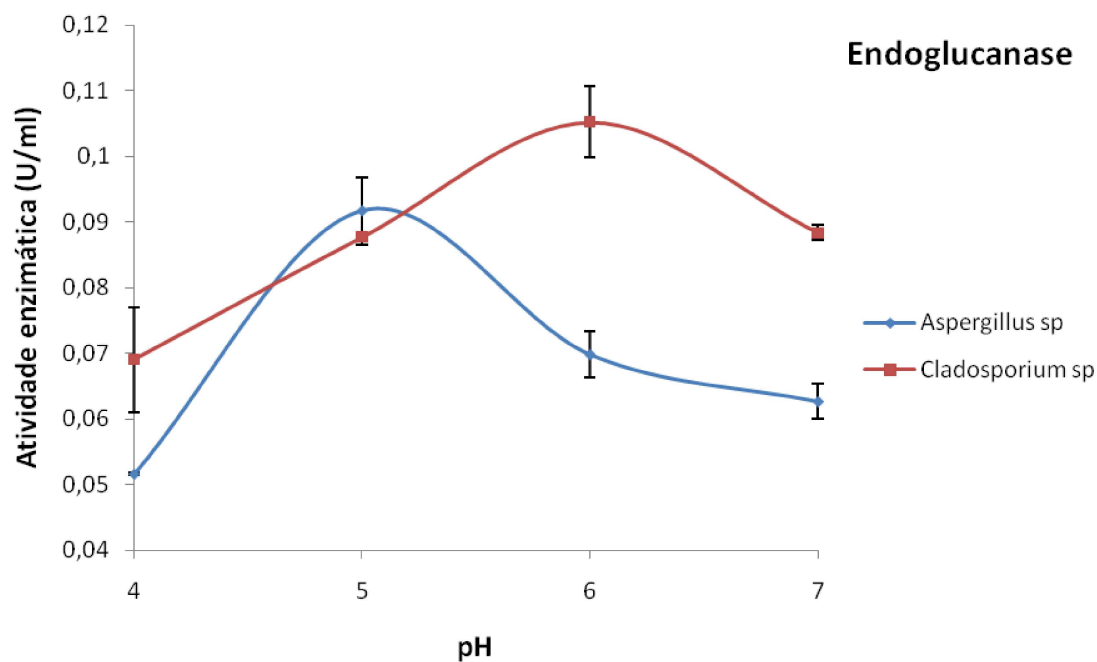


Figura 10 – Efeito do pH na atividade de Endoglucanase existentes nos extratos brutos obtidos dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*.

