

**Mariana Tonelotto**

**PRODUÇÃO DE CELULASES, PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-CINÉTICA DA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR FUNGO  
ISOLADO DA REGIÃO AMAZÔNICA**

**Defesa da dissertação apresentada à Universidade Federal de  
São Carlos, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

**Orientadores: Dra. Cristiane Sanchez Farinas**

**Prof. Dr. Igor Polikarpov**

**SÃO CARLOS, SÃO PAULO – BRASIL**

**2012**

**Mariana Tonelotto**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

T664pc

Tonelotto, Mariana.

Produção de celulasas, purificação e caracterização bioquímico-cinética da  $\beta$ -galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica / Mariana Tonelotto. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
175 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Enzimas. 2. Bioetanol. 3. Fungos filamentosos. 4. Celulase. 5. Região amazônica. 6. Bioquímica. I. Título.

CDD: 574.1925 (20<sup>a</sup>)

**Mariana Tonelotto**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 27/06/2012**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Cristiane Sanchez Farinas (Orientadora)  
(Embrapa – Instrumentação)



---

Prof. Dr. André Rodrigues  
(UNESP)



---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Rosineide Gomes da Silva Cruz  
(UFSCar)

***Dedico este trabalho***

***A Deus,***

***Aos meus pais, Nildete e José Carlos***

***Ao meu irmão autista, Thiago***

***Ao amor da minha vida, Douglas.***

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.*

*Muito, nos aproxima “ (Louis Pasteur)*

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus**, por ter me proporcionado saúde, sustento, oportunidade e capacidade durante todo o tempo para desenvolver esse trabalho.

**À minha família**, aos meus pais Nildete e José Carlos e ao meu irmão, Thiago pelo carinho, apoio e paciência nos momentos em que estive ausente.

**Ao meu namorado**, Douglas, pelo amor, pelo apoio, pelo companheirismo, pela paciência e principalmente pela vontade de sempre querer estar ao meu lado, sempre me ajudando e valorizando-me. Amo dividir todos momentos da minha vida ao seu lado.

**À Universidade Federal de São Carlos**, através do Programa de Biotecnologia, por ter me dado a oportunidade de realização do mestrado.

**Ao CNPq e a Capes**, pelo suporte financeiro à pesquisa.

**À amiga Rosângela Donizete Perpétua Buzon Pirola**, pelos ensinamentos com os métodos enzimáticos, pela paciência e carinho que sempre estiveram presentes, especialmente pela amizade que construímos, o que nos deu força para suportamos os momentos difíceis deste projeto.

**Aos orientadores: Dra. Cristiane Sanchez Farinas**, pesquisadora da Embrapa Instrumentação, por ceder os fungos amazônicos e pelas dicas para elaborar essa dissertação **e Prof. Dr. Igor**

**Polikarpov**, do Instituto de Física de São Carlos, por abrir a porta do seu laboratório e utilizar seus equipamentos.

**Ao pesquisador e amigo Dr. Alexander Golubev**, pelos ensinamentos com purificação e cristalização da  $\beta$ -Galactosidase, pela paciência, pela ajuda nos experimentos mais difíceis, pela compreensão e principalmente por despertar em mim a vontade e o amor pela pesquisa.

**Aos colegas de laboratório** da Embrapa: Úrsula, Camila, Fernanda, Andrea, Gabriela e o Cleiton e as técnicas: Silviane e Joana, pela ajuda necessária para a execução deste projeto.

**Aos meus colegas** do Instituto de Física da USP: Ana Carolina, Maria Luíza, Renata, Franciele, Caio, Bruno, Cesár, Vanessa, Evandro, André, Atílio, Lis, Flávio e a Heline e aos técnicos: Livia, Maria, Elizandra, Sandra e o Kelvin, pela ajuda necessária para a execução deste projeto.

**Ao serviço de Biblioteca do IFSC**, da USP pela ajuda com os artigos e por me ensinarem com toda a paciência e carinho na elaboração desta dissertação.

**Às amigas e professoras de inglês Paula e Vanessa**, pelo carinho, pelo apoio e por ensinarem muito mais que o idioma inglês, sempre valorizando a amizade e estando sempre prontas para ajudar e ouvir sobre as minhas dificuldades.

## Às igrejas Batistas Esperança em Tatuapé e Boas

**NOVAS**, em especial aos pastores Alceu e Fernando e também as suas esposas pela amizade e pelo apoio espiritual.

## À Escola Livre de Música Maestro João Sepe, sendo

uma terapia para o estress que passei com o mestrado, em especial ao vereador Robertinho Mori, ao professor Renan Bertho e ao maestro Rodrigo Murer Tinta por despertarem em mim o amor a música, podendo desenvolver meu talento como flautista na orquestra da escola.



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Desafios biotecnológicos aliados à diversidade microbiana.</b> ..	<b>22</b>
<b>3.2. Microrganismos produtores de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3. Bioma Amazônico</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4. Enzimas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.1. Caracterização enzimática das celulasas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.2. Mecanismo de ação das enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.3. Biomassa vegetal</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4.4. Resíduos de Biomassa Vegetal</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5. Fermentação em Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm) na produção de enzimas microbianas</b> .....	<b>45</b>
<b>3.6. As hidrolases de carboidratos ou glicosidases</b> .....	<b>49</b>
<b>3.7. <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	<b>52</b>
<b>3.7.1. Microrganismos produtores de <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>52</b>
<b>3.7.2. Caracterização da <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>55</b>
<b>3.8. Técnicas de Purificação de proteínas</b> .....	<b>57</b>
<b>3.8.1. Purificação da <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>60</b>
<b>3.9. Aplicações da enzima <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	<b>62</b>
<b>3.10. Cristalização</b> .....	<b>67</b>
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1. Materiais</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1.1. Fungos Filamentosos</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1.2. Manutenção da linhagens fúngicas</b> .....	<b>71</b>
<b>4.2. Resumo das Etapas desse trabalho</b> .....	<b>71</b>
<b>4.3. Fermentação</b> .....	<b>72</b>
<b>4.3.1. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)</b> 72	

<b>4.4. Fermentação Submersa (FSm)</b> .....	<b>73</b>
<b>4.5. Análises Enzimáticas</b> .....	<b>74</b>
<b>4.5.1. Atividade Endoglucanase</b> .....	74
<b>4.5.2. Atividade FPase</b> .....	75
<b>4.5.3. Atividade Xilanase</b> .....	75
<b>4.5.4. Atividade <math>\beta</math>-glicosidase</b> .....	75
<b>4.5.5. Atividade de pectinase</b> .....	76
<b>4.5.6. Atividade <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	76
<b>4.6. Avaliação dos resultados da FES</b> .....	77
<b>4.7. Análise da lactose como substrato da enzima <math>\beta</math>-Galactosidase</b> 77	
<b>4.8. Quantificação de Proteína Total</b> .....	<b>77</b>
<b>4.9. Purificação da enzima <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	<b>78</b>
<b>4.10. Análise das etapas de Purificação</b> .....	<b>80</b>
<b>4.11. Eletroforese</b> .....	<b>81</b>
<b>4.12. Liofilização</b> .....	<b>81</b>
<b>4.13. Caracterização Bioquímico e cinética da enzima <math>\beta</math>-galactosidase</b> .....	<b>81</b>
<b>4.13.1. Avaliação do efeito do pH na enzima <math>\beta</math>-galactosidase</b> ...	81
<b>4.13.2. Determinação da temperatura ótima</b> .....	82
<b>4.13.3. Determinação da constante de Michaelis-Menten (<math>K_m</math> ap) e Velocidade Máxima (<math>V_{m\acute{a}x}</math> ap)</b> .....	82
<b>4.13.4. Efeito do inibidor galactose na atividade da <math>\beta</math>-Galactosidase</b> .....	83
<b>4.14. Cristalização</b> .....	<b>83</b>
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	<b>84</b>
<b>5.1. Seleção das linhagens produtoras de enzimas relacionadas à degradação da biomassa celular em Fermentação em Estado Sólido Sólido (FES)</b> .....	<b>84</b>
<b>5.2. Produção de xilanase pelos fungos isolados da Região Amazônica</b> .....	<b>85</b>
<b>5.3. Produção de Endoglucanase pelos fungos isolados da Região Amazônica</b> .....	<b>90</b>
<b>5.4. Produção de <math>\beta</math>-Glicosidase pelos fungos isolados da Região Amazônica</b> .....	<b>96</b>
<b>5.5. Produção de Pectinase pelos fungos isolados da Região Amazônica</b> .....	<b>100</b>

<b>5.6. Produção de FPase pelos fungos isolados da Região Amazônica.....</b>	<b>104</b>
<b>5.7. Avaliação das proteínas totais produzidas durante a Fermentação em Estado Sólido (FES) pelos fungos isolados da Região Amazônica.....</b>	<b>108</b>
<b>5.8. Seleção dos três melhores fungos produtores de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal.....</b>	<b>110</b>
<b>5.9. Produção de xilanase pelos fungos selecionados submetidos a FSm</b>	<b>111</b>
<b>5.10. Produção de endoglucanase pelos fungos selecionados submetidos a FSm.....</b>	<b>114</b>
<b>5.11. Produção de <math>\beta</math>-Glicosidase pelos fungos selecionados submetidos a FSm.....</b>	<b>116</b>
<b>5.12. Produção de FPase pelos fungos selecionados submetidos a FSm</b>	<b>118</b>
<b>5.13. Produção de Proteína Totais pelos fungos selecionados submetidos a FSm.....</b>	<b>120</b>
<b>5.14. Seleção do melhor fungo produtor de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal na FSm .....</b>	<b>121</b>
<b>5.15. Produção de <math>\beta</math>-Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> (P47C3)</b>	<b>122</b>
<b>5.16. Purificação e isolamento da enzima <math>\beta</math>-Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> .....</b>	<b>124</b>
<b>5.17. Estimativa da massa molecular .....</b>	<b>133</b>
<b>5.18. Caracterização da <math>\beta</math>-Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>135</b>
<b>5.18.1. Efeito do pH na estabilidade sobre a atividade da enzima <math>\beta</math>-Galactosidase .....</b>	<b>135</b>
<b>5.19. Efeito da temperatura sobre a atividade da <math>\beta</math>-Galactosidase</b>	<b>138</b>
<b>5.20. Constante de Michaelis-Menten (<math>K_m</math>) e velocidade máxima (<math>V_{m\acute{a}x}</math>).....</b>	<b>140</b>
<b>5.21. Determinação da constante de inibição (<math>K_i</math>) para o açúcar Galactose.....</b>	<b>144</b>
<b>5.22. Condições de cristalização.....</b>	<b>148</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>150</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>152</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Macro e Micromorfologia do fungo <i>Aspergillus niger</i> . Fonte: Joint Genome Institute (DOE, 2011). .....	27
Figura 2: Macro e Micromorfologia do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> . Fonte: DOCTORFUNGUS, 2011 .....	28
Figura 3: Macro e Micromorfologia do fungo <i>Trichoderma</i> ssp. Fonte: DOCTORFUNGUS, 2011 .....	29
Figura 4: Via de excreção de proteínas por fungos filamentosos. Fonte: (GOUKA; PUNT; HONDEL, 1997). .....	30
Figura 5: Hidrólise enzimática da celulose. Fonte: (ARANTES; SADDLER, 2010)....	37
Figura 6: Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado:(GRAMINHA et al., 2008). .....	38
Figura 7: Estrutura da celulose destacando a região cristalina e região amorfa (SUN; CHENG, 2002). .....	39
Figura 8: Ilustra os componentes básicos estruturais encontradas em hemicelulose e as hemicelulases responsável por sua degradação .....	41
Figura 9: Estrutura hipotética da lignina (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990). .....	42
Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de catálise das enzimas inversoras. ....	50
Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de catálise das enzimas retentoras (BOURNE; HENRISSAT, 2001). .....	50
Figura 12: Morfologia geral das Glicosil hidrolases, os resíduos catalíticos se apresentam em vermelho. A. Sítio ativo tipo bolsão (glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> ). B. Sítio ativo tipo sulco (endoglucanase E2 de <i>Thermomonospora fusca</i> ).C.Sítio ativo tipo túnel (Celobiohidrolase II de <i>Trichoderma reesei</i> ). Figura adaptada (HENRISSAT; BAIROCH, 1996). .....	51
Figura 13: Ação da $\beta$ -Galactosidase. ....	52
Figura 14: Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS), E-enzima $\beta$ -Galactosidase. Fonte: (RAYMOND, 1998). .....	65
Figura 15: À direita placa utilizada nos experimentos de cristalização e à esquerda, um dos poços está ampliado esquematicamente mostrando como a lamínula, contendo a gota composta por solução do poço e solução da proteína, é colocada sobre o reservatório. ....	69
Figura 16: Resumo das sequências das etapas utilizadas nesse trabalho. ....	71
Figura 17: Sequências de etapas cromatográficas utilizadas na purificação de $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> . ....	78
Figura 18: Produção de xilanase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	86
Figura 19: Produção de xilanase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	88
Figura 20: Produção de endoglucanases pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	92
Figura 21: Produção de endoglucanase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	93

Figura 22: Produção de $\beta$ -Glicosidases pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	97
Figura 23: Produção de $\beta$ -Glicosidase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	98
Figura 24: Produção de Pectinase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	101
Figura 25: Produção de Pectinase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	102
Figura 26: Produção de FPase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	105
Figura 27: Produção de FPase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias. ....	106
Figura 28: Produção proteica dos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	109
Figura 29: Produção de xilanase pelos fungos P6B2 ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), P40B3 e P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ), através da FSM utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado. ....	111
Figura 30: Avaliação da produção de Endoglucanase pelos fungos: P6B2 ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), P40B3; P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ). ....	114
Figura 31: Avaliação da produção de $\beta$ -Glicosidase pelos fungos: P6B2 ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), P40B3; P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ); P84C3. ....	116
Figura 32: Avaliação da produção de FPase pelos fungos: P6B2 ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), P40B3; P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ). ....	118
Figura 33: Produção de proteínas totais durante a FS pelos fungos: P6B2 ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), P40B3; P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ). ....	120
Figura 34: Produção da enzima $\beta$ -Galactosidase durante cinco dias de FSM, com suplementação de lactose no meio ( $\square$ ) e sem suplementação de lactose no meio ( $\blacksquare$ ).122	
Figura 35: Eluição da proteína na coluna cromatográfica com a resina SP-Sephadex C-50. ....	125
Figura 36: Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo $\beta$ -Galactosidase, somente na fração 1, de <i>Aspergillus niger</i> em resina Sephadex. A absorbância ( $\square$ ), atividade $\beta$ -Galactosidase ( $\circ$ ), gradiente de NaCl (0-0,5M) representado por ( $\sphericalangle$ ). ....	128
Figura 37: Perfil cromatográfico da fração enzimática S1, contendo $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> em resina Sephacryl S-200. Atividade de $\beta$ -Galactosidase ( $\circ$ ) e proteínas ( $\square$ ). ....	131
Figura 38: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 10%), corado com Cromassie Blue, de amostra de $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> . Cada poço continha 10 $\mu$ g/mL de proteína. A esquerda observa-se os marcadores de massa molecular; frações obtidas da cromatografia de troca iônica da resina Sephadex (SP) e as frações enzimáticas que continham a $\beta$ -Galactosidase purificada após cromatografia em Sephacryl S-200 (P), e o marcador representado (M). ....	132

Figura 39: Determinação da massa molecular da $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> . Marcadores de massa molecular: Catalase (200kDa), Lactase Deidrogenase (116kDa), Fosforilase (97kDa), Albumina (66kDa), Ovoalbumina (45kDa), Anidrase Carbônica (29kDa). Massa molecular da $\beta$ -Galactosidase (■).....	133
Figura 40: Efeito da variação do pH na atividade da enzima $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> quando incubada à 37°C.....	136
Figura 41: Efeito da temperatura na atividade da enzima $\beta$ -Galactosidase.....	139
Figura 42: <b>A</b> - Efeito da concentração do substrato OPNG na velocidade da reação catalisada pela $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> . <b>B</b> - Gráfico Duplo Recíproco. ...	141
Figura 43: <b>A</b> - Efeito da concentração do substrato lactose na velocidade da reação catalisada pela $\beta$ -Galactosidase. <b>B</b> – Gráfico Duplo Recíproco.....	142
Figura 44: Diferentes concentrações de galactose. 1mM de galactose (□), 2mM de galactose (Δ), 5mM de galactose (x). ....	145
Figura 45: Duplo recíproco. Ausência de galactose (○), 1mM de galactose (□), 2mM de galactose (Δ), 5mM de galactose (x). ....	146
Figura 46: Concentração de galactose em função de Km/Vmáx para determinação do Ki. ....	147
Figura 47: Cristais de $\beta$ -Galactosidase crescidos em 12 % de PEG 4000, 0,2 M Tris-HCl, pH 8,6 e 10 mg/mL de proteína. ....	149