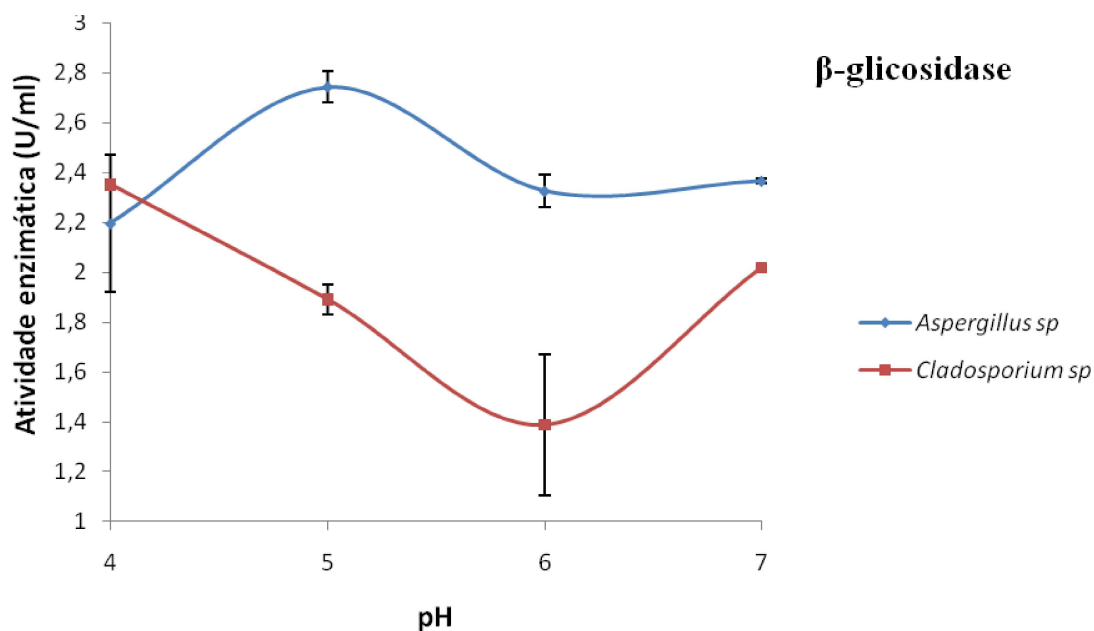


Figura 11 – Efeito do pH na atividade de β -glicosidase existentes nos extratos brutos obtidos dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*.

Os resultados mostrados na Tabela 3 e Figura 10 evidenciaram que a atividade de Endoglucanase do fungo *Aspergillus sp* apresentou atividade máxima de $0,092 \pm 0,0051$ U/mL em pH 5,0, entretanto a atividade máximo de Endoglucanase proveniente do fungo *Cladosporium sp* foi de $0,1052 \pm 0,0054$ U/mL em pH 6,0.

Conforme os resultados obtidos na Tabela 4 e Figura 11 observou-se que, a atividades enzimática máxima de β -glicosidase proveniente dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* foi de $2,74 \pm 0,061$ U/mL e $2,35 \pm 0,22$ U/mL em pH de 5,0 e 4,0 respectivamente.

6.2.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática da Endoglucanase e β -glicosidase

A influência da temperatura na cinética da reação enzimática se deve aos aumentos de velocidade de reação. A velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima (FEITOSA, 2009).

As Tabelas 5 e 6 apresentam as atividades enzimáticas de Endoglucanase e β -glicosidase para os fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* obtidas em diferentes valores de temperatura.

Tabela 5 – Atividade enzimática de Endoglucanase obtida dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em diferentes temperaturas.

Fungo	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U/mL)
<i>Aspergillus sp</i>	30	$0,085 \pm 0,0005$
	40	$0,097 \pm 0,0001$
	50	$0,091 \pm 0,0051$
	60	$0,105 \pm 0,0024$
<i>Cladosporium sp</i>	30	$0,048 \pm 0,0049$
	40	$0,077 \pm 0,0034$
	50	$0,087 \pm 0,0002$
	60	$0,083 \pm 0,0041$

Tabela 6 – Atividade enzimática de β -glicosidase obtida dos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em diferentes temperaturas.

Fungo	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U/mL)
<i>Aspergillus sp</i>	30	2,742 $\pm$ 0,061
	40	4,711 $\pm$ 0,139
	50	6,116 $\pm$ 0,248
	60	6,313 $\pm$ 0,222
<i>Cladosporium sp</i>	30	1,891 $\pm$ 0,061
	40	2,588 $\pm$ 0,087
	50	3,771 $\pm$ 0,091
	60	5,251 $\pm$ 0,004

Da mesma forma, as Figuras 12 e 13 mostram a influência da temperatura nas atividades enzimáticas da Endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente.

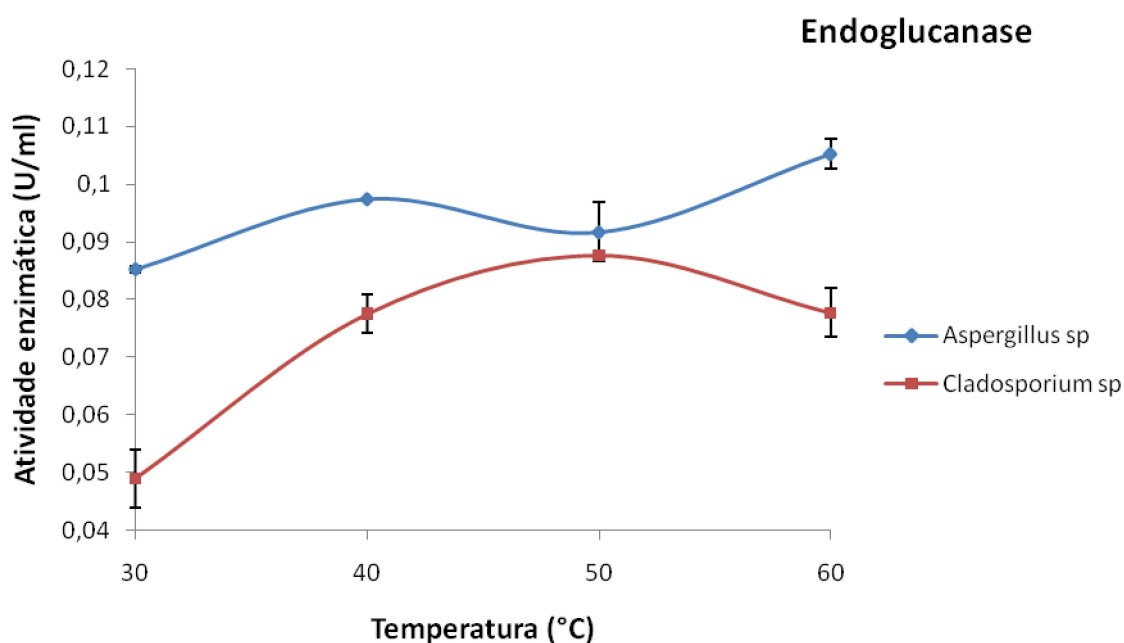


Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade de Endoglucanase presente nos extratos enzimáticos brutos de *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*

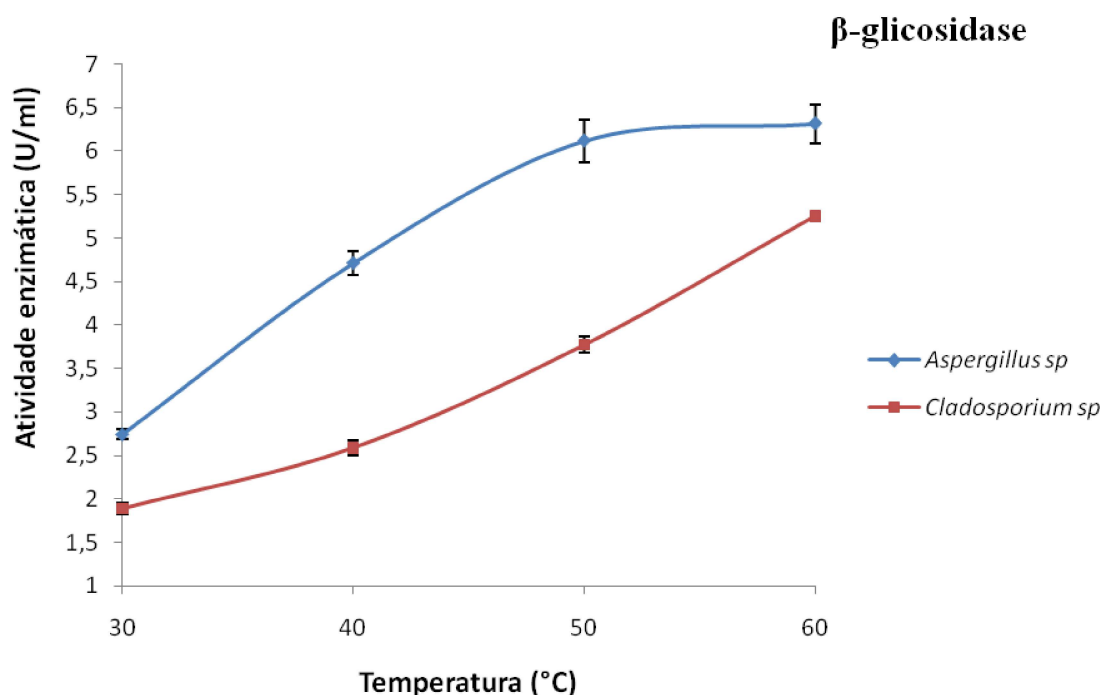


Figura 13 – Efeito da temperatura na atividade de β -glicosidase presente nos extratos enzimáticos brutos de *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*