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações de produtos produzidos por alguns microrganismos (PEARCE, 1997).....	23
Tabela 2: Classificação das enzimas em seis classes, baseado nas reações químicas que catalisam. ....	34
Tabela 3: Complexos enzimáticos produzidos por fungos capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos (SHALLOM; SHOHAM, 2003; GRAMINHA <i>et al.</i> , 2008).....	43
Tabela 4: Comparação entre os métodos de fermentação, FES e FSm. Fonte: (ORIOLO <i>et al.</i> , 1988).....	48
Tabela 5: Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidases. ....	54
Tabela 6: Propriedades de algumas $\beta$ -Galactosidases dos microrganismos produtores. ....	55
Tabela 7: Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase e os fornecedores das preparações comerciais (RAYMOND, 1998). ....	61
Tabela 8: Fungos filamentosos isolados da região amazônica. ....	70
Tabela 9: Composição do meio PDA. ....	71
Tabela 10: Componentes do meio Meio de Mandels e Weber, 1969.....	73
Tabela 11: Meio de cultivo para a fermentação submersa (FSm) para a produção de endoglucanase, FPase, xilanase e $\beta$ -Glicosidase. ....	74
Tabela 12: Meio de cultivo para Fermentação Submersa para produção de $\beta$ -Galactosidase. ....	74
Tabela 13: Comparação da produção de xilanase com resultados obtidos nesse trabalho e valores da literatura, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo. ....	89
Tabela 14: Comparação da produção de endoglucanase com os resultados obtidos nesse trabalho e com os valores da literatura fonte de carbono o farelo de trigo, salvo exceções.....	94
Tabela 15: Comparação da produção de $\beta$ -Glicosidase com o resultado obtido nesse trabalho em relação aos valores registrados na literatura, utilizando como fonte de carbono, o farelo de trigo.....	99
Tabela 16: Comparação da produção de Pectinase entre os resultados obtidos nesse trabalho com valores da literatura, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo. ....	103
Tabela 17: Comparação da produção de FPase com diferentes cepas de fungos, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo.....	107
Tabela 18: Comparação da produção de xilanase com os resultados obtidos nesse trabalho e com os valores da literatura, tendo como fonte de carbono o farelo de trigo. ....	112
Tabela 19: Comparação da produção de endoglucanase pelo fungo P47C3 ( <i>Aspergillus niger</i> ) com outros trabalhos registrados na literatura, usando como substrato farelo de trigo.....	115
Tabela 20: Resumo das etapas de purificação da enzima $\beta$ -Galactosidase de <i>Aspergillus niger</i> . ....	124
Tabela 21: Purificação da $\beta$ -Galactosidase utilizando a coluna DEAE.....	130
Tabela 22: Valores de $K_{m_{ap}}$ e $V_{m\acute{a}x_{ap}}$ , determinados pelas curvas de Michaelis-Menten com os substratos PNPG e lactose.....	142
Tabela 23: Ensaios de cristalização para a $\beta$ -Galactosidase.....	149

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\bar{a}$  – Média  
A<sub>ef</sub> – Atividade Específica Final  
A<sub>ei</sub> – Atividade Específica Inicial  
A<sub>e</sub> – Atividade Específica  
A – Atividade Enzimática  
a<sub>i</sub> – Atividade enzimática inicial  
a<sub>f</sub> – Atividade enzimática final  
CMC – Carboximetilcelulose  
CBH - Celobiohidrolases  
DC – Domínio Catalítico  
DEAE – Dietilaminoetil  
EC - *Enzyme Commission*  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
FES – Fermentação em Estado Sólido  
FSm – Fermentação Submersa  
FP – Fator de Purificação  
FPase – *Filter Paper Hydrolases*  
g – grama  
GH - Glucanohidrolases  
GOS – Galactooligossacarídeos  
h – horas  
IFSC/USP – Instituto de Física de São Carlos/Universidade São Paulo  
K<sub>i</sub> – Constante de Inibição  
K<sub>m</sub> – Constante de Michaelis-Menten  
MLC – Módulo de Ligação à Carboidrato  
ONPG – orto-nitrofenilgalactose  
PDB – Protein Data Bank  
pI – Ponto Isoelétrico  
PNPG –  $\rho$ -nitrofenilgalactose  
Prot – Proteína Total  
R – Rendimento  
RL – Região de Ligação  
RNAm – RNA mensageiro  
RNAr – RNA ribossômico  
RNAt – RNA transportador  
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*  
T – Temperatura  
UV - Ultravioleta  
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos  
V – Volume  
V<sub>máx</sub> – Velocidade Máxima  
XGAL - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactoside  
 $\sigma$  - sigma



## Resumo

TONELOTTO, M. *Produção de celulases, purificação e caracterização bioquímico-cinética da  $\beta$ -Galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica*. p.177. Texto para defesa do Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

A seleção de fungos produtores de celulases é uma das possíveis estratégias para a obtenção das enzimas necessárias para hidrolisar o material lignocelulósico da biomassa vegetal e com isso contribuir para a viabilização da produção de etanol celulósico. O objetivo desse trabalho foi realizar um *screening* dos fungos isolados da região amazônica para a avaliação da produção de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, a fim de selecionar uma linhagem para produção, purificação e caracterização bioquímica, cinética e biologia estrutural da enzima  $\beta$ -Galactosidase. Dessa forma, esse trabalho foi realizado em três etapas, primeiramente foi realizado um *screening* de 40 linhagens fúngicas isoladas da região amazônica, através do cultivo em fermentação em estado sólido (FES), a 35°C, por 240 horas, utilizando como substrato o farelo de trigo. Avaliou-se a produção de xilanase, endoglucanase, FPase, pectinase,  $\beta$ -glicosidase e proteínas totais, sendo que os fungos que mais se destacaram foram o: P6B2, melhor produtor de xilanase, P47C3 (*Aspergillus niger*), melhor produtor de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase e o P40B3, melhor produtor de FPase. Esses três fungos, foram selecionados para a segunda fase do trabalho para avaliação na produção de xilanase, FPase, endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e proteínas Totais por fermentação submersa (FSm). A fermentação ocorreu por 5 dias, à 30°C e 200 rpm tendo como fonte de carbono: 1% de farelo de trigo lavado e meio nutriente. O fungo P47C3, identificado como *Aspergillus niger*, apresentou melhor produção dessas enzimas, sendo selecionado para a terceira etapa desse projeto. Essa última etapa, envolveu a escolha de uma enzima que não estivesse sua biologia estrutural elucidada. Diante desse fato, realizou-se um estudo de seleção do meio de cultivo, purificação e caracterização bioquímico-cinética da  $\beta$ -Galactosidase. O fungo *Aspergillus niger* (P47C3) foi submetido a fermentação submersa, durante 5 dias, à 200 rpm em 30°C. A purificação ocorreu em três etapas utilizando: colunas de troca iônica SP - Sephadex C-50 e a coluna SP -TSK 5PW; e gel filtração, com a resina Sephacryl S-200. A enzima  $\beta$ -Galactosidase apresentou uma massa molecular de 125 kDa, sendo estável em pH 4,0, e com temperatura ótima de 55°C. Avaliou-se a  $K_{map}$  e  $V_{máxap}$  de dois substratos, o PNPG e a lactose, sendo: 2,204 mM - 0,285 mM/min e 2,101 mM – 0,750 mM/min, respectivamente. A inibição da hidrólise do substrato PNPG pela  $\beta$ -Galactosidase na presença do produto inibidor galactose apresentou um valor de  $K_i$  de 5,01 mM. Por fim, a  $\beta$ -Galactosidase foi submetida a condições de cristalização, as melhores condições ocorreram em tampão 0,2M Tris-HCl, tendo como agente precipitante, PEG 4000 12% em pH 8,6. Portanto, o protocolo inédito de purificação da  $\beta$ -Galactosidase foi eficiente, sendo possível cristalizar essa enzima do fungo isolado da região amazônica, o qual apresentou grande potencial para a produção dessa enzima e que futuramente possa ser utilizado em aplicações industriais e inovações biotecnológicas.

**Palavras chaves:** Celulases, Fermentação sólida, Fermentação Submersa, Fungos isolados da região amazônica e  $\beta$ -Galactosidase.

## Abstract

Tonelotto, M. *Production of cellulases, purification and characterization of kinetic biochemical  $\beta$ -galactosidase produced by fungus isolated from the Amazon p.177. Text for the exam Master's degree in Biotechnology - Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, 2012.*

The selection of cellulase-producing fungi is one of the possible strategies for obtaining necessary enzymes to hydrolyze the lignocellulosic material of plant biomass and thereby contribute to the viability of cellulosic ethanol production. The aim of this study was achieve a screening of isolated fungi from the Amazon region to assess the production of enzymes related to plant biomass degradation, in order to select a line for production, purification and biochemical, kinetical and and structural biology characterization of the  $\beta$ -Galactosidase enzyme. Therefore, this work was undertaken in three stages, first of all it was performed a screening of 40 fungal strains isolated from the Amazon region through the cultivation in solid state fermentation (FES) at 35°C for 240 hours, using as substrate wheat bran. It was evaluated the production of xylanase, endoglucanase, FPase, pectinase,  $\beta$ -Glicosidase and total protein, and the fungi that stood out were: P6B2, the best producer of xylanase, P47C3 (*Aspergillus niger*), the best producer endoglucanase and  $\beta$ -Glicosidase and P40B3, the best producer of FPase. These three fungi were selected for the second phase of this work for assessment in the production of xylanase, FPase, endoglucanase,  $\beta$ -Glicosidase and total protein by submerged fermentation (FSm). The fermentation took place for 5 days at 30°C and 200 rpm with a source of carbon: 1% of wheat bran washed and nutrient medium. The fungi P47C3, which was identified as *Aspergillus niger*, showed the best production of these enzymes, being selected for the third stage of this project. This last step involved the selection of an enzyme that has not been elucidated its structural biology. Given this fact, we carried out a study of selection of the medium, purification and biochemical-kinetical characterization of  $\beta$ -Galactosidase. The *Aspergillus niger* (P47C3) was subjected to submerged for 5 days at 200 rpm at 30°C. Purification occurred in three steps using: ion exchange column SP-Sephadex C-50 and SP TSK-5PW column, and gelfiltration, with the resin Sephacryl S-200. The enzyme  $\beta$ -Galactosidase showed a molecular weight of 125 kDa, being stable at pH 4,0, with an optimum temperature of 55°C. It was evaluated the  $K_{m_{ap}}$  e  $V_{m\acute{a}x_{ap}}$  of two substrates, PNPG and lactose, being: 2,204 mM-0,285 mM/min and 2,101 mM-0,75mM/min, respectively. The inhibition of hydrolysis of the substrate PNPG by  $\beta$ -Galactosidase in the presence of galactose inhibitor product showed a  $K_i$  value of 5,01 mM. Finally, the  $\beta$ -Galactosidase was subjected to crystallization conditions, the best conditions occurred in buffer 0,2M Tris-HCl, with the precipitation agent, 12% PEG 4000 at pH 8,6. Therefore, the unpublished protocol for purification of  $\beta$ -Galactosidase was efficient and it is possible to crystallize this enzyme of isolated fungi from the Amazon region, which showed great potential for the production of this enzyme and that the future can be used in industrial application and biotechnological innovations.

**Keywords:** cellulases, solid fermentation, submerged fermentation, Fungi isolated from the Amazon region and  $\beta$ -Galactosidase.

## 1. Introdução

A Floresta Amazônica apresenta uma grande riqueza em recursos naturais bem como uma vasta biodiversidade. Suas condições climáticas propiciam a existência de microrganismos decompositores e degradantes da biomassa rasteira da floresta, com isso os solos dessa região são ricos em nutrientes. E muito desses microrganismos estão sendo alvo de várias pesquisas por serem fonte de produtos naturais e por possuir uma ampla distribuição e utilização biotecnológica já que podem produzir uma diversidade de compostos químicos como antibióticos, antitumorais, antifúngicos, enzimas, entre outras substâncias, sendo de grande aplicabilidade nas áreas farmacêuticas, industriais e agrícola (STROBEL, *et al.*, 2004).

Os microrganismos, especialmente os fungos, exercem um papel fundamental na ciclagem dos nutrientes. Os fungos degradam a matéria orgânica por meio da secreção de enzimas no ambiente e constituem a peça chave para o processo de produção dessas enzimas (BHAT, 2000). Nesse contexto, a biodiversidade amazônica é considerada um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos secretores de potentes coquetéis enzimáticos contendo celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases e outras enzimas acessórias sendo importantes na degradação da biomassa vegetal.

O sinergismo destas enzimas são essenciais no processo de transformação de materiais celulósicos em biocombustíveis, através da hidrólise enzimática seguida da fermentação (SINGHANIA *et al.*, 2010). O estudo das enzimas envolvidas nessa transformação, envolve a hidrólise tanto das cadeias principais bem como das ramificações das fibras de celulose.

A enzima  $\beta$ -Galactosidase é uma hemicelulase que hidrolisa as cadeias laterais de hemicelulose de arabinogalactosanas e atua de forma sinérgica com outras enzimas

accessórias cujo mecanismos não foram elucidados. Essa enzima também atua de forma eficiente na hidrólise da lactose em galactose, sendo essencial na utilização em potentes medicamentos de pessoas que sofrem de intolerância a lactose e ainda contribui de forma significativa para diminuição da lactose em alimentos refrigerados evitando a perda de seu sabor e odor.

Os processos de obtenção das enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal envolve a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FSm) (GOYAL; GHOSH; EVELEIGH, 1991).

Na FES há uma quantidade ínfima de água necessária para garantir o crescimento desse microrganismos, enquanto que na FSm a água constitui 90% do processo fermentativo. A produção em larga escala de enzimas microbianas incluem tanto a FES como a FSm, mas nesses processos são necessários microrganismos que secretem enzimas com grande estabilidade em diferentes pH e temperaturas e alta taxa de conversão do substrato em produtos.

A utilização de técnicas de cromatografia permite isolar ou purificar uma proteína de interesse (LENINGHER, 2000), sendo importante principalmente em estudos bioquímicos e cinéticos das enzimas envolvidas no processo de degradação da biomassa vegetal para compreender a influência do pH e da temperatura nos mecanismos catalíticos, a especificidade e afinidade por diferentes substratos e as inibições pelos produtos da reação (STRYER, 1992).

A purificação também permite realizar a cristalização dessas enzimas para definir os aminoácidos que participam da estrutura tridimensional da proteína e assim permite elucidar seu funcionamento.

Portanto, vê-se a importância necessária no desenvolvimento de pesquisas para as produções, purificações e caracterizações de enzimas de interesse biotecnológico.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral desse trabalho foi realizar um *screening* dos fungos isolados da região amazônica para a avaliação da produção de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, a fim de selecionar uma linhagem para produção, purificação e caracterização bioquímica, cinética e biologia estrutural de uma enzima específica, a  $\beta$ -Galactosidase.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ❖ Fazer o *screening* das linhagens fúngicas produtoras de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal (endoglucanases, xilanases, FPases, pectinases,  $\beta$ -glicosidases) e avaliação das proteínas totais obtidas na Fermentação em Estado Sólida (FES).
- ❖ Selecionar os fungos mais promissores na produção das enzimas na FES e submetê-los a FSm (Fermentação Submersa) para avaliar a produção de endoglucanases, xilanases, FPases,  $\beta$ -glicosidases;
- ❖ Selecionar o melhor fungo produtor destas enzimas na FSm e definir uma enzima que não tivesse sua biologia estrutural conhecida;
- ❖ A partir da enzima ( $\beta$ -Galactosidase produzida pelo fungo selecionado P47C3 (*Aspergillus niger*)) analisar as melhores condições de cultivo para a produção da enzima específica
- ❖ Avaliar a produção de  $\beta$ -Galactosidase pelo fungo *Aspergillus niger* na presença e ausência de lactose em cultivo submerso.

- ❖ Definir o protocolo de purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando as técnicas de troca iônica e gel filtração.
- ❖ Caracterizar bioquímico e cinética dessa enzima em diferentes valores de pH; efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; especificidade da enzima em diferentes substratos sintéticos com determinação de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para os substratos analisados; determinação de possíveis inibidores; tipo de inibição e determinação  $K_i$ .
- ❖ Obter as melhores condições de cristalização para futuros estudos da biologia estrutural da enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger*.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1. Desafios biotecnológicos aliados à diversidade microbiana**

Os microrganismos são uma ferramenta poderosa para o avanço na área de biotecnologia, principalmente devido a sua grande diversidade genética, o que lhes permitem desenvolver funções únicas e cruciais para a manutenção dos ecossistemas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

As formas de isolamento e seleção de microrganismos garantem o desenvolvimento de novos produtos, aplicáveis nas áreas da saúde, agricultura, indústria e no meio ambiente. A utilização de seus produtos (Tabela 1) no setor industrial, vem aumentando significativamente em nível mundial. Os inúmeros esforços tem sido realizados no sentido de aperfeiçoar seus processos de produção, de modo a obter melhores rendimentos e valores de produtividade mais altos. Nesta esfera, os microrganismos apresentam considerável interesse biológico devido as suas biomoléculas constituírem modelos interessantes para aplicação em bioprocessos ou para ser otimizadas na tentativa de melhores qualidades (BENNETT, 1998).

A busca por uma enzima inédita sintetizada por esses microrganismos se dá pela realização de um potente sistema de *screening* desses organismos. Porém o esforço vai muito além da descoberta, já que o maior desafio é torná-la viável economicamente (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Tabela 1: Aplicações de produtos produzidos por alguns microrganismos (PEARCE, 1997).

<b>Aplicação</b>	<b>Produto</b>	<b>Fungo</b>
Analgésico	Paxisterol	<i>Penicillium</i> sp.
	Crisopermina	<i>Perichaena chysosperma</i>
	Cefalosporina	<i>Caphalosporium</i>
Antibacteriano	Penicilina	<i>Penicillium, Aspergillus</i>
	Sorretanona	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Equinocandina	<i>Aspergillus nidulans</i>
	Ácido zaragózico	<i>Myceliasterilia, Leptodontidium elatius, Sporomiella intermedia</i>
Antifúngico	Esqualestatinas	<i>Phoma</i> sp.
	Griseofulvina	<i>Penicillium griseofurvum</i>
Controlador de síntese de Colesterol	Compactina	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	Mevilonina	<i>Penicillium citrinum</i>
	Dihidromevilonina	<i>Aspergillus terreus</i>
	Taxol	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
Antitumoral	Calfostina C	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	KS 501, KS 502	<i>Sporothrix</i> sp.
	Isocromofilonas	<i>Penicillium multicolor</i>
Antiviral	Alcalóides Ergo	<i>Claviceps purpurea</i>
	Estimulador da contração uterina	FR-901235
Imunomodulador	Ciclosporina A	<i>Tolypocladiuminflatum</i>
	Imunossupressor	
Tratamento de problemas cardiovasculares	Estachibocinas	<i>Stachybotys</i> sp.
	RES 1214-1/2	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
Profilático de odontologia	Mustateína	<i>Aspergillus terreus</i>
Tratamento de diabetes	Salfredinas	<i>Crucibillum</i> sp.