Analisando a Tabela 5 e Figura 12, é possível perceber que as Endoglucanases presentes nos extratos enzimáticos de *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* apresentaram atividades máximas de $0,105 \pm 0,0025$ U/mL e $0,0087 \pm 0,00026$ U/mL nas temperaturas de 60°C e 50°C, respectivamente.

Em relação aos resultados mostrados na Tabela 6 e Figura 13, observou-se que, atividades máximas de β -glicosidase de $6,31 \pm 0,22$ U/mL e $5,25 \pm 0,0043$ U/mL foram alcançados a temperatura de 60°C para os fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp*, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

As Endoglucanases produzidas pelos fungos *Aspergillus sp* e *Cladosporium sp* em meio de fermentação submersa, atingiu um pico máximo da produção de enzima de $0,037 \pm 0,00065$ U/mL após 9 dias e $0,044 \pm 0,00052$ U/mL após 5 dias de cultivo submerso pelo método de CMC, respectivamente.

A temperatura e pH ótimos encontrados na caracterização do extrato bruto produzido por *Aspergillus sp* referentes a Endoglucanase e β -glicosidase foram de 60°C e pH 5,0. Da mesma forma, o extrato bruto produzido por *Cladosporium sp* apresentou uma atividade máxima a uma temperatura de 50°C e pH 6,0 no caso de Endoglucanase, e a 60°C e pH 4,0 para β -glicosidase.

8. PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS

- Caracterização das enzimas com atividade celulolítica previamente purificadas a partir de fungos filamentosos isolados da casca do café;
- Avaliação da atividade enzimática ótima da Endoglucanase e β -glicosidase utilizando casca de café como única fonte de carbono.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.18, p.57-70, 2000.

ARANTES, V. e MILAGRES, A.M.F. **Relevância de Compostos de Baixa Massa Molar Produzidos por Fungos e Envolvidos na Biodegradação da Madeira**. Quím. Nova, Vol. 32, n.6:1586-1595. 2009.

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

BARBOSA, G., M.A, REHN, G., K., MENEZES, M., MARIANO, R., L., R., **Antagonism of *Trichoderma* Species on *Cladosporium Herbarum* and their Enzymatic Characterization**. **Brazilian Journal of Microbiology** (2001) 32:98-104.

BARCELOS, A.F.; PAIVA, P.C.A.; PÉREZ, J.R.O.; SANTOS, V.B. e CARDOSO, R.M. **Fatores Antinutricionais da Casca e da Polpa Desidratada de Café (*Coffea arabica* L.) Armazenadas em Diferentes Períodos**. **Rev. Bras. de Zootec.**, Vol. 30, n. 4. Viçosa, 2001.

BASSO P.T., GALLO R.C., BASSO C.L., **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BBC Research (2011) In Report BIO030F - **Enzymes in Industrial Applications: Global Markets.**

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. **The biological degradation of cellulose.** FEMS **Microbiology Reviews**, Oxford, v. 13, p. 25-58, 1994.

BEUX, M.R. e SOCCOL, C.R. **microbiota isolada durante as fases de pré e pós-colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida.** B. CEPPA, Vol. 22, n.1:155-172. Curitiba, 2004.

BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S.M.; REYNAUD, D.T.; GABARDO, J.; VALASKI, J.C.; MARANGONI, P.R. e PIMENTEL, I.C. **Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita.** Ciênc. Tecnol. Aliment., 29(3): 529-534. Campinas, 2009.

CAO, W. G.; CRAWFORD, D. L. **Purification and some properties of beta-glucosidase from the ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius Strain Smf.** *Canadian Journal of Microbiology* , Florianópolis, v. 39, p. 125-129, 1993.

CARVALHO, J. C. C. **Complexos enzimáticos em rações fareladas para frangos de corte.** 2006, 64 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de monogástrico). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. *fungos filamentosos isolados a partir da casca do café.*

CARVALHO, L.M. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-açúcar.** UFSCAR, Dep. de Eng. Quím. São Carlos, 2011.

CUNHA, M.N.C.; NASCIMENTO, J.C.S.; SOUZA-MOTTA, M.C.; ALBERTINI, A.V.P.; LIMA, C.A.; MARQUES, Q.A.V. e PORTO, A.L.F. **Production of enzymes by filamentous fungus using sugarcane and sugarcane bagasse as substrate.** Rev. Bras. Bioci., Vol. 11, n.2:227-234. Porto Alegre, 2013.

DASHTBAN, M.;SCHRAFT, V.; QIN, W. **Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities & Perspectives.** *International Journal of Biological Sciences*, v. 5, p. 578-595, 2009.

ESTERBAUER, H. et al. **Production of Thrichodermacellulase in laboratory and pilot scale.** *BioresourTechnol*, v. 36, p. 51-65, 1991.

EVANS, C.S. **Properties of the beta-D-glucosidase (cellobiase) from the woodrotting fungus, *Coriolus versicolor***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 128-131, 1985.

FEITOSA, I.C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. Dissertação (Mestrado em Engenharias de Processos) – Universidade Tiradentes, 2009.

FELLOWS, P. **Tecnologia del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p.172-177.

FERREIRA, G. F. P. **Avaliação da qualidade física, química, sensorial e da composição fúngica de grãos de cafés beneficiados**. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2010.

FERREIRA, G. P. **Estudo comparativo, purificação parcial e caracterização de endoglucanases produzidas por *Aspergillus niger* cultivado em palha de sorgo triturada acrescida de meio mineral convencional e de permeado de soro de queijo**. Trabalho apresentado à Universidade Federal de Viçosa. 2012. P.4.

FLACHNER, B. e RÉCZEY, K. **β -Glucosidase Production and Characterization of Some *Aspergillus* strains**. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 18 (3): 303–307. 2004.

FLOUNOY, D. S.; PAUL, J. A.; KIRK, T. K.; HIGHLEY, T. K. Changes in the Size and Volume of Pores in Sweetgum Wood During Simultaneous Rot by *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Holzforschung*. v. 47, p. 297-301, 1993.

GAUTAM S.P., BUNDELA P.S, PANDEY A.K., AWASTHI M.K., SARSAIYA S. **Microbial Consortium for Effective Composting of Municipal Solid Waste by Enzymatic Activities**. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*. Volume 5, Number 3: 301-308, July-September, 2010.

GHOSE, T.K. **Measurement of Cellulase Activities**. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 59, p. 257-268. Oxford, 1987.

Global Industry Analysts, Inc (2011) In: **Report - Global Strategic Business**.

HAJJAJ, H. et al. **Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation**. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 27, p. 619-625, 2000.

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

IWASHITA, K. **Recent studies of protein secretion by filamentous fungi**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 94, p. 530-535, 2002.

LYNCH J. M., J. H. SLATER, JACQUELINE A. BENNETT, S. H. T. HARPER. **Cellulase Activities of Some Aerobic Micro-organisms Isolated from Soil.** *Journal of General Microbiology* (1981), 127,23 1-236.

JUHÁSZ, T. et al. **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochemistry*, Oxford, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KANG, S. W. et al. **Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, Oxford, v. 91, p. 153-156, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. e WINN, J.W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido.** 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

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

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. e SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos.** 1ª Ed. São Paulo: Blucher, 2001.

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

MARTINS, L.F. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Univ. Fed. Do Paraná. Prog. Pós-Grad. em Quím. Curitiba, 2005.

MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes.** Brasília, 2009.