Dentre os microrganismos selecionados para esse *screening*, os fungos são os que apresentam melhores características que os diferenciam dos demais seres vivos: a estrutura somática representada por hifas, que em conjunto constitui o micélio, e a nutrição absorptiva (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Fungos pertencem ao Reino Fungi pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota e entre outros filos (HIBBETT et al., 2007). As espécies conhecidas de fungos estão catalogadas em 525 gêneros, sendo



estimado um número de aproximadamente 100.000 espécies (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

Por serem organismos heterotróficos, obtém o carbono para a síntese celular a partir da matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Como saprófitas, decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao ambiente (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

O solo é o habitat mais rico em fungos, sendo que representantes de todos os grandes grupos ocorrem numa densidade populacional de  $10^4$  a  $10^6$  esporos/g de solo (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991; BRANDÃO, 1992).

Os gêneros mais freqüentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Verticillium*. A principal função desses organismos no solo é a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem dos nutrientes, visto que possuem um arsenal enzimático com capacidade de degradação de compostos orgânicos complexos, tais como: celulose, lignina e algumas proteínas (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991).

Porém a atividade desses organismos depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, o que determina a ocorrência e distribuição desses organismos (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004).

As atividades e a biomassa microbiana são influenciadas por propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. De maneira geral, as populações de microrganismos e suas funções são afetadas pelas condições ambientais como pH, umidade, aeração, temperatura e quantidade de matéria orgânica (MATTHIES; ERHARD; DRAKE, 1997)

Os solos brasileiros, como os tropicais da Mata Atlântica, Floresta Amazônica e os sob vegetação de cerrado no planalto central, são *habitats* muito peculiares, com características próprias e únicas, cuja atividade biológica é extremamente rica. Estes solos possuem ampla biodiversidade e têm sido pouco estudados quanto às características microbiológicas que tornam fontes de solos excelentes para a busca de microrganismos produtores de novas enzimas (BON; CORVO; FERRARA, 2008).

Segundo Hawksworth, Button e Ainsworth (1995) das 16.013 espécies fúngicas descritas na literatura entre 1981 e 1990, 49% eram provenientes de países tropicais. Portanto, há o número provável de fungos ainda desconhecidos em regiões tropicais, sendo necessário um maior envolvimento e comprometimento de micologistas na área de sistemática de fungos, a fim de expandir o conhecimento e a análise das espécies, para uma avaliação mais precisa da biodiversidade brasileira e melhor utilização dos recursos genéticos de fungos filamentosos.

### **3.2. Microrganismos produtores de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal**

Durante a Segunda Guerra Mundial, a deterioração de fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos fabricados de algodão, chamou a atenção de soldados das forças armadas norte-americanas instalados no Pacífico-Sul. Algumas organizações, como a Quartermaster Corps, juntamente com as forças armadas montaram laboratórios em busca de explicações e soluções imediatas para esse problema, que incluíam a detecção de organismos agentes das deteriorações, seus mecanismos de ação e métodos de controle. Um grupo de pesquisa constituído por oito pesquisadores e liderado por Elwyn T. Reese conduziu os experimentos no laboratório das Forças Armadas, em Massachusetts, nos Estados Unidos. Obtendo como resultado uma linhagem,

inicialmente identificada como QM6a, posteriormente conhecido como *Trichoderma viride*, atribuindo-lhe como característica de excretar enzimas capazes de degradar a celulose (REESE, 1976).

Em 1977, este fungo foi renomeado para *Trichoderma reesei*, em homenagem ao líder do grupo de pesquisa (TOLAN; FOODY, 1999). Graças a esse fungo, diversos grupos de pesquisas investigam o potencial de uma grande diversidade de microrganismos, que incluem bactérias e fungos, em sintetizar as enzimas celulósicas. Dentre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são os mais utilizados industrialmente para a produção de celulases (GODFREY; WEST, 1996).

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram identificados por Micheli e Link em 1809, pertencentes à filo Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. Caracterizam-se por fungos filamentosos, cosmopolitas, e habitam os solos e resíduos vegetais. No que tange à sua morfologia, produzem micélios septados e ramificados, cujas porções vegetativas encontram-se submersas ao nutriente (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; SILVEIRA, 1997), seu aspecto macro e microscópico são mostrados na Figura 1. Estudos recentes revelaram que o sequenciamento genético de um representante desse gênero, *Aspergillus niger*, indicou uma grande variedade de celulases e hemicelulases em relação ao *Trichoderma reesei* (MARTINEZ *et al.*, 2008). Estes fatos potencializam esse gênero ser um grande produtor de celulases (MATHEW *et al.*, 2008). Além disso, o fungo *Aspergillus niger* é apreciado no meio industrial por uma série de características que o tornam um microrganismo ideal, como uma grande capacidade de fermentação e elevados níveis de secreções de proteínas, além de grande variedade de enzimas produzidas para diversas aplicações (LIU *et al.*, 2011).



Figura 1: Macro e Micromorfologia do fungo *Aspergillus niger*. Fonte: Joint Genome Institute (DOE, 2011).

Os fungos do gênero *Penicillium* foram descritos por Link em 1809, pertencentes a filo Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichomaceae. Apresentam as mesmas características do gênero *Aspergillus*, são saprófitos e mesofílicos. Possuem micélios vegetativos septados que penetram no substrato, produzem hifas aéreas, nas quais desenvolvem conidióforos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Seu aspecto macro e microscópico são mostrados na Figura 2.

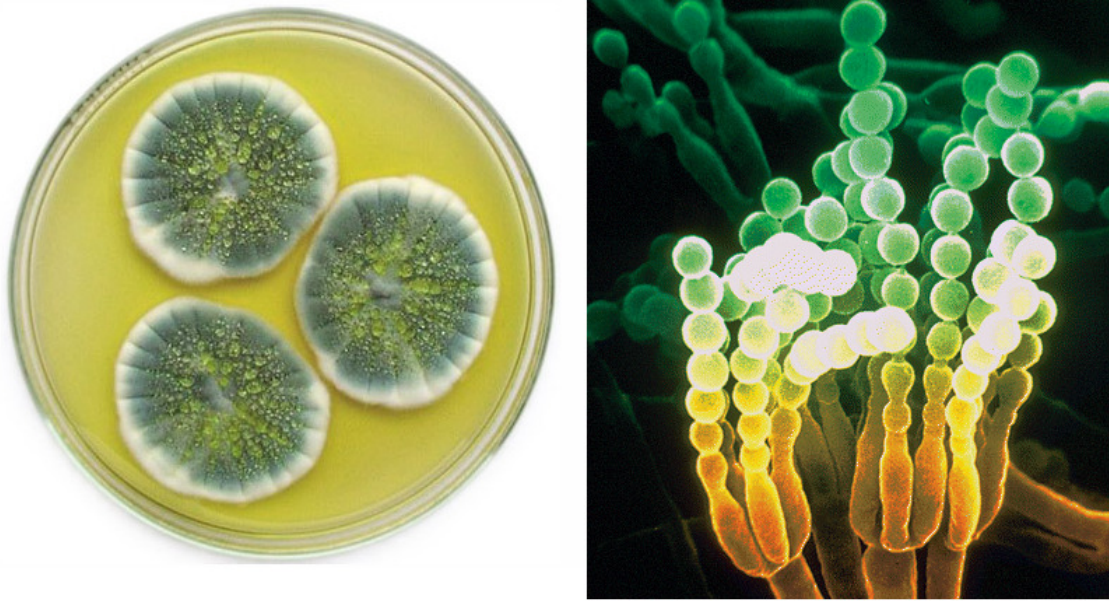


Figura 2: Macro e Micromorfologia do fungo *Penicillium chrysogenum*. Fonte: DOCTORFUNGUS, 2011

Em geral, os membros do gênero *Penicillium*, com exceção do *Penicillium marneffei*, reproduzem-se sexuadamente pela formação de ascósporos. Segundo algumas análises genéticas, detectaram-se genes associados com a reprodução sexual e produção e detecção de feromônios em *Penicillium chrysogenum*, sendo este o primeiro fungo de interesse industrial, com a produção do antibiótico penicilina, a ter estes genes de reprodução descobertos (HOFF; PÖGGELER; KÜCK, 2008).

Os fungos do gênero *Trichoderma* foram descritos por Persoonex Gray em 1801, pertencentes à filo Ascomycota, à ordem Hypocreales e à família Hypocreaceae. Muitas espécies podem ser caracterizadas como oportunistas e simbioses de plantas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996) e microparasitas. Os conídios formam-se normalmente dentro de uma semana em tufo compactos ou soltos em tons de verde ou amarelo ou branco com menos frequência. Um pigmento amarelo pode ser secretado no ágar apresentando uma cor característica de um verde brilhante, isso está associado a

grupos de conídios presentes nas extremidades das hifas aéreas (DOCTORFUNGUS, 2011). Seu aspecto microscópico é mostrado na Figura 3.



Figura 3:Macro e Micromorfologia do fungo *Trichoderma* ssp. Fonte: DOCTORFUNGUS, 2011

O fungo *Trichoderma reesei* apresenta um potencial elevado para a produção de celulases, sendo submetidos constantemente a técnicas de mutação, com o intuito de aumentar a produção enzimática (MONTENECOURT; EVELEIGH, 1977).

O sistema celulolítico da maioria das linhagens produtoras de celulases precisa ser estimulado pela presença do substrato, sendo também suscetível à repressão catabólica em presença de fontes de carbono de fácil metabolização como a glicose (SEIBOTH *et al.*, 1997).

O mecanismo de produção celular das celulases é ainda desconhecido, mas foi explicado por vários pesquisadores como um processo de síntese constitutiva. O processo inicia-se no núcleo e após a transcrição, o RNAm (RNA mensageiro) migra para o citoplasma, fenômeno este seguido da transferência de informações para o RNAt (RNA transportador), e finalmente ocorre a síntese das proteína catalisada pelo RNAr (RNA ribossomo) dentro do ribossomo (Figura 4).

Em seguida, as celulasas são transportadas para o retículo endoplasmático rugoso e a excreção das enzimas ocorre através da parede celular (LODISH *et al*, 2004). A Figura 4 demonstra o caminho percorrido pelas enzimas durante a via excretora, dentro da morfologia apical de fungos filamentosos.

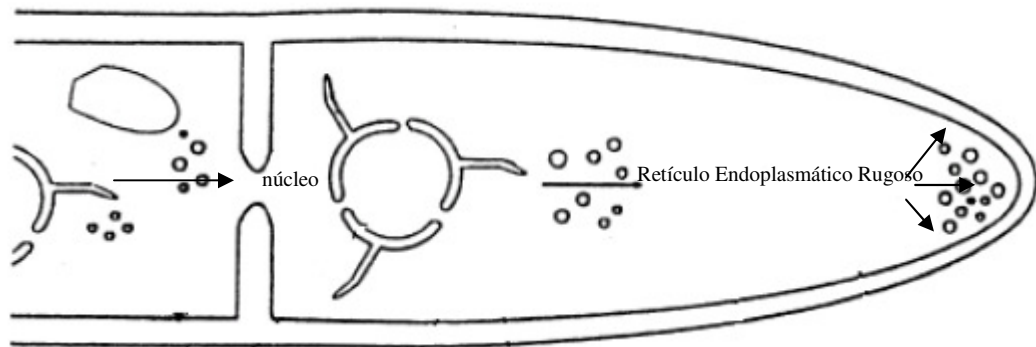


Figura 4: Via de excreção de proteínas por fungos filamentosos. Fonte: (GOUKA; PUNT; HONDEL, 1997).

Carle-Urioste e colaboradores, 1992 afirmaram que a presença de um indutor pode aumentar 1100 vezes a biossíntese de celulasas em relação à expressão constitutiva (CARLE-URIOSTE, 1992; LYND; ZHANG, 2002). Diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos, como lactose, nigerose, lichenana, glucana de cevada e sofrorse, foram citados na literatura como substâncias indutoras de celulasas.

No processo de fermentação, a indução é realizada pelo próprio substrato atuando como fonte de carbono e energia para o microrganismo fermentador (RAIMBAULT, 1998), sendo necessária a complementação do meio com nitrogênio, fósforo, enxofre, além de macro e micro minerais e várias vitaminas. Assim, a necessidade de inclusão de nutrientes adicionais ao substrato, como peptonas e extrato de levedura, é considerada, em algumas linhagens do meio de fermentação, como estimulantes do crescimento (SINGHANIA *et al.*, 2010).

### **3.3. Bioma Amazônico**

No Brasil, a Amazônica (4.196.943 km<sup>2</sup>), o Cerrado (2.036.448 km<sup>2</sup>) e a Mata Atlântica (1.110.182 km<sup>2</sup>) representam os principais biomas. Além destes, podemos destacar a Caatinga (844.453 km<sup>2</sup>) na região semi-árida no nordeste e norte de Minas Gerais, o Pampa no sul do país (176.496 km<sup>2</sup>) e as áreas inundadas sazonalmente na região central, caracterizadas por Pantanal (150.355 km<sup>2</sup>) (INPE, 2011)

Os ecossistemas são constituídos por uma grande diversidade, as interações entre fatores climáticos, geológicos, geomorfológicos e biológicos resultam em grande diversidade de flora e fauna (INPE, 2011), que diferencia uns dos outros.

O Bioma Amazônico é um dos mais importantes do planeta, sobrepondo-se em grande parte à bacia do rio Amazonas. Distribui-se pelo Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, em Suriname e na Venezuela. No Bioma Amazônico, a Floresta Amazônica é considerada patrimônio nacional pela Constituição Federal de 1988, condicionando-se a utilização de seus recursos naturais à preservação e proteção do meio ambiente. Este bioma caracteriza-se pelo clima predominante equatorial em área de planícies e planalto rebaixado, e vegetação típica de regiões equatoriais úmidas.

Não obstante, a imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas (THIEME *et al.* 2007). Por conta disso, se destacam como um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que possam ser usados nos processos e estudos biotecnológicos.

No Brasil, estendem-se pelos estados do Acre, Amazonas, Rondônia, norte de Mato Grosso, Roraima, Amapá, Pará, noroeste de Tocantins e oeste do Maranhão. A Amazônia Legal, divisão política que inclui além do bioma amazônico, parte do bioma



cerrado e de biomas de transição para o semi-árido, abrange uma superfície de cerca de 60% do território nacional (LAURENCE; FEARNSTIDE; LAURENCE et al., 1999).

A Amazônia contém grande parte de seus nutrientes presente na parte aérea da vegetação, sendo bem forte a interação entre a vegetação e o solo, por meio da ciclagem de nutrientes, em que o acúmulo de serrapilheira exerce importante função, por ser a forma mais significativa de transferência de nutrientes.

A serrapilheira é um importante componente de um ecossistema florestal compreendendo o material precipitado ao solo pela biota, o que inclui principalmente folhas, galhos, frutos, flores, raízes e resíduos animais. Esse material entra em rápida decomposição na atmosfera úmida. A fina camada resultante desse processo fornece as condições necessárias para o crescimento de várias espécies de fungos (AVILA-CABADILLA *et al.* 2009).

Muitos fungos secretam enzimas no substrato onde se encontram e absorvem as moléculas resultantes da ação dessas enzimas. Com isso, além de obterem nutrientes para seu crescimento também disponibilizam os produtos resultantes da degradação para a ação de outros microrganismos, e por essa razão são os degradadores primários de material orgânico na natureza, participando ativamente nos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo.

Desta forma, são focos de pesquisa, sendo explorados comercialmente na síntese dessas enzimas, tanto as originadas de fungos como as heterólogas, originalmente presentes em outros organismos (PUTZKE; PUTZKE, 2004). O Bioma Amazônico é um potencial para os fungos celulolíticos, devido as suas condições morfoclimáticas peculiares que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta. Porém poucas pesquisas são realizadas para tal finalidade.

Portanto o Bioma Amazônico apresenta um grande potencial para a seleção de organismos microbiológico na produção de celulases, sendo associado à aplicabilidade dessas enzimas no campo da biotecnologia.

### **3.4. Enzimas**

#### **3.4.1. Caracterização enzimática das celulases**

As enzimas são moléculas protéicas presentes em todas as células vivas, que atuam como catalisadores biológicos capazes de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto (REX, 1969).

As celulases são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia na hidrólise de materiais lignocelulósicos liberando açúcares, dos quais, o de maior interesse industrial é a glicose, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010). As massas molares das celulases abrangem um intervalo de 34 kDa a 250 kDa , pois podem ser sintetizadas como monômeros ou na forma de estrutura quaternárias constituídas por várias unidades peptídicas (VAN TILBEURGH, CLAEYSSSENS, 1985).

A estrutura dessas enzimas é constituída por um sequência complexa e específica de aminoácidos, sendo dividida em três regiões: o domínio catalítico (DC), que constitui a parte da molécula em que ocorre a catálise e abrangem cerca de 90% do número total de aminoácido da sequência peptídica; a região de ligação (RL), que contém uma pequena quantidade de aminoácidos altamente glicosilados, cuja função é ligar o domínio catalítico a uma terceira região constituída pelo módulo de ligação a carboidratos (MLC) e os MLCs que são pequenos polipetídeos estáveis que podem

conter de quarenta a cento e vinte aminoácidos e são localizados, na cadeia de aminoácidos da enzima (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As principais funções dos MLCs são manter a enzima próxima ao substrato de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo; aumentar a especificidade da enzima na atuação de regiões seletivas da molécula do substrato e romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa apresenta elevada cristalinidade (LYND *et al.*, 2002).

A Tabela 2 apresenta o sistema de nomenclatura identificando as enzimas em seis classes, baseado nas reações químicas que catalisam de acordo com a *International Union of Biochemistry an Molecular Biology (IUBMB)*. Para cada enzima são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses.

Toma-se como exemplo a enzima  $\beta$ -Galactosidase que tem como código de classificação EC 3.2.1.23. Os números representam a classe (3, hidrolase), subclasse (2, glicosilase), sub-classe (1, glicosidase, enzimas que hidrolisam ligações O- e S-glicosil) e seu número de série dentro da sub-classe (23). A sigla “EC” é a abreviatura de *Enzyme Comission*.

Tabela 2: Classificação das enzimas em seis classes, baseado nas reações químicas que catalisam.