MENEZES, T.J.B. de. **Etanol, o combustível do Brasil.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 233p.

MONTEIRO, M.C.P. **Identificação de Fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em Solos Preservados do Cerrado.** UFLA, Prog. Pós-Grad. Microbiol. Agric. Lavras, 2012.

NATIVIDADE, F. P. **Isolamento de fungos com atividades enzimáticas de interesse biotecnológico a partir da casca de café.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em cumprimento às exigências do Curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei. 2014. P.55.

- NG, T.B. **Peptides and proteins from fungi**. Peptides, New York, v. 25, p. 1055-1073, 2004.
- OGEDA, T.L. e PETRI, D.F.S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Quím. Nova, Vol. 33, n.7:1549-1558. 2010.
- PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes**. Biotechnology Advances, Oxford, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. e ROUSSOS, S. **Biotechnological Potential of Coffee Pulp and Coffee Husk for Bioprocesses**. Biochem. Eng. J., 6:153–162. 2000.
- PERCIVAL ZHANG, Y.H.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. **Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies**. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481, 2009.
- PITMAN S (2011) **Growth in enzyme market driven by cosmetic demand**. Online news, Cosmetics design.
- RABINOVICH, M.L.; MELNIK, M.S.; BOLOBOVA, A.V. **The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes**. *Biochemistry-Moscow*, v. 68, p. 850-871, 2002.
- RATHINAVELU, R. e GRAZIOSI, G. **Uso Alternativo Potencial de Detritos e Subprodutos do Café**. ICS-UNIDO, Org. Intern. do Café. Trieste, 2005.
- SAHA BC (2004) **Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology**. American Chemical Society 889: 2-34.
- SANCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi**. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 89, p. 246-291, 2005.
- SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. e REZENDE, S.T. **Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol**. Quím. Nova, Vol. 35, n.5:1004-1010. 2012.
- SANTOS, T.C.; ROCHA, T.J.O.; OLIVEIRA, A.C.; ABREU FILHO, G. e FRANCO, M. **Aspergillus niger como Produtor de Enzimas Celulolíticas a partir de Farelo de Cacau (Theobroma Cacao)**. *Arq. Inst. Biol.*, Vol. 80, n.1, p.65-71. São Paulo, 2013.

SCHEUFELE, F.B. **Bioconversão De Resíduos Agroindustriais Por Micro-Organismos Do Bioma Amazônico Produtores De Enzimas Lignocelulolíticas**. Univ. Est. do Oeste do Paraná, Cent. de Eng. e Ciênc. Ext. Toledo, 2012

SCHWARZ, W. **The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 634-649, 2001.

SIMÕES, R. O. **Qualidade de café (*coffea arabica* L.) pré-processado por via seca**. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SIMÕES, A.S.; MORI, R.Y.; FARIA, R.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. **Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa***. *Química Nova*, v. 34, n. 1, p. 33-38, 2011.

SOCOL, C.R. **Resíduo de Café um Substrato Promissor para a Produção Industrial de Bioprodutos com Alto Valor Agregado**. I Simp. de Pesq. dos Cafês do Brasil. Poços de Caldas, 2000.

SOUZA, O; SANTOS I.E. **Importância de resíduos agropecuários na alimentação animal**. Aracaju, SE, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review**. *Bioresource Technology*, Essex, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUTO, M.; TOMITA, F. **Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 92, p. 305-311, 2001.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.; FOISNER, R.; PETTERSSON, B. **Ultrastructural localization of ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* by immunogold labeling**. *Current Microbiology*, v. 16, p.221-227, 1988.

SRINIVASAN, K. et al. **Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 91, p. 153-158, 2001.

WALTON JD, BANERJEE G, SCOTT-CRAIG JS (2010), Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *Bioenerg Res* 3: 82–92.