<b>Classe da enzima</b>	<b>Tipo de reação catalisada</b>
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução
Hidrolases	Reações de hidrólise
Transferases	Transferências de grupos funcionais
Liasas	Remoção de grupos para formar ligações duplas
Isomerases	Isomeração
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

As celulasas constituem-se como um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos promovendo sua hidrólise, sendo assim classificados como hidrolases. Essas enzimas são classificadas pela EC com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a enzima celulósica avaliada (LYND *et al.*, 2002).

### **3.4.2. Mecanismo de ação das enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal**

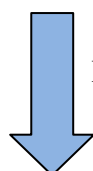
O mecanismo geral das celulasas é baseado de acordo com o local de atuação no substrato celulósico, sendo composto em três grandes grupos:

1. Endoglucanases (EC 3.2.1.4): são responsáveis por iniciar a hidrólise e clivam as ligações das regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos (LYND; ZHANG, 2002);

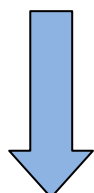
2. Exoglucanases (EC 3.2.1.91): constituídas pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs), catalisam a hidrólise nos terminais da fibra celulósica e promovem a hidrólise de oligossacarídeos formado na celobiose (LYND *et al.*, 2002). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo produto da hidrólise que é a celobiose (AWAFO, 1997).

3.  $\beta$ -Glicosidases (EC 3.2.1.21): hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002). Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas por sofrer inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

A Figura 5 representa esquematicamente a ação de cada uma delas sobre as cadeias de celulose. Cada enzima do complexo celulolítico é incapaz de hidrolisar individualmente a celulose de maneira eficiente, sendo necessário a ação complementar e sinérgica do complexo global. Quando em conjunto as celulasas apresentam um melhor rendimento que a soma dos rendimentos individuais (LYND *et al.*, 2002).



Hidrólise da Cadeia Insolúvel da Celulose



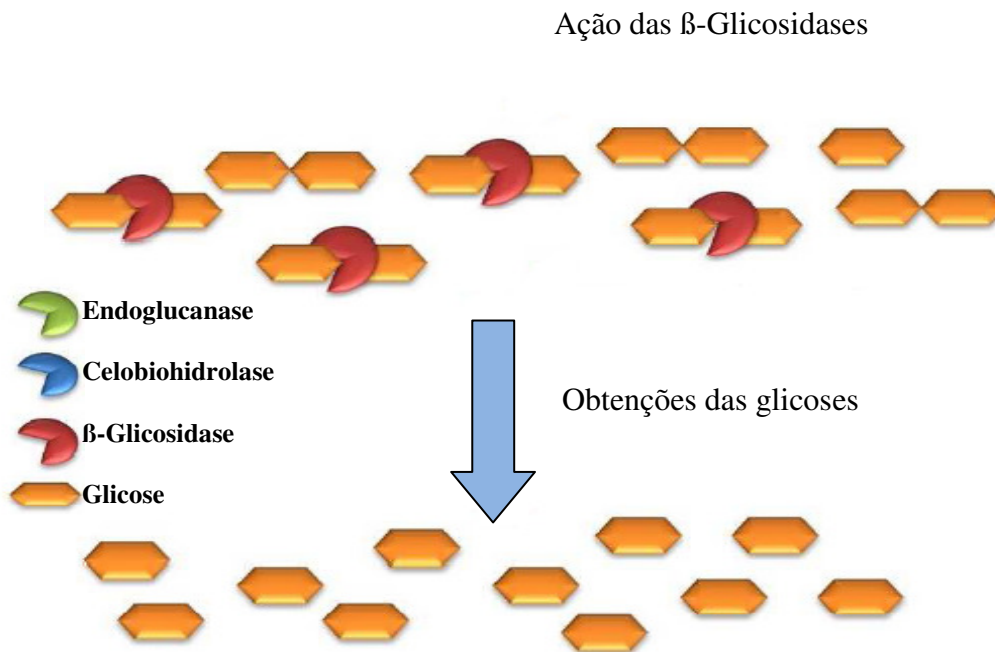


Figura 5: Hidrólise enzimática da celulose. Fonte: (ARANTES; SADDLER, 2010).

### 3.4.3. Biomassa vegetal

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza (SZENGYEL *et al.*, 2000), sendo compreendidas majoritariamente pelos resíduos agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas.

Essas biomassas vegetais são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina (11 – 30%), hemicelulose (19 – 34%) e celulose (34 - 50%), que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (JEFFRIES *et al.*, 1977).

Tais frações são responsáveis por 97-99% de toda a massa seca dos materiais. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas na forma de espirais para conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se

envolvida pela lignina cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes (SÁNCHEZ, 2009). Uma representação das estruturas é mostrada na Figura 6.

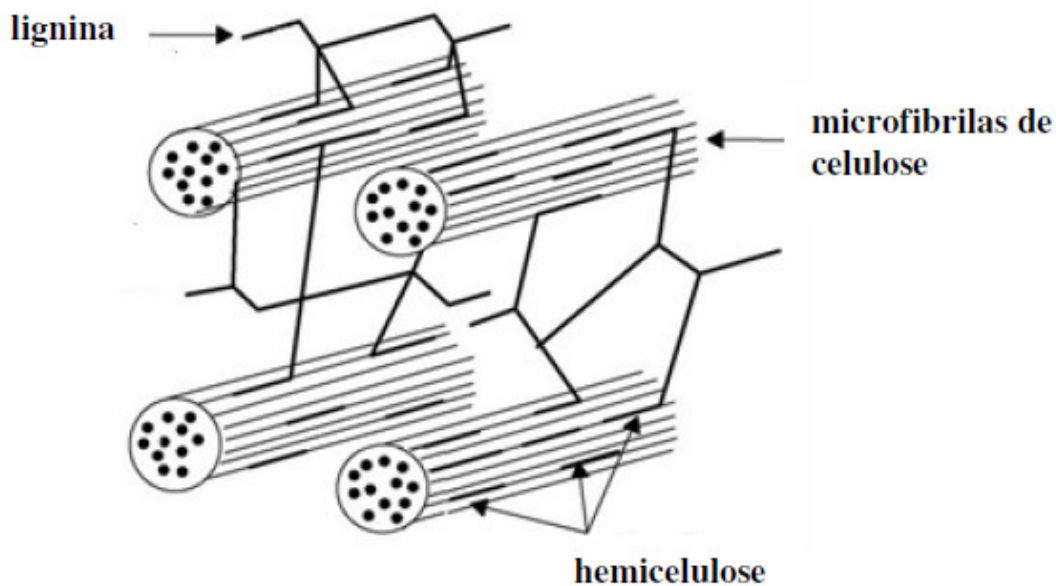


Figura 6: Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado:(GRAMINHA *et al.*, 2008).

A celulose é o principal constituinte das biomassas e também é o polímero mais abundante na biosfera (LYND *et al.*, 2002; LYND; ZHANG, 2002; SÁNCHEZ, 2009). Sua cadeia principal consiste de subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (SÁNCHEZ, 2009). Apresentam regiões altamente ordenadas chamadas de cristalina que são estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares sendo um obstáculo extra para o processo de hidrólise (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007) e por regiões menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (SUN; CHENG, 2002; ZHANG; LYND, 2004; CASTRO; PEREIRA, 2010). A Figura 7 ilustra essas regiões.

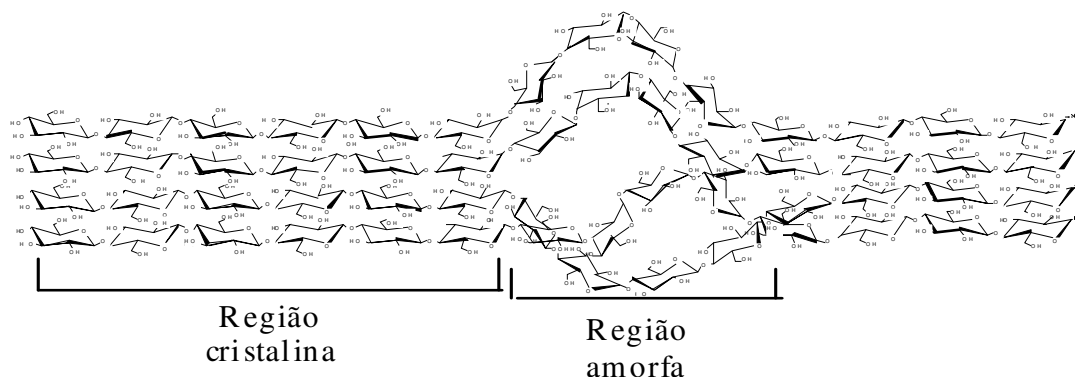


Figura 7: Estrutura da celulose destacando a região cristalina e região amorfa (SUN; CHENG, 2002).

A hemicelulose é formada por diferentes carboidratos, como pentoses (D-xilose e D-arabiose), hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose) e ácidos urônicos. Os açúcares D-xilose estão ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Elas são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, xilobiose, manobiose, galactoglucomananas, arabinoxilanas e arabinogalactosanas são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY; VRSANSKÁ; CLAEYSSENS, 1991; CASTRO; PEREIRA, 2010).

As hemiceluloses têm massa molecular mais baixa do que a celulose e, ramificações com cadeias laterais curtas o que consiste em heteropolímeros mais fáceis de serem hidrolisados. São intimamente associadas com a lignina e celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. O componente dominante da madeira dura e plantas agrícolas, como o capim e a palha são a xilana, enquanto que a de madeira mole é a glucomanana (SINGH; BATRA; SOBTI, 2001; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Sua



conformação estrutural pode ser alterada de acordo com o local em que são encontradas. Normalmente representa 40% do peso seco de resíduos lignocelulósicos. Entre as plantas anuais, madeira dura (angiospermas) e mole (gimnosperma) contém de 20-25% e 7-12% de xilana, respectivamente (SENTHILKUMAR *et al.*, 2005).

A diversidade e complexidade da estrutura da hemicelulose requerem uma diversidade equivalente de enzimas para a sua degradação, incluindo endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -D-xilosidases,  $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\alpha$ -glucuronidasas, acetil-xilana-esterase, feruloil-esterases,  $\alpha$ -Galactosidase e  $\beta$ -Galactosidase. Uma variedade dessas enzimas agem exclusivamente sobre as cadeias laterais. Com a liberação das cadeias laterais, a cadeia principal de xilana é exposta à clivagem pelas xilanasas. As  $\beta$ -xilosidases clivam xilobiose em dois monômeros de xilose, sendo que esta enzima também pode liberar xilose a partir do final da cadeia principal de xilana ou de um oligossacarídeo (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A Figura 8 ilustra os componentes estruturais encontrados em hemicelulose e as hemicelulases responsáveis por sua degradação. A xilana é a estrutura de maior prevalência na hemicelulose, sendo composto por unidades de D-xilopiranosil unidas por  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Pode ser modificado com cadeias laterais diferentes, incluindo o ácido 4-O-metil-D-glucurônico ligadas às unidades de xilose através de ligações  $\alpha$ -1,2-glicosídicas e ácido acético que esterifica as unidades dexilose nas posições O-2 ou O-3. Em xilanas não-acetilados, além de ácidos urônicos, há resíduos de L-arabinofuranose que se ligam à cadeia principal, por meio das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3. Os tipos de abundância e articulação dessas substituições variam entre xilanas de diferentes fontes.  $\beta$ -Manobiose é formada por polímeros unidos ligações  $\beta$ -1,4 formados por manose e glicose distribuídos aleatoriamente, sendo componentes importantes das hemiceluloses. A Galactoglucomana contém cadeias laterais unidas por  $\alpha$ -1,6

galactose, e os O-2 e O-3 das unidades de manose podem ser substituído com grupos acetato. Arabinoxilana e Arabinogalactosanas geralmente são também classificadas como hemiceluloses. A arabinoxilana apresenta como componente principal da cadeia ligações  $\alpha$ -1,5 de unidades L-arabinofuranosil, mas também há ligações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 unidos a L-arabinofuranosídeos. A estrutura das Arabinogalactosanas é formada por galactoses unidos por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

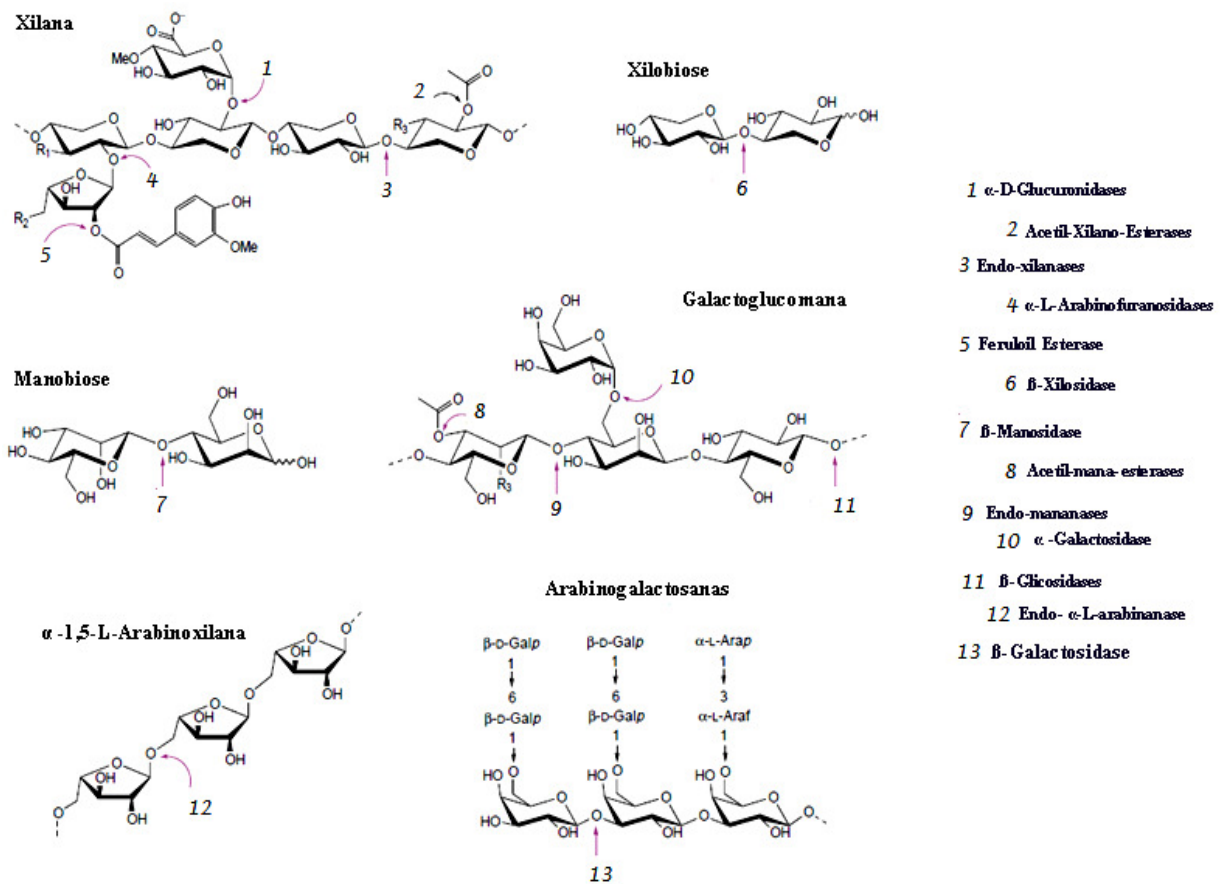


Figura 8: Componentes básicos estruturais encontradas em hemicelulose e as hemicelulases responsável por sua degradação.

A lignina representa 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode chegar até 40% do seu peso seco (CASTRO; PEREIRA, 2010). É uma macromolécula amorfa, insolúvel em água, de natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura

de natureza aromática constituída por compostos fenólicos, com 28 anéis fenólicos, na maioria dos casos chamados de compostos polifenólicos (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990), como por exemplo a acetovanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzaldeído, ácido siríngico, ácido vanílico, siringaldeído, hidroquinona e vanilina. O principal função da lignina é dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque de microrganismos e estresse oxidativo (BONINI *et al.*, 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A estrutura hipotética da lignina está ilustrada na Figura 9.

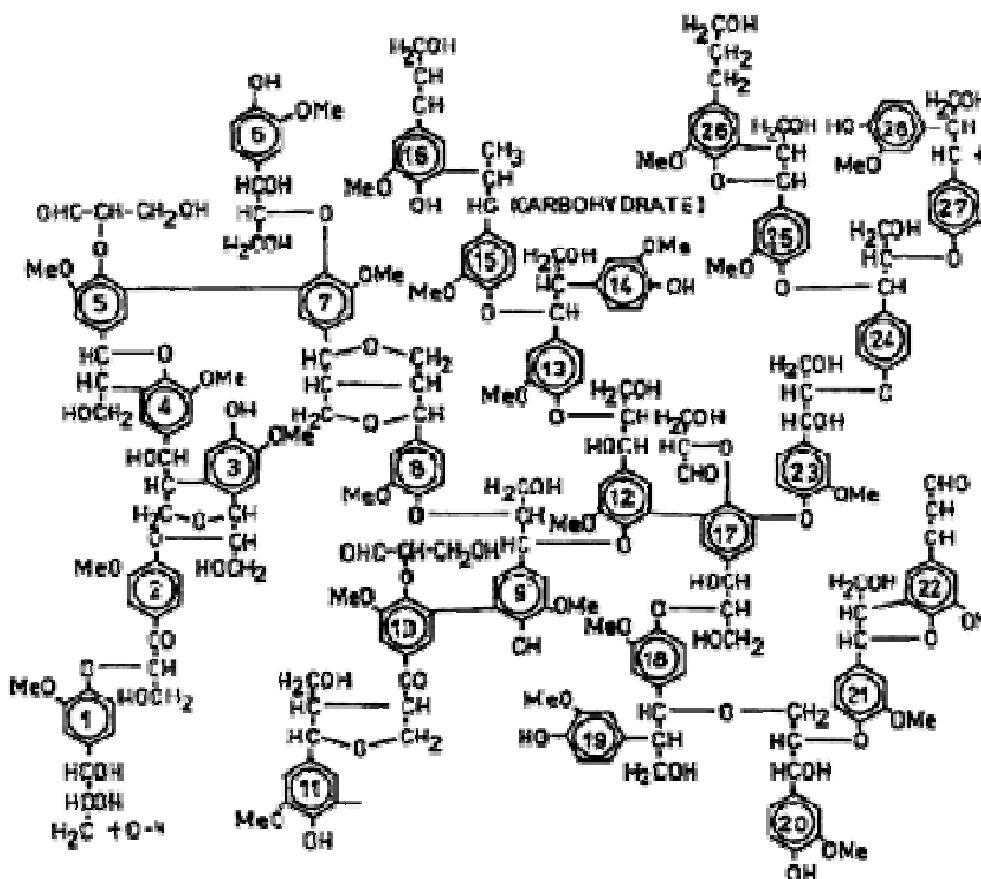


Figura 9: Estrutura hipotética da lignina (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

As principais enzimas ligninolíticas fúngicas são manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), que catalisam uma variedade de reações

oxidativas que são dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e lacases (EC 1.10.3.1) que oxidam compostos fenólicos e reduzem o oxigênio molecular da água (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

Alguns fungos produzem todas essas enzimas, outros produzem uma ou duas destas (DRITSA *et al.*, 2007). Porém, mesmo com sua habilidade proficiente para degradar lignina, os fungos que decompõem a madeira são incapazes de utilizar a lignina como fonte de carbono e energia e a despolimerização da lignina fornecem acesso para a degradação da celulose e hemicelulose por outros microrganismos (LEVASSEUR *et al.*, 2008). A lignina tem sido usada para a produção de energia pelo processo de combustão ou para a conversão em outros bioprodutos de interesse comercial (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A Tabela 3 mostra os componentes do complexo enzimático produzidos pelos fungos do gênero *Aspergillus* ssp. capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos.

Tabela 3: Complexos enzimáticos produzidos por fungos capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos (SHALLOM; SHOHAM, 2003; GRAMINHA *et al.*, 2008).

<b>Celulases</b>	E.C
Endoglucanase	3.2.1.4
1,4-β-celobiohidrolase	3.2.1.91
β-glicosidase	3.2.1.21
<b>Hemicelulases</b>	
β-Manosidase	3.2.1.152
β-Xylosidase	3.2.1.37
Feruloil Esterase	3.1.1.73
α-L-Arabinofuranosidase	3.2.1.55
α-D-Glucuronidases	3.2.1.139
Acetil-xilano esterases	3.1.1.72
Endo-Xylanase	3.2.1.8
Acetil-mana-esterases	3.1.1.6
α-Galactosidase	3.2.1.22
Endo-mananases	3.2.1.78
Endo-α-L-arabinase	3.2.1.99
β-Galactosidase	3.2.1.23
<b>Ligninases</b>	
Lacase	1.10.3.2

### **3.4.4. Resíduos de Biomassa Vegetal**

Um das principais atividades econômicas no Brasil é a agropecuária que gera abundante quantidade de resíduos e subprodutos, tanto agrícolas como agroindustriais (GRAMINHA *et al.*, 2008). Infelizmente estes materiais são pouco aproveitados, parte deles é utilizada para a geração de energia elétrica, enquanto a outra parte é queimada ou simplesmente fica disponível no campo tornando-se muitas vezes um problema ambiental.

A conversão desses resíduos em biomassas ou produtos de valor comercial poderá contribuir para a remoção de poluentes ambientais e trazer grandes benefícios à economia (SUKUMARAN *et al.*, 2010). Desta forma, há duas possibilidades promissoras de utilização dos resíduos que vem sendo muito pesquisada nos últimos anos.

Uma delas é a completa conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (RESHAMWALA; SHAWKY; DALE, 1995; BALLESTEROS *et al.*, 2002; LAWFORDE; ROUSSEAU, 2003; HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; SINGHANIA *et al.*, 2010). Para tal aplicação é necessário a utilização de resíduos como, por exemplo, o bagaço de cana de açúcar gerado abundantemente no Brasil com produção anual de 380 x10<sup>6</sup> toneladas (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Existe, portanto, uma forte tendência para que cada usina produza também as enzimas para obtenção de etanol derivado de palha e bagaço de cana (ADSUL *et al.*, 2005). Entretanto, ainda não existem processos que produzam enzimas a um custo competitivo.

### **3.5. Fermentação em Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm) na produção de enzimas microbianas**

Grande parte dos esforços para a redução dos preços das enzimas tem como foco principal a melhoria dos processos biotecnológicos, por isso os processos fermentativos são um vasto campo a se conhecer e explorar. Tradicionalmente, as celulases de aplicação comercial são obtidas por meio da fermentação submersa (FSm) enquanto a fermentação em estado sólido (FES) tem sido utilizada para a produção de enzimas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2001).

A utilização de inúmeros materiais orgânicos, como resíduos agrícolas, florestais e da indústria alimentícia, tem sido proposta como substrato para a FES e FSm (KALOGERIS *et al.*, 2003). Esses resíduos promovem, ao mesmo tempo, um substrato alternativo e barato para a fermentação e a redução dos problemas ambientais causados pela sua disposição aleatória no meio ambiente (COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2001).

A literatura relata uma série de definições para o termo fermentação em estado sólido (FES), algumas delas são descritas a seguir.

Esse processo envolve toda fermentação que ocorre sob substrato sólido sendo esse nutricionalmente inerte (NIGAM; PANDEY, 2009). Para Oriol e colaboradores, 1988, Ashok, 1992, Rodríguez e colaboradores, 2001 e Singhanía e colaboradores, 2010 corroboram que esse tipo de fermentação tem como principal característica a ausência de líquido entre as partículas do substrato em que estão inseridos os microrganismos que participam do processo (ORIOLO *et al.*, 1988; ASHOK, 1992; COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2001; SINGHANIA *et al.*, 2010). Sendo contrária a

idéia defendida por Lima e colaboradores, 2008 a água livre indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (LIMA *et al.*, 2008).

A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes (DURAND *et al.*, 1993).

De acordo com Auria e colaboradores, 1993 a FES é um processo com um sistema de quatro fases (AURIA *et al.*, 1993). A fase contínua é ar ou de outra mistura de gases que normalmente flui através de uma camada de sólidos. Este sólido é composto de uma parte insolúvel em água que contém uma solução aquosa de nutrientes. Esta solução é fortemente absorvida dentro da matriz de apoio insolúvel, e a quarta fase é o microrganismo que cresce no interior do suporte e/ou em sua superfície e/ou no interior do espaço livre. O menor nível de umidade em que FES pode ocorrer é de aproximadamente 12%, pois abaixo deste nível todas as atividades biológicas cessam. O limite superior é em função da capacidade de absorção e, portanto, teor de umidade, que varia de acordo sobre a natureza do substrato (KRISHNA, 2005)

As principais vantagens desta técnica estão relacionadas com: a simplicidade, o baixo custo, a alta produtividade, a alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia (ASHOK, 1992; MITCHELL *et al.*, 2000; SINGHANIA *et al.*, 2011). Como desvantagens podem ser destacadas: as dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a perda de produto durante o processo de extração.

O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição (ASHOK,

1992; SINGHANIA *et al.*, 2011), ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (ASHOK, 1992; COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2001).

A definição para FSm revela praticamente um único ponto de vista, já que a água chega a constituir cerca de 90-99% da massa total do material a ser fermentado. Esse processo apresenta como vantagens principais: o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle de parâmetros físicos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e maior fonte de contaminação para outros microrganismos, como bactérias (MITCHELL *et al.*, 2000; SINGHANIA *et al.*, 2010).

A FES vem sendo mais utilizada nas últimas décadas, com a possibilidade de integração a outros processos industriais, pois pode ser realizada em condições semi-estéreis, além de poder utilizar resíduos de outras cadeias industriais como substratos indutores de metabólitos com valor agregado (ELISASHVILI *et al.*, 2009). Todavia, vantagens como controle, monitoramento eficientes e maior reprodutibilidade são ainda associadas com a FSm (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Os fungos filamentosos necessitam de um habitat úmido para seu crescimento. A FES pode apresentar uma umidade mais baixa que a ideal por isso tende a reduzir a nutrição por difusão, limitando assim, o crescimento microbiano e a estabilidade da enzima. Por outro lado na FSm que há níveis elevados de umidade podem levar a aglomeração das partículas, limitando a transferência de gás e aumentando a competição por bactérias (KRISHNA, 2005). A Tabela 4 mostra a comparação entre os dois processos de fermentação.



Tabela 4: Comparação entre os métodos de fermentação, FES e FSm. Fonte: (ORIOLO *et al.*, 1988).

<b>Fator</b>	<b>FSm</b>	<b>FES</b>
Substratos	Resíduos Industriais (Solúveis)	Resíduos Industriais (Polímeros insolúveis como pectina e lignina)
Condições Assépticas	Autoclave	Autoclave
Água	Volumes elevados	Consumo limitado
Efluentes	Descartados	Não Descartados
Controle da Temperatura	Fácil	Difícil, devido a impactação do substrato
Aeração	Difícil, pois necessita de rotação	Fácil, sendo o sistema estático
Controle de pH	Fácil	Difícil, sendo determinado pelos tampões
Agitação Mecânica	Boa homogenização	Sistema estático, sem homogenização
Produção em alta escala	Equipamentos industriais disponíveis	Necessita de mais pesquisas para design e desenvolvimento de novos equipamentos
Inoculação	Esporos ou Micélios	Esporos
Contaminação	Bactérias	Fungos
Consumo de energia	Alto	Baixo
Equipamentos	Grandes equipamentos e caros para aquisição	Equipamentos pequenos e mais baratos para aquisição
Efluentes/Poluição	Grande volume de efluentes poluidores	Baixos volumes de efluentes poluidores
Concentração substrato (g/L)	30-80 g/L	100-300 g/L

Para contornar o problema da baixa umidade, há a suplementação de sais minerais basal para a produção de celulase em FES dessa forma umedece o substrato.

Tengerdy e Szakacs, 2003 compararam a produção de celulase em FSm e sistemas de FES e indicaram que houve uma redução de 10 vezes no custo da produção quando a FES é utilizada (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

Tanto o processo de FES quanto o de FSm apresentam características importantes, as quais devem ser levadas em conta no momento da escolha, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser utilizado.

### 3.6. As hidrolases de carboidratos ou glicosidases

O banco de dados, *Carbohydrate Active Enzyme database* (<http://www.cazy.org/>) (CANTAREL et al., 1991), apresenta em seu registro de mais de 3000 glicosil hidrolases. Devido a esse grande número de informações implicou em diferentes classificações. Primeiramente, as glicosidases foram agrupadas de acordo com sua capacidade de hidrolisar substratos similares, por exemplo, enzimas que clivam a galactose presente na lactose, no PNPG ( $\rho$ -nitrofenilgalactose) ou OPNG (orto-nitrofenilgalactose) ou em XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactoside) foram classificadas como as  $\beta$ -Galactosidases. Entretanto esse tipo de classificação não é adequado quando uma enzima atua sobre diferentes tipos de substratos.

Em vista disso, um segundo tipo de divisão foi proposto baseado nos dois mecanismos de ação catalítica destas enzimas. Na primeira classe estão compreendidas as enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica com inversão da configuração anomérica e na segunda classe estão aquelas que agem sem modificar essa configuração. Contudo, ambos os mecanismos utilizam um par de resíduos catalíticos: um doador de próton e um nucleófilo.

Em ambas as classes desses mecanismos, o doador de prótons encontra-se a uma distância que lhe permite fazer uma ligação de hidrogênio como o oxigênio da ligação glicosídica. Nas enzimas inversoras da configuração anomérica, o carbono anomérico é atacado pelo átomo de oxigênio da molécula de água que se posiciona no interior do sítio ativo (Figura 10). Enquanto que na segunda classe, as enzimas retentoras, o carbono anomérico é atacado pelo próprio grupo nucleófilo da enzima (Figura 11), para que isso ocorra é necessária uma distância de 10 Å e uma distância entre os dois grupos catalíticos de 5,5 Å, para a enzima inversora e para a enzima retentora, respectivamente (BOURNE; HENRISSAT, 2001).

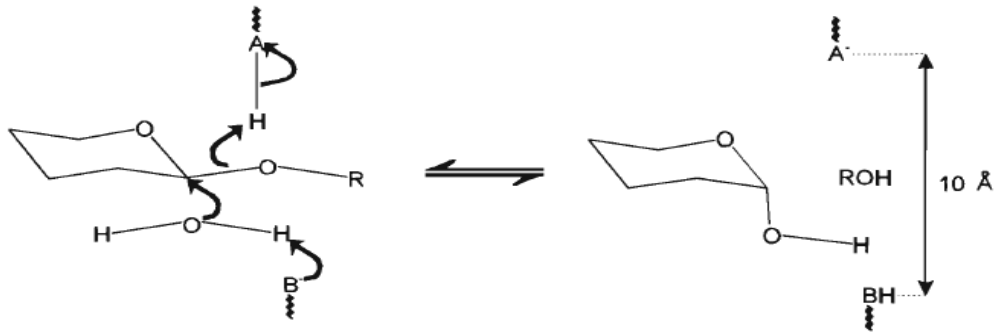


Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de catálise das enzimas inversoras.

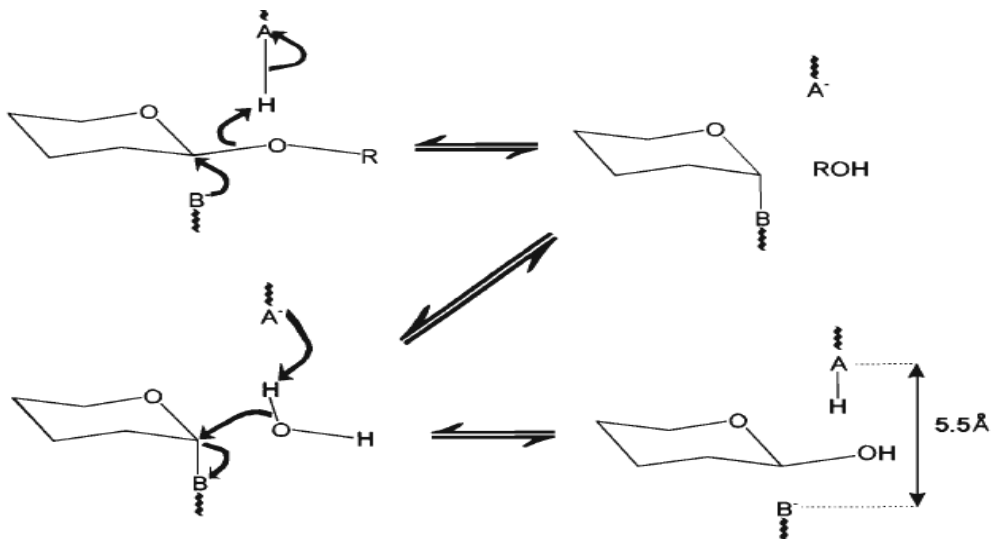


Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de catálise das enzimas retentoras (BOURNE; HENRISSAT, 2001).

Em 1991, outra classificação foi elaborada para as glicosidases, baseada na similariedade entre as seqüências de aminoácidos das enzimas (HENRISSAT, 1991). As glicosil hidrolases (GHs) estão classificadas em superfamílias chamadas de clãs. Essa classificação é baseada na análise das estruturas das proteínas (HENRISSAT; BAIROCH, 1996). Esse sistema também identifica possíveis domínios estruturais, definindo assim conexões evolutivas e sugerindo mecanismos de reação para a GHs.

Baseados nesses critérios, as enzimas que exibem atividade  $\beta$ -Galactosidase (E.C.3.2.1.23) são divididos em quatro famílias: GH1, GH2, GH35 e GH42. Dentre estas, a GH2 é mais estudada e inclui as  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus*, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli* e *Sulfolobus solfataricus* (OHTSU *et al.*, 1998; HOLMES; DYALL-SMITH, 2000; SHERIDAN; BRENCHLEY, 2000; HIDAKA *et al.*, 2002).

As estruturas das GHs podem ser agrupadas em três tipos morfológicos segundo seus mecanismos de ação (Figura 12). O primeiro tipo é conhecido como bolsão (*pocket*). Os membros desta classe são geralmente exo-hidrolases cujo bolsão tem a capacidade de reconhecer o monossacarídeo terminal de um oligossacarídeo.

O segundo tipo é uma conformação aberta de sulco na superfície da proteína, o que permite a ligação de um polissacarídeo; os membros desta classe são tipicamente endo-hidrolases. A terceira classe se forma pela presença de um *loop* fechando o sulco da classe anterior, o que cria uma estrutura em forma de túnel. Esta morfologia é presente em hidrolases que têm como substratos longas cadeias polipeptídicas (HENRISSAT; BAIROCH, 1996).

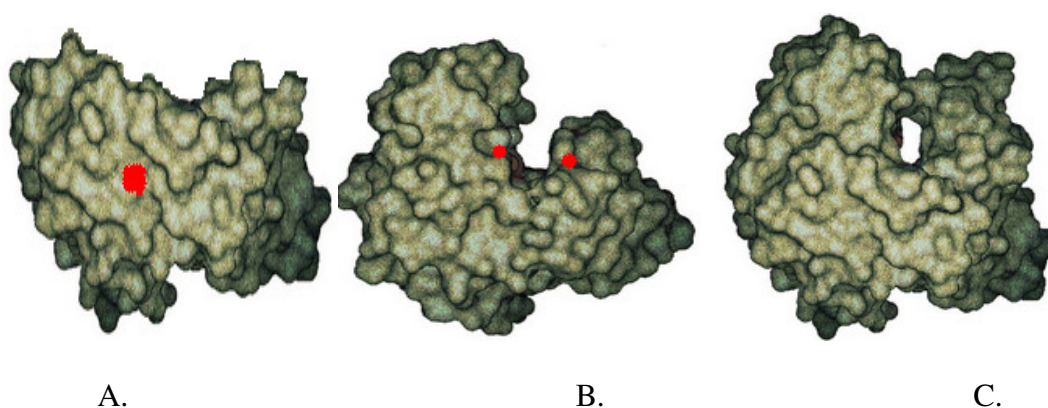


Figura 12: Morfologia geral das Glicosil hidrolases, os resíduos catalíticos se apresentam em vermelho. A. Sítio ativo tipo bolsão (glucoamilase de *Aspergillus awamori*). B. Sítio ativo tipo sulco (endoglucanase E2 de *Thermomonospora fusca*). C. Sítio ativo tipo túnel (Celobiohidrolase II de *Trichoderma reesei*). Figura adaptada (HENRISSAT; BAIROCH, 1996).