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

10. ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 7- Curva padrão de DNS

Glicose (g/L)	Abs (540nm)
1	1,253
0,8	0,941
0,5	0,483
0,4	0,316
0,3	0,172
0,2	0,076
0,1	0,02

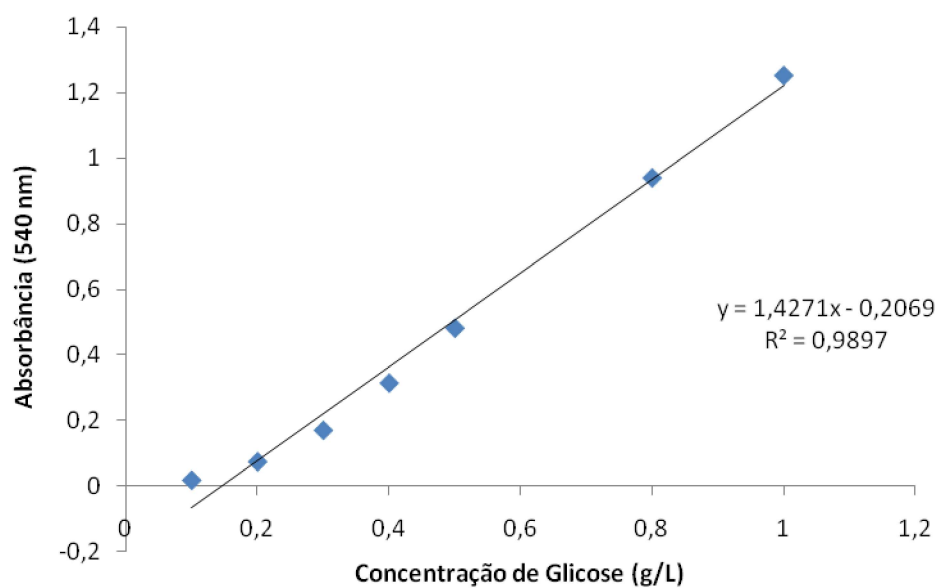


Figura 14 – Curva padrão da Glicose em função da absorbância.

ANEXO 2

Tabela 8 - Curva padrão de *p*-nitrofenol

<i>p</i> -nitrofenol ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	Abs (420 nm)
20	0,088
40	0,197
60	0,269
80	0,417
100	0,523
120	0,609
140	0,734
160	0,835

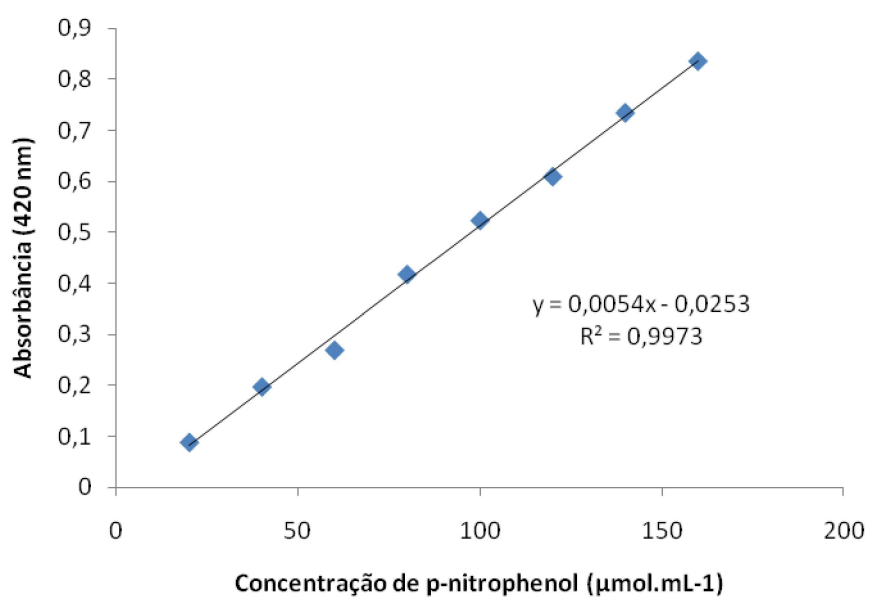


Figura 15 – Curva padrão de *p*-nitrophenol em função da absorbância.