### 3.7. $\beta$ -Galactosidase

A enzima  $\beta$ -D-Galactosideo-Galactohidrolase (E.C 3.2.1.23), mais conhecida como  $\beta$ -Galactosidase ou lactase (SHUKLA; WIERZBICKI, 1975) pertence ao grupo das conversoras de sacarídeos da família das hidrolases e é responsável pela hidrólise do resíduo terminal  $\beta$ -Galactopiranosil da lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc), dando origem a uma mistura isomolecular de glicose e galactose (DE SANTIAGO; FERNÁNDEZ-MAYORALAS; GARCÍA-JUNCEDA, 2000) (Figura 13).

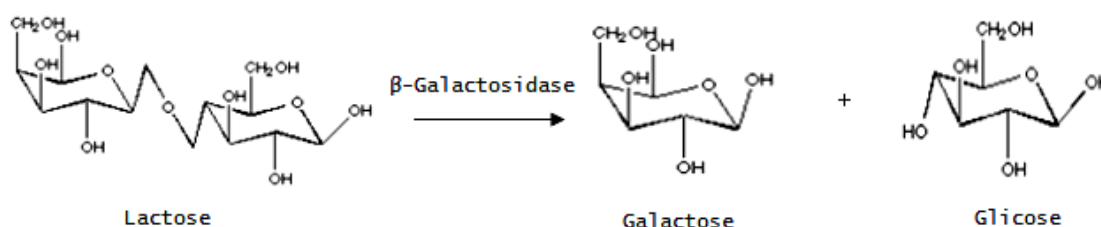


Figura 13: Ação da  $\beta$ -Galactosidase.

Os produtos da hidrólise da  $\beta$ -galactosidase podem inibir sua ação. Geralmente a galactose e a glicose são inibidores competitivos e não competitivos, respectivamente, sendo a inibição por glicose muito menor que a inibição por galactose (KIM; LIM; KIM, 1997).

#### 3.7.1. Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase

As  $\beta$ -galactosidasas são obtidas a partir de uma ampla variedade de fontes, tais como microrganismos (Tabela 5), plantas e animais. Nos vegetais, são encontradas particularmente entre amêndoas, pêsego, damasco, maçã. Em animais são localizadas

em órgãos, como intestino, cérebro, testículos e placenta, e também podem ser produzidas por grande quantidade de microrganismos filamentosos, bactérias e leveduras (DE SANTIAGO; FERNÁNDEZ-MAYORALAS; GARCÍA-JUNCEDA, 2000).

Os microrganismos oferecem uma série de vantagens, como facilidade de manuseio, altos níveis de produção e rendimento da enzima, em relação a outras fontes disponíveis (FINOCCHIARO; OLSON; RICHARDSON *et al.*, 1980; RAYMOND, 1998).

Tabela 5: Microrganismos produtores de  $\beta$ -galactosidases.

	<b>Microrganismos</b>
<b>Fungos</b>	<i>Asternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i>
<b>Filamentosos</b>	<i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carbonarius</i> <i>Aurebasidium pullulans</i> <i>Curvularia inaequalis</i> <i>Fusarium moniliforma</i> , <i>F. Oxysporum</i> <i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Paecilomyces varioti</i> <i>Penicillium conescens</i> , <i>P. Chrysogenum</i> <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Scopulariopsis</i> sp. <i>Streptomyces violaceus</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Trichoderma ressei</i>
<b>Leveduras</b>	<i>Bullera singularis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. fragilis</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. Marxianus</i>
<b>Bactérias</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> <i>Bacteroides polypragmatus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. Infantis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. Thermosulfurogens</i> <i>Corynebacterium murisepticum</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloaceae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> <i>Leuconostoc citrovorum</i> <i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. Pento</i> <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas haloplanktis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i> <i>Thermoanaerobacter</i> sp. <i>Thermus rubus</i> , <i>T. aquaticus</i> , <i>T. thermophilus</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Xanthomonas campestris</i>

Fontes: (BERGER; LEE; LACROIX, 1995; RAYMOND, 1998; HOYOUX *et al.*, 2001; NAGY *et al.*, 2001; CHO; SHIN; BUCKE, 2003; EL-GINDY, 2003).

Embora o microrganismo mais estudado pela produção de  $\beta$ -galactosidase seja a *Escherichia coli*, possíveis fatores tóxicos associados a coliformes tornam improvável o

uso desta enzima em processos alimentícios (SANTOS; LADERO; GARCIA-OCHOA, 1998), não obstante sua importância para a compreensão do mecanismo catalítico dessa enzima.

Assim, de acordo com a legislação brasileira, por meio da Resolução RDC nº 205/206 (BRASIL, 2006), a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces* sp.

Tais espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) ([www.fda.gov.br](http://www.fda.gov.br)), sendo esse um importante critério para aplicações alimentícias (MLICHOVA; ROSENBERG, 2006).

Especialmente, os fungos do gênero *Aspergillus* sp (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) são ótimos produtores da enzima  $\beta$ -Galactosidase e essas enzimas são liberadas para o meio extracelular, apresentando uma vantagem adicional para uso industrial (MACRIS, 1981; NEVALAINEN, 1981).

### **3.7.2. Caracterização da $\beta$ -galactosidase**

As diferentes propriedades de  $\beta$ -galactosidases dependem de sua origem. A Tabela 6 apresenta um quadro comparativo das diferentes propriedades de algumas  $\beta$ -Galactosidases de fungos e leveduras.

Tabela 6: Propriedades de algumas  $\beta$ -Galactosidases dos microrganismos produtores.



	Fonte	PM (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Km (mM)			Referência
					ONPG	PNPG	Lactose	
<b>Fungos</b>								
<b>Filamentosos</b>	<i>Aspergillus niger</i> van Tiegh	DNR	DNR	DNR	DNR	2,21	DNR	(HU et al., 2010)
	<i>Aspergillus niger</i> N400(CBS 120,49)	DNR	4	60-65	DNR	DNR	DNR	(MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER)
	<i>Aspergillus niger</i> GB Fermentation Industries (Des Plaines, IL)	117	4,5	37	2,2	DNR	DNR	(GREENBERG; MAHONEY, 1981)
		I-124	2,5-4,0	30	2,35	DNR	85	
		II-150	2,5-4,0	37	2,36	DNR	105	
	<i>Aspergillus niger</i> Rapidase Company (59113-Seclin, França)	III-173	2,5-4,0	37	2,38	DNR	125	(WIDMER; LEUBA, 1979).
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	DNR	4,5	DNR	DNR	DNR	DNR	(EL-GINDY, 2003).
	<i>Aspergillus carbonarius</i> ATCC 6276	110	DNR	55	1,6	DNR	83	(O'CONNELL; WALSH, 2008).
	<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5	60	0,77	DNR	50	(PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979)
	<i>Aspergillus oryzae</i> RT 102	DNR	4,5	46	0,0072	DNR	0,018	(TANAKA et al., 1975)
	<i>Aspergillus oryzae</i> H-26-10-7	113	DNR	DNR	DNR	DNR	DNR	(TODOVORA-BALVAY et al., 2006)
	<i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237	66	4	30	1,81	DNR	DNR	(NAGY et al., 2001)
<i>Penicillium canescens</i>	120	DNR	DNR	DNR	DNR	DNR	(BUDRIENE et al., 2005)	
<i>Rhizomucor sp</i>	120	4,5	60	1,32	0,66	50	(SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999)	
<b>Leveduras</b>								
	<i>Bullera singularis</i> KCTC 7534	53	DNR	DNR	DNR	DNR	580	(CHO; SHIN; BUCKE, 2003)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	DNR	6,5-7,0	30-35	DNR	DNR	DNR	(MLICHOVA; ROSENBERG, 2006)
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	DNR	6,6	30-36	DNR	DNR	DNR	(MLICHOVA; ROSENBERG, 2006)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	75-80	6,7-7,2	DNR	DNR	4,8	11,3	(FISCHER; SCHECKERMANN; WAGNER)
<b>Bactérias</b>								
	<i>Escherichia coli</i>	DNR	7,2	40	DNR	DNR	DNR	(MLICHOVA; ROSENBERG, 2006)
*DNR	<i>Escherichia coli</i> CSH-36	410	DNR	DNR	1	DNR	DNR	(AYYILDIZ, 1999)
Dados	<i>Lactobacillus thermophilus</i>	DNR	6,2	55	DNR	DNR	DNR	(MLICHOVA; ROSENBERG, 2006)
não	<i>Escherichia coli</i>	DNR	DNR	DNR	0,095	0,445	3,85	(WEBER; SUND; WALLENFLES, 1964)
Revelados	<i>Bacillus circulans</i>	DNR	6	65	DNR	DNR	DNR	(MLICHOVA; ROSENBERG, 2006)

A literatura revela que as temperaturas ótimas das  $\beta$ -Galactosidases produzidas por fungos, leveduras e bactérias estão majoritariamente compreendidas entre 50°C e 60°C (Tabela 6).

Em relação a afinidade da enzima pelo substrato, em geral as  $\beta$ -Galactosidases fungicas apresentam uma maior especificidade pelos substratos sintéticos tais como ONPG e PNPG a lactose (Tabela 6).

A Tabela 6 permite também observar que as lactases fúngicas possuem geralmente um pH ótimo numa faixa ácida (2,5-4,5), enquanto que o pH ótimo de atuação de lactases provenientes de leveduras e bactérias está numa região mais neutra, entre 6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente.

As diferentes condições de pH ótimo permitem selecionar a lactase mais apropriada para uma aplicação específica. Assim, lactases fúngicas, são mais adequadas para hidrólise de soro ácido, enquanto lactases de leveduras e bactérias são mais apropriadas para a hidrólise do soro doce e do leite (GEKAS; LÓPES-LEIVA, 1985).

### **3.8. Técnicas de Purificação de proteínas**

As técnicas desenvolvidas para a purificação de biomoléculas dependem da natureza e das características das amostras, assim como o grau de pureza desejado no final do produto (KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982).

A precipitação de proteínas mediante a adição de reagentes ou de soluções constitui uma técnica simples e rápida para a concentração de proteínas (TEOTIA; KHARE; GUPTA, 2001), sendo muito empregada em indústrias como fase inicial do processo de purificação, pois reduz em grande parte o volume reacional para estágios posteriores (GLATZ, 1998).

Nos sistemas de separação por membrana, o fluido contendo dois ou mais componentes é colocado em contato com uma membrana que permite a passagem seletiva de alguns componentes mais rápido do que os outros, as centrífugas também auxiliam nesse processo. As vantagens desse método incluem agilidade na separação das proteínas e baixo custo na operação (WESTFALIA, 2011).

Os processos da tecnologia de membrana são divididos em: osmose reversa, ultrafiltração, microfiltração e diálise.

As membranas empregadas pela osmose reversa são caracterizadas pelo tamanho de corte de massa molecular de, aproximadamente, 0,1 kDa, e esse processo envolve uma pressão 5 a 10 vezes maior que na ultrafiltração, pois nessa técnica a faixa de pressão varia de 70 a 700 kPa e o tamanho dos poros de 0,001 a 0,02  $\mu\text{m}$ , com corte de 1 a 8 kDa (SINGH; HELDMAN, 1993). As membranas de microfiltração apresentam poros que variam de 0,2-2,0  $\mu\text{m}$ , podendo separar de forma seletiva as partículas com massa molecular acima de 200 kDa (MOSHE, 1995). A diálise consiste no movimento do solvente através de uma membrana semi-permeável devido a diferenças na pressão osmótica. Um dos lados do sistema, geralmente, contém uma concentração maior de biomoléculas e íons e essa pressão faz com que o solvente passe para o lado mais concentrado, buscando equilibrá-lo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

As técnicas de separações cromatográficas consistem na partição do soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Normalmente, a fase estacionária é sólida, sendo formada por uma matriz de partículas empacotadas em uma coluna de forma tubular. A fase móvel que contém a mistura de componentes são separados através da coluna. A solução que contém proteínas é adicionada no topo da coluna, de modo a percolar a matriz sólida em uma banda em contínua expansão pela fase móvel (DORSEY *et al.*, 1994). Separações com altas resoluções podem ser obtidas pela mudança gradual na

fase móvel, mediante o emprego de eluição em gradiente, pois as proteínas individuais podem migrar mais rapidamente ou lentamente, dependendo de suas propriedades (NIVEN; SCURLOCK, 1993).

Na cromatografia de troca iônica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Foi constatado que esse é o método de purificação de proteínas mais empregado quando comparado com outros métodos cromatográficos (RASSI; LEE; HORVÁTH, 1990). Além disso, é utilizado com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica para o escalonamento dos processos de isolamento de proteínas (GERBERDING; BYERS, 1998).

A cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como gel filtração, permite a separação das moléculas de acordo com seu tamanho efetivo (MAA; HORVÁTH, 1988). A matriz da coluna é um polímero que contém ligações cruzadas com poros de determinado tamanho. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros apresentando maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel (IRVINE, 1997; COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Essa técnica, além da separação e purificação das proteínas, permite a dessalinização e estimativa da massa molecular das mesmas.

A cromatografia de afinidade separa as proteínas por suas especificidades de ligações. As proteínas retidas nas colunas são aquelas que se ligam especificamente a um ligante que, por sua vez, está ligado à matriz (NIVEN; SCURLOCK, 1993). Após a eliminação por lavagem das proteínas que não se ligaram a matriz, as proteínas de interesse são eluídas por meio de uma solução que contém um ligante livre. (LEGHINGER, 2000).

A definição de um novo protocolo de purificação requer um exaustivo esforço para selecionar as interações entre as matrizes das fases estacionárias e a proteína. Após essas determinações é que são possíveis as construções de protocolos para a obtenção da enzima pura, como foi realizado nesse projeto.

### **3.8.1. Purificação da $\beta$ -galactosidase**

O estímulo dado pela aplicação tecnológica da enzima levou vários laboratórios a investirem em estratégias para a sua purificação. Para o uso comercial, a pureza é um fator de estabilidade. Purificações a partir de um único passo estão disponíveis sendo rápidas, eficientes e mais baratas que outros processos que envolvem mais etapas, porém a maioria dos protocolos de purificação envolvem um série de fases convenientemente ordenadas, visando sempre a obtenção máxima de rendimento e pureza da proteína de interesse.

A pureza dos preparos enzimáticos costuma ser baixa, sendo que na maioria dos casos são formadas por extratos concentrados, estabilizados e normalizados (GUL-GUVEN *et al.*, 2007). Várias  $\beta$ -galactosidases foram purificadas, seqüenciadas e extensivamente caracterizadas. Algumas já foram clonadas e expressas em outros hospedeiros, entretanto, os produtos requerem muitos testes antes de utilizá-las comercialmente. Conseqüentemente, as enzimas disponíveis para a comercialização são derivadas de fontes seguras (RAYMOND, 1998), a Tabela 7 mostra os microrganismos produtores dessa enzima e os fornecedores das preparações comerciais.

Tabela 7: Microrganismos produtores de  $\beta$ -galactosidase e os fornecedores das preparações comerciais (RAYMOND, 1998).

Fonte	Nome comercial	Fornecedor
<b>Bactérias</b>	<i>Bacillus</i> sp	Novozym 231
	<i>Escherichia coli</i>	$\beta$ -Galactosidase
<b>Leveduras</b>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactase
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	$\beta$ -Galactosidase
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	$\beta$ -Galactosidase
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme
	<i>Kluyveromyces</i> sp.	Lactase NL
<b>Fungos</b>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral lactase
	<i>Aspergillus niger</i>	Sumylact
	<i>Aspergillus niger</i>	Lactase
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Biolactase
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lactase 2214C
	<i>Aspergillus oryzae</i>	$\beta$ -Galactosidase

Poucos protocolos de produção e purificação desta enzima são apresentados na literatura com resultados que lhes apontam a eficiência. Pessela e colaboradores (2004) purificou a  $\beta$ -Galactosidase, do microrganismo *Thermus* sp. cepa T2, expresso em bactéria *Escherichia coli*, em uma única etapa utilizando uma resina de afinidade (PESELA *et al.* 2004).

A produção e purificação da  $\beta$ -Galactosidase à partir de diferentes fontes de fungos foram realizadas por uma ampla variedade de técnicas de purificação. Três isoformas de  $\beta$ -Galactosidase foram produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, por meio de colunas cromatográficas com propriedades de troca iônica e afinidade (WIDMER; LEUBA, 1979).

Manzanares e colaboradores (1998) também purificaram a  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*, cepa N400, porém utilizaram cinco diferentes colunas cromatográficas com propriedades de troca iônicas e obtiveram um fator de purificação de 159 e o rendimento final da purificação foi de 21 % (MANZANARES; DE

GRAAFF; VISSER, 1998). Outro trabalho envolveu a purificação da  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger*, por meio do uso de duas técnicas cromatográficas com propriedades diferentes, como troca iônica e exclusão de tamanho, sendo que a fase inicial da purificação foi realizada por meio da precipitação das proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio (SYKES *et al.*, 1983).

As técnicas de gel filtração e troca iônica foram utilizadas para a purificação da  $\beta$ -Galactosidase de *Saccharomyces lactis* (BIERMANN; GLANTZ, 1968). A mesma forma de purificação foi aplicada com quatro isozimas da  $\beta$ -Galactosidase da levedura *Saccharomyces lactis*, devido à adição de lactose que ocorreu após 24h de cultivo e obteve em 30h de fermentação, que diferenciavam nos pesos moleculares, comportamento cinéticos, ponto isoelétrico e resposta ao pH (MBUYI-KALALA; SCHNEK; LEONIS, 1988).

O rendimento da purificação da  $\beta$ -Galactosidase da bactéria *Streptococcus salivarius* foi de 41%, sendo que a atividade específica foi de 592 U/mg à 37°C (CHANG; MAHONEY, 1989) utilizando duas técnicas: de gel filtração e troca iônica. Essa mesma enzima foi purificada de *Pseudoalteromonas* sp. isolado da Antártica, em um único passo, por meio da técnica cromatográfica de troca iônica (HATTI-KAUL, 2002).

A riqueza de dados sobre as estratégias de isolamento na literatura nas mais diversas condições (LI *et al.*, 2001; MATEO *et al.*, 2001), refletem a diversidade de fontes, modo de produção e as diferenças entre as amostras.

### **3.9. Aplicações da enzima $\beta$ -Galactosidase**

A lactose é um dissacarídeo que tende a absorver sabores e odores e causar muitos defeitos em alimentos refrigerados, principalmente a cristalização em alimentos

láceos, comprometendo assim a textura dos alimentos, além de causarem sérios problemas em pessoas intolerantes a lactose.

A hidrólise da lactose ( $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glicopiranosose ou Gal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)Glc) pode ser feita através de tratamento com ácidos em altas temperaturas (150 °C) ou por ação enzimática da enzima  $\beta$ -Galactosidase, permitindo a utilização de condições moderadas de temperatura e pH (GEKAS; LÓPES-LEIVA, 1985). A hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos na indústria de alimentos, apresentando diversos benefícios e vantagens principalmente em três áreas: saúde, tecnologia de alimentos e meio-ambiente.

A intolerância a lactose foi descrita na literatura por Hipócrates aproximadamente no ano 400 depois de Cristo, porém os sintomas clínicos foram reconhecidos somente nos últimos 50 anos (MATTHEWS *et al.*, 2005). A lactose é encontrada em alta concentração no leite e em produtos lácteos. O leite de vaca contém de 4,5 a 5% de lactose o que perfaz mais de um terço do seu teor de sólidos totais, aproximadamente 20% do teor de sólidos do sorvete e em torno de 72% do teor de sólidos totais no soro do leite (MLICHOVA; ROSENBERG, 2006). Esse açúcar não é absorvido pelo organismo humano e precisa ser hidrolisado em seus monossacarídeos pela ação da  $\beta$ -Galactosidase presente no intestino delgado (ROSSI; LENTZE, 1984).

Cerca de 75% da população mundial adulta apresentam uma deficiência na síntese de  $\beta$ -Galactosidase na mucosa do intestino delgado, resultando em diferentes graus de intolerância à lactose. Para essas pessoas, devido a esse açúcar ser higroscópico e possuir uma baixa solubilidade, no intestino delgado, através da osmose, a lactose absorve uma grande quantidade de água do organismo, resultando em processos de diarreia e a microflora intestinal realiza a fermentação anaeróbica dessa



lactose, o que ocasiona flatulências, cólicas, dor abdominal entre outros sintomas desagradáveis (SHUKLA; WIERZBICKI, 1975).

Esse problema pode ser contornado de diversas formas como se a lactose do leite e produtos lácteos for previamente hidrolisada em seus açúcares prontamente digeríveis, possibilitando o consumo desses alimentos e com isso resultando na diminuição da lactose para pessoas intolerantes a esse dissacarídeo (SIEBER; STRANSKY; DE VRESE, 1997; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Para isso, o uso da  $\beta$ -galactosidase oferece uma forma atraente de obter um leite rico nutricionalmente com níveis reduzidos de lactose.

Os fungos ou levedura que sintetizam  $\beta$ -galactosidases podem auxiliar no tratamento de alimentos contendo lactose estão torná-los disponíveis comercialmente. A  $\beta$ -galactosidase pode também estar na forma de comprimido e ingerido imediatamente antes do consumo de produtos lácteos. Estes comprimidos contêm  $\beta$ -galactosidase derivada da cepas de *Aspergillus* ssp., oferecem uma vantagem de serem ativas em pH baixo, o que permite manter sua função mesmo no pH baixo do estômago em humanos (O'CONNOR, 2007).

Outra vantagem da hidrólise enzimática da lactose é a simultânea formação de galactooligossacarídeos (GOS), usados como ingredientes prebióticos em alimentos. Já que os GOS não são digeríveis nem hidrolisados e passam para o cólon onde são fermentados pela microflora, sem causar qualquer transtorno (GROSOVÁ *et al.*, 2008; MAISCHBERGER *et al.*, 2010) e ainda favorecem a redução do câncer de cólon, sendo também apontada para o desenvolvimento de novos medicamentos para a diminuição do colesterol ruim. (LIM *et al.*, 1995; RABIU *et al.*, 2001; RASTALL; MAITIN, 2002; CHO; SHIN; BUCKE, 2003).

Além disso, os GOS favorecem o crescimento das bifidobactérias intestinais e bactérias probióticas (*Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp.), resultando em efeitos benéficos para a saúde (PENNISI, 1997) .

Os GOS são produzidos simultaneamente durante a hidrólise da lactose devido a atividade de transgalactosilação da  $\beta$ -galactosidase. A produção de GOS ocorre quando a glicose é liberada como um produto da reação da  $\beta$ -Galactosidase a medida que hidrolisa a galactose e deixa um complexo enzima-galactosil (Figura 14). Em soluções concentradas de lactose, a molécula de lactose adere-se ao complexo enzima-galactose resultando na formação do complexo galactosil-oligossacarídeo, assim ocorre a atividade de transgalactosilação o que resulta na formação dos GOS (RUSTOM; FODA; LÓPEZ-LEIVA, 1998).

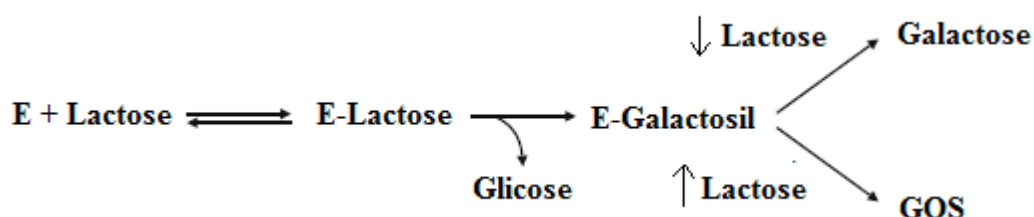


Figura 14: Síntese de Galacto-oligossacarídeos (GOS), E-enzima  $\beta$ -Galactosidase. Fonte: (Adaptado de RAYMOND, 1998).

Essa atividade pode ser aumentada com uma maior concentração inicial de lactose, sendo também influenciada por fatores como fonte e concentração da enzima, pH e temperatura (RAYMOND, 1998; RUSTOM; FODA; LÓPEZ-LEIVA, 1998).

Portanto, a demanda pública para a sua produção é aumentada significativamente em conjunto com o desenvolvimento de uma produção de GOS eficaz e barata. Grandes empresas, localizadas no Japão, começam a lidar com a produção oligossacarídeos, incluindo GOS. Recentemente, há também uma tendência de aumento da produção de GOS na Europa (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

A alta concentração de lactose em produtos como sorvete, leite condensado e doce de leite pode levar a uma excessiva cristalização da lactose resultando em produtos com textura arenosa. A utilização de  $\beta$ -Galactosidase no processo de tais produtos reduz a concentração de lactose a níveis aceitáveis e aumenta a concentração de glicose e galactose, que são açúcares mais solúveis se comparados com a lactose e, portanto aumento a textura e a palatabilidade dos alimentos em questão (J.G, 1984).

A hidrólise prévia da lactose reduz o tempo de fermentação na produção do iogurte, uma vez que os monossacarídeos resultantes são mais facilmente utilizados pelas bactérias lácteas. Além disso, a glicose e a galactose possuem uma doçura relativa maior que a da lactose, diminuindo a quantidade de adoçante, resultando numa menor quantidade de calorias no produto final (J.G, 1984).

Aproximadamente 47% do soro de queijo produzido anualmente no mundo são descartado no meio ambiente, gerando sérios problemas ambientais, pois esse resíduo, possui uma alta concentração de lactose, e quando depositado na água aumenta a demanda química e bioquímica de oxigênio (BARBOSA *et al.*, 1985). Para contornar esse problema, pode-se realizar o cultivo de microrganismo tendo como substrato o soro de queijo, porém o número de microrganismos comercialmente disponíveis capazes de utilizar a lactose como fonte de carbono é notadamente menor que o número de microrganismos capazes de utilizar a glicose e a galactose diretamente.

Assim, a hidrólise prévia da lactose aumentaria significativamente o número de microrganismos capazes de utilizar este substrato, aumentando também a faixa de produtos que podem ser obtidos, como exemplo, biomoléculas (lactatos, acetatos, etanol, butanodiol entre outros), biopolímeros e biomassa (GUIMARAES; DUDEY; INGRAM, 1992; COTÉ *et al.*, 2004).

Além disso, a hidrólise da lactose, presente no soro, pela  $\beta$ -Galactosidase, gera sub-produtos como xaropes, com alto teor de glicose, que podem ser utilizados em laticínios, confeitaria, panificação e na indústria de refrigerantes (PIVARNIK; SENEAL; RAND, 1995; GUL-GUVEN *et al.*, 2007)

A  $\beta$ -Galactosidase também atua na hidrólise da lactose presente nas cadeias de arabinogalactosanas das hemiceluloses, desempenhando um papel importante na degradação desses polissacarídeos (SIMS; CRAIK; BACIC, 1997). Sua atuação é demonstrada na Figura 8.

Para ocorrer a degradação dos polissacarídeos das hemicelulases, é preciso haver uma interação sinérgica entre as enzimas responsáveis pela clivagem de ligações e atuações diferentes. A ação sinérgica da  $\beta$ -Galactosidase com a Feruloil Esterase e a Arabinofuranosidase, sendo produzidas pelo mesmo fungo, *Aspergillus niger*, que favoreceram a hidrólise das ramificações da cadeia de hemicelulose (RÄTTÖ *et al.*, 1993).

A especificidade do substrato e do modo de ação de muitas das enzimas não foram estudados em detalhe. Um bom exemplo disso  $\beta$ -Galactosidase. Até agora, há poucos relatos dessa enzima encontrada em espécies de *Aspergillus ssp.*, acredita-se que esteja relacionada a hidrólise das lactoses em galactoglucomanana da hemicelulose e também nas cadeias laterais da pectina, porém esses mecanismos ainda não estão tão claros (DE VRIES; VISSER, 2001).

### **3.10. Cristalização**

Devido às propriedades físico-químicas das moléculas biológicas, ao número de parâmetros envolvidos no crescimento de cristais e à sensibilidade das proteínas às

condições externas, a cristalização se torna a etapa crítica da resolução da estrutura por difração de raios-X de uma macromolécula biológica.

A cristalização acontece através da diminuição lenta da solubilidade da proteína e está fortemente ligada à precipitação da mesma. O balanço das interações que controlam a solubilidade e/ou a conformação de uma macromolécula poder ser modificado, principalmente, por temperatura, concentração e natureza dos sais em solução, aditivos hidrofóbicos e solventes orgânicos (DAMODARAN; KINSELLA, 1980).

O método mais utilizado na cristalização de proteínas é a técnica da gota pendurada. Nesta técnica uma pequena gota de 1-5  $\mu\text{L}$  de proteína é misturada com um volume igual ou similar de solução de cristalização (formada usualmente por tampão, sal e precipitante) e colocada sobre uma lamínula siliconizada. A lamínula é invertida e selada sobre um reservatório contendo 500-1000  $\mu\text{L}$  de solução de cristalização (Figura 15).

A diferença de concentração entre a gota e o reservatório direciona o equilíbrio do sistema, que se dá por difusão através da fase de vapor da solução menos concentrada para a de maior concentração. Em um experimento perfeitamente delineado a proteína se torna supersaturada e o cristal começa a se formar quando a gota e o reservatório estão em equilíbrio ou perto dele (GIEGE *et al.*, 1995).

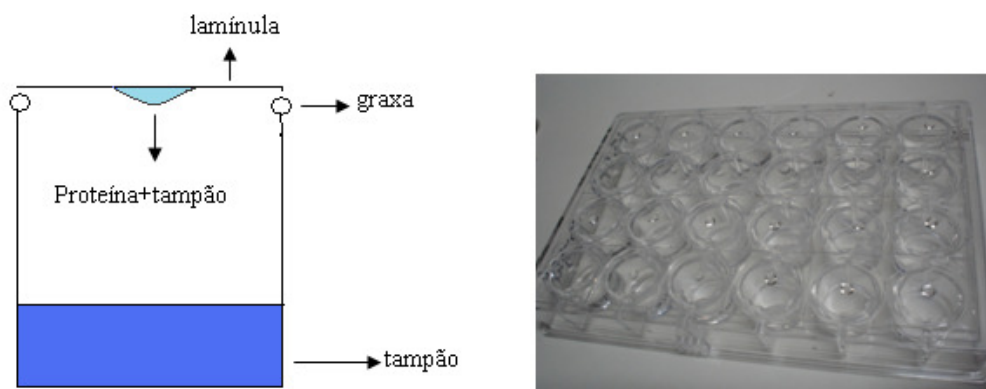


Figura 15: À direita placa utilizada nos experimentos de cristalização e à esquerda, um dos poços está ampliado esquematicamente mostrando como a lamínula, contendo a gota composta por solução do poço e solução da proteína, é colocada sobre o reservatório.

Na supersaturação, as moléculas de proteína interagem entre si perdendo liberdade rotacional e translacional pela formação de ligações de hidrogênio estáveis, o que reduz a energia livre do sistema (ALEXANDER, 1985; ALEXANDER, 1991). Os produtos mais favorecidos cineticamente por esta interação são os precipitados amorfos, que em algumas condições podem formar cristais (MCPHERSON; WEICKMANN, 1990).

Infelizmente, essas condições não podem ser preditas para uma dada proteína, e assim, esta metodologia está sujeita ao *screening* (JANCARIK; KIM, 1991) de várias condições, o que pode ser uma tarefa árdua devido ao grande número de variáveis envolvidas (GIEGE *et al.*, 1995).

Em geral, os parâmetros mais críticos na cristalização de uma macromolécula são: a solubilidade da proteína, a pureza e a concentração da mesma, a concentração de sais e outros agentes precipitantes na solução de cristalização, a temperatura e o pH. Achar as condições nas quais uma proteína cristaliza implica fazer numerosos ensaios variando de maneira sistemática estes parâmetros.

## 4. Metodologia

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos utilizados neste trabalho foram isolados a partir dos solos da região Amazônica (DELABONA *et al.*, 2012). A lista está representada na Tabela 8.

A manutenção das colônias fúngicas foi realizada no Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação, assim como o *screening* das atividades enzimáticas.

Tabela 8: Fungos filamentosos isolados da região amazônica.

P1M1	P18Q2	P29M4	P45C3	P83B3
P2C2	P19Q3	P30B2	P47C3	P84C3
P4Q4	P21C3	P34P9	P49P11	P86M1
P6B2	P23P6	P38P11	P50B2	P88B3
P6P2	P24C1	P40B3	P66E2	P93C3
P7B3	P27C3	P40M2	P74M2	P94E2
P12P3	P28P11	P41C1	P75P1	P97P19
P18E2	P29C4	P43B3	P77C5	P108E2

Alguns fungos presentes nessa coleção foram identificados pelo Dr. André Rodrigues morfológicamente até espécie: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma harzianum* sendo representados como P6B2, P47C3, P40M2 e P34P9, respectivamente e exemplares identificados até gênero como o: *Penicillium* sp, como P50B2 e o P49P11 identificado como *Aspergillus* sp (DELABONA *et al.*, 2012).

### 4.1.2. Manutenção da linhagens fúngicas

Os fungos filamentosos da região Amazônica foram mantidos em placas de Petri e em tubos de ensaio estéreis contendo meio PDA (Potato Dextrose Ágar) à temperatura ambiente sob uma fina camada de óleo mineral. A Tabela 9 representa a composição do meio PDA.

Tabela 9: Composição do meio PDA.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Peptona	5,0
Extrato de batata	4,0
Ágar - Ágar	20,0

### 4.2. Resumo das Etapas desse trabalho

Esse trabalho foi realizado em três etapas de acordo com a Figura 16 contendo um resumo nas descrições de cada uma, que serão descritas no decorrer do trabalho.

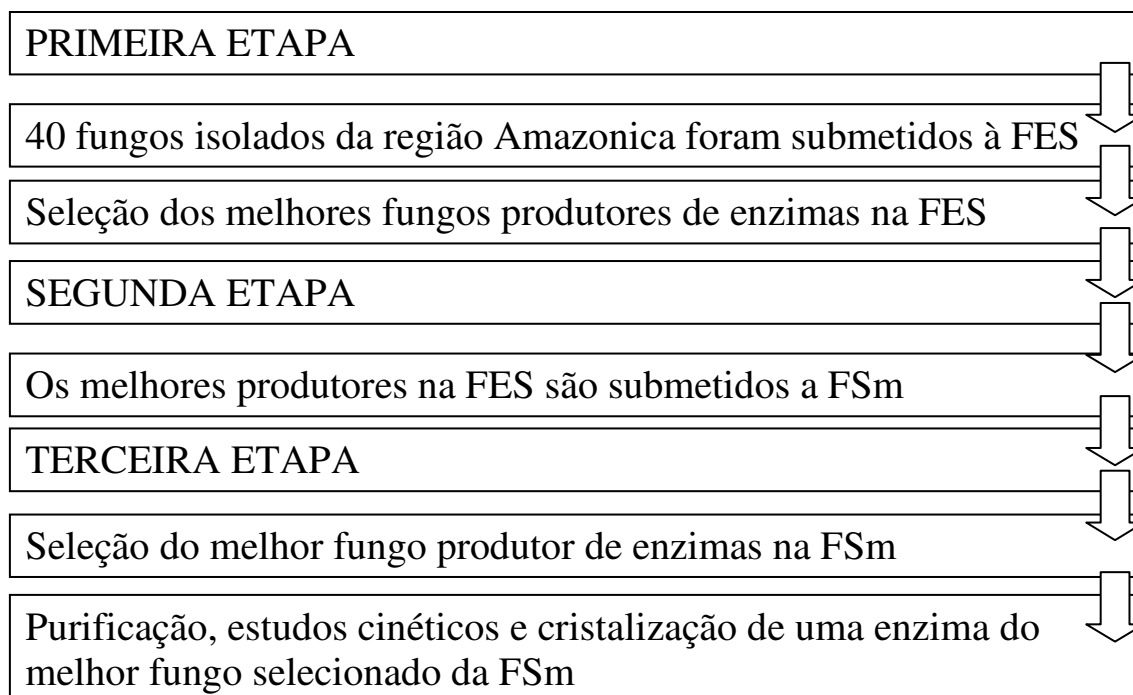


Figura 16: Resumo das sequências das etapas utilizadas neste trabalho.



## **4.3. Fermentação**

### **4.3.1. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)**

O farelo de trigo foi utilizado como substrato sólido nas FES e FSm. Foi lavado em água corrente e seco à 60°C. Após a secagem, foi autoclavado para esterilização a 120°C por 20 min. A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de farelo de trigo lavado. Após a inoculação dos esporos ( $10^7$  esporos/g), foi adicionado aos frascos solução nutriente (MANDELS; WEBER, 1976) sendo a composição descrita na Tabela 10, até a obtenção de uma umidade de 60% (7,5 mL de solução nutriente).

A incubação foi feita a 35°C, durante 10 dias, sendo a primeira e a última amostra retiradas em 24h e todas as outras a cada 48 h. Após o período correspondente a cada amostra, foram adicionados ao material fermentado 50 mL de tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8, sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 30 min, a 10000 g. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 g durante 20 min, à 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

A solução enzimática foi avaliada em relação as enzimas  $\beta$ -glicosidase, pectinase, FPase, xilanase e endoglucanase.

Tabela 10: Componentes do meio Meio de Mandels e Weber, 1969.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Glicose	1,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,14
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,03
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,02
Peptona	0,50
Extrato de levedura	0,20
Uréia	0,03
Tween 80	0,10
*Solução de Sais	0,10

<b>*Solução de Sais:</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5 mg/L
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	1,6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,4 mg/L
CoCl <sub>2</sub>	2,0 mg/L

#### **4.4. Fermentação Submersa (FSm)**

A FSm foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 2000 mL contendo 1% de farelo de trigo lavado e 400 mL de solução nutriente. O material foi inoculado com 10<sup>7</sup> esporos/mL. Empregou-se para produção de endoglucanase, FPase, xilanase e β-Glicosidase o meio de cultura descrito na Tabela 11 enquanto que a produção de β-Galactosidase foi baseada no protocolo de Fiedurek e Ilczuk, 1990 (Tabela 12). A incubação foi feita a 30°C, 10000 g de agitação, durante 5 dias. As amostras foram retiradas a cada 24h. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 g durante 30 minutos, à 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Na terceira etapa do trabalho, para a otimização da produção da enzima β-Galactosidase

pelo fungo *Aspergillus niger* (P47C3) foi introduzido 5% de lactose na solução nutriente.

Tabela 11: Meio de cultivo para a fermentação submersa (FSm) para a produção de endoglucanase, FPase, xilanase e  $\beta$ -Glicosidase.

Componentes	Concentração
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5g/L
NaNO <sub>3</sub>	1,5g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g/L

Tabela 12: Meio de cultivo para Fermentação Submersa para produção de  $\beta$ -Galactosidase.

Componentes	Concentração
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5g/L
NaNO <sub>3</sub>	1,5g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g/L
Lactose	5g/L

## 4.5. Análises Enzimáticas

### 4.5.1. Atividade Endoglucanase

A quantificação da atividade endoglucanásica foi realizada incubando-se 100  $\mu$ L de extrato enzimático com 900  $\mu$ L de solução de 4% CMC (carboximetilcelulose, Sigma Co) em 50 mM tampão citrato e pH 5,0 por 10 min à 50°C. Em seguida, foram adicionados 1 ml de reagente de DNS (MILLER, 1959) de forma a paralisar a reação enzimática, os tubos foram submetidos à 100°C por 10 min. Por fim, adicionou-se 8,0 ml de água destilada e as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas.

Cada análise foi realizada em duplicata. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições de ensaio.

#### **4.5.2. Atividade FPase**

A quantificação da atividade FPase foi realizada incubando-se 40  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático com 1 circunferência de papel de filtro Whatman nº1 de 0,5 cm de diâmetro e 20  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio pH 4,8 à 50°C por 1 hora. Transcorrido o tempo reacional, adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  de reagente de DNS e os tubos foram incubados a 100°C por 10 min. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  da reação eram adicionados em 180  $\mu\text{L}$  de água. Por fim, as absorbâncias a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em duplicata.

#### **4.5.3. Atividade Xilanase**

A atividade de xilanase foi determinada pelo mesmo procedimento para a atividade de endoglucanase, mas o substrato utilizado foi uma solução 0,5% de xilana *Birchwood* (Sigma, EUA). Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando a curva padrão de xilose.

#### **4.5.4. Atividade $\beta$ -glicosidase**

Para a determinação da atividade  $\beta$ -glicosidase, 1000  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático foram incubados com 1000  $\mu\text{L}$  de solução de celobiose (Sigma, EUA) por 30 min. a 50°C. Transcorrido o tempo reacional, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C

por 5 min., de forma a promover a inativação das enzimas. Em seguida, adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de reativo enzimático para dosagem de glicose (Kit enzimático Laborlab, Brasil) e os tubos foram novamente incubados, desta vez a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Finalmente, as soluções tiveram suas absorvâncias a 530 nm registradas. Cada análise foi realizada em duplicata. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância com a quantidade de produto formado foi obtida utilizando-se soluções de glicose.

#### **4.5.5. Atividade de pectinase**

A atividade de pectinase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 4 ml de uma solução de 0,5% de pectina de citros (contendo 79% de ácido galacturônico e 8% de metoxilação) em tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 5,0. Após a incubação, feita em temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os açúcares redutores foram quantificados a partir da curva padrão de ácido D-galacturônico (poligalacturonase). Cada análise foi realizada em duplicata.

#### **4.5.6. Atividade $\beta$ -Galactosidase**

A determinação da atividade  $\beta$ -Galactosidase foi realizada incubando-se 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático com 20  $\mu\text{L}$  de solução de 10mM de PNPG (p-Nitrofenil- $\beta$ -D-Galactopiranosídeo, Sigma Co) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,0. A reação foi incubado por 10 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . A reação foi interrompida com 500  $\mu\text{L}$  de solução 1M de carbonato de cálcio. Os ensaios foram realizados em duplicata. Posteriormente, as absorvâncias foram registradas à 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática de  $\beta$ -

Galactosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

#### **4.6. Avaliação dos resultados da FES**

As análises estatísticas da FES foram realizadas pelo pesquisador Paulino Ribeiro Villas Boas da Embrapa Instrumentação por meio do Software Octave.

#### **4.7. Análise da lactose como substrato da enzima $\beta$ -Galactosidase**

A lactose foi utilizada como substrato para a determinação da atividade  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* (P47C3). Para o ensaio foram utilizados 100  $\mu$ L (diluído 10x) da enzima  $\beta$ -Galactosidase e solução de lactose variando de 2,5 a 30 mM dissolvida em 50 mM de tampão acetato de sódio, pH 4,0. A reação foi incubada à 37°C por 10 min, sendo paralisada com 500  $\mu$ L de reagente dinitrossalicilato, DNS (MILLER, 1959). Logo após, as amostras foram incubadas à 100°C por 5 min.

Finalmente, as soluções tiveram suas absorvâncias a 545 nm registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância com a quantidade de produto formado foi obtida utilizando-se soluções de lactose.

#### **4.8. Quantificação de Proteína Total**

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta foi feito através do método de (BRADFORD, 1976), usando soro albumina bovina como padrão.

## 4.9. Purificação da enzima $\beta$ -Galactosidase

A purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase do *Aspergillus niger* foi feita de acordo com as etapas da Figura 17.

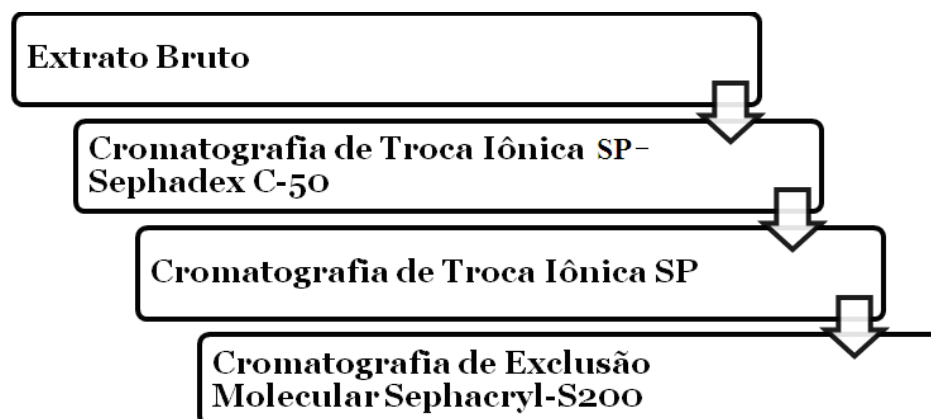


Figura 17: Sequências de etapas cromatográficas utilizadas na purificação de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*.

Todas as etapas de purificação foram feitas em temperatura ambiente, exceto quando era necessário fazer a dessalinização à 4°C e com o mesmo tampão: 50 mM de acetato de sódio, pH 4,0 (Tampão A). O equipamento AKTA Purifier (*GE Healthcare and life sciences*) foi utilizado em todas as etapas de purificação, com exceção do passo II que foi realizado por um equipamento de bancada (*Biorad Detector*). A purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase foi realizada em 4 passos:

### **Passo I – Remoção dos micélios e concentração do extrato protéico**

Ao fim dos cinco dias de fermentação submersa, os micélios foram separados do extrato bruto por filtração e centrifugação, à 10000 g por 20 min. Os 5L residuais foram concentrados para 100 mL em uma coluna de 100 kDa por um sistema de filtração e concentração tangencial, *Hollow Fifer (GE-Healthcare)*, posteriormente foram

dessalinizados por meio de diálise, sendo realizada duas trocas de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0 (tampão A) durante a noite.

### **Passo II – Troca catiônica em SP - Sephadex C-50**

O extrato bruto, após concentração, foi aplicado em uma coluna (20x150 mm) contendo a resina de troca iônica SP-Sephadex C-50 (*Sigma-Aldrich*), equilibrada com 50 mM de tampão acetato, pH 4,0. A resina foi lavada com 2 volumes de tampão 50 mM acetato de sódio, pH 4,0 para a remoção de corantes e outras substâncias produzidas pelo fungo durante o processo de fermentação. A enzima  $\beta$ -galactosidase foi eluída da coluna com gradiente salino crescente formado por dois volumes da coluna de 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4,0 contendo 0,5 M de NaCl no mesmo tampão. A fração obtida (100 mL) foi dialisada contra 2L de 50mM de tampão acetato de sódio, pH 4,0, realizaram-se duas trocas de tampão durante a noite.

### **Passo III – Troca catiônica em SP- Sephadex**

O extrato, após diálise, foi introduzido na coluna de HPLC SP-TSK 5PW (21,5 x 150 mm). As proteínas foram eluídas com um gradiente crescente linear (0-0,5 M) de NaCl em 50 mM de tampão acetato de sódio, pH 4,0. A vazão foi o volume 1mL/min e o gradiente era de aproximadamente de 3-5 volumes da coluna, o volume das frações coletadas foi de 5 ml.

### **Passo IV – Gel filtração em Sephacryl S-200**

As frações do passo III que continham atividade  $\beta$ -galactosidase foram reunidas, concentradas em concentradores (*GE-Healthcare*) de 100kDa volume menor, de 50 mL para 2 ml, posteriormente foi aplicada sobre a coluna (26 x 1200 mm) que continha a



resina de exclusão molecular, a Sephacryl S-200 também equilibrada com tampão 50 mM acetato de sódio, pH 4,0.

Nessa última cromatografia a uma velocidade de vazão foi 0,3 mL/min, o volume das frações coletadas foram de 2 mL.

#### **4.10. Análise das etapas de Purificação**

O cálculo para analisar cada etapa de purificação estão representados nas etapas a seguir:

Para calcular a atividade específica ( $A_e$ ) foi utilizada fórmula descrita na equação 1, onde  $A$  é a Atividade enzimática (U/mL) e  $Prot$  é concentração de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ).

$$A_e = \frac{A}{Prot} \quad (1)$$

A fórmula da equação 2 foi utilizada para calcular o Fator de Purificação (FP), em que  $A_{ef}$  é a Atividade Específica Final de cada cromatografia e  $A_{ei}$  é a Atividade Específica Inicial, ou seja, a atividade específica do extrato bruto.

$$FP = \frac{A_{ef}}{A_{ei}} \quad (2)$$

Para calcular o Rendimento (R) foi utilizadas as equação 3 e 4, onde  $V$  é o volume total (mL), a  $a_f$  é a Atividade enzimática final (U/mL) e  $a_i$  é a atividade enzimática inicial (U/mL).

$$a_i \text{ ou } a_f = A \times V \quad (3)$$

$$R = \frac{a_f}{a_i} \quad (4)$$

## **4.11. Eletroforese**

A eletroforese foi realizada segundo a metodologia de (LAEMMLI, 1970) com o propósito de monitorar as frações eluídas das cromatografias. As frações que continham a atividade  $\beta$ -galactosidase em todos os passos da purificação, foram testados para homogeneidade e a pureza da proteína em gel 10% de SDS-PAGE, sendo que as proteínas foram coradas em *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad).

## **4.12. Liofilização**

Após análise do gel de acrilamida 10%, as frações do passo IV da purificação, descrito no item 4.9, que continham a enzima  $\beta$ -galactosidase purificada eram submetidas a diálise contra 2L de água MiliQ, com duas trocas de água durante a noite, posteriormente foi liofilizada (*Liofilizador L202 – Liotop, Liobras*) e utilizada para análise de cinética enzimática e cristalização.

## **4.13. Caracterização Bioquímico e cinética da enzima $\beta$ -galactosidase**

### **4.13.1. Avaliação do efeito do pH na enzima $\beta$ -galactosidase**

Foi determinado o pH ótimo para a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase do fungo *Aspergillus niger* (P47C3). O ensaio foi realizado com 20  $\mu$ L de solução de PNPG dissolvido em tampão fosfato citrato de sódio (50mM) nos valores de pH (3,0/ 4,0/ 5,0/ 6,0/ 7,0/ 8,0/ 9,0) e 50  $\mu$ L da enzima  $\beta$ -Galactosidase purificada dissolvida em água.

A mistura foi incubada à 37°C por 10 minutos. A reação foi paralisada com 500µL de 1M de carbonato de sódio, os ensaios foram realizados em triplicata. As determinações enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 4.5.6.

#### **4.13.2. Determinação da temperatura ótima**

A determinação da temperatura ótima da enzima β-galactosidase ocorreu sobre as mesmas condições de ensaio descritas na determinação do pH ótimo. Entretanto utilizou-se na reação 20µL de solução de 20mM de substrato sintético PNPG dissolvido em 50mM de tampão acetato de sódio, pH 4,0 e 50 µL da enzima β-galactosidase purificada incubando em 27 °C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C e 80 °C por 10 minutos. A reação foi paralisada com 500µL de 1M de carbonato de sódio, os ensaios foram realizados em triplicata. As determinações enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 4.5.6.

#### **4.13.3. Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_{m\text{ap}}$ ) e Velocidade Máxima ( $V_{m\acute{a}x\text{ap}}$ )**

Testaram-se dois substratos para a determinação de  $K_{m\text{ap}}$  e  $V_{m\acute{a}x\text{ap}}$  da β-Galactosidase de *Aspergillus niger* (P47C3). Os ensaios das atividades enzimática foram realizados com diferentes concentrações de substrato PNPG e Lactose. Foram utilizados 100µL da enzima para os ensaios com os substratos PNPG (0,67-60 mM) e 100 µL da enzima (diluída 10x) para os ensaios do substrato da lactose (2,5-30 mM), conforme descrito no item 4.6.

#### **4.13.4. Efeito do inibidor galactose na atividade da $\beta$ -Galactosidase**

Para a determinação da taxa de inibição foram realizados ensaios enzimáticos em presença e ausência de galactose, o qual é um dos produtos da hidrólise dos oligossacarídeos de lactose pela enzima  $\beta$ -Galactosidase (RAYMOND *et al.*, 1998).

Os ensaios de atividade enzimática com concentrações de PNPG que variaram de 0-20 mM, na ausência e na presença de 1-5 mM de galactose. A reação foi incubada em banho termostático à 37°C por 10 min, e para paralisar a reação foram adicionados 500  $\mu$ L de carbonato de sódio, conforme descrito no item 4.5.6.

#### **4.14. Cristalização**

Ensaio de cristalização foram conduzidos para a  $\beta$ -galactosidase purificada e liofilizada de *Aspergillus niger* (P47C3), utilizando a técnica da gota pendurada, descrito por (REX, 1969). A proteína extraída do fungo, depois de purificada e liofilizada foi dissolvida em água até atingir a concentração de 10mg/mL e depois centrifugado a 10000 g por 5 min. Gotas de 1-5  $\mu$ L de volume desta solução foram misturadas com volumes iguais de uma solução de tampão 12% de PEG 4000 e tampão 0,2M Tris-HCl com pH variando de 8,0 à 8,5. As gotas foram equilibradas contra 1 ml da mesma solução à 18°C.

A visualização da formação dos cristais na gota é realizada por meio de lupa microscópica. A placa plástica que continha as lamínulas com as gotas penduradas era observada todos os dias durante um mês.

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Seleção das linhagens produtoras de enzimas relacionadas à degradação da biomassa celular em Fermentação em Estado Sólido Sólido (FES)**

A primeira etapa deste trabalho foi feita no laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação, que envolveu a seleção dos melhores fungos produtores de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal. Os 40 fungos, foram submetidos, em 10 dias, à FES, utilizando como fonte de carbono, o farelo de trigo, sendo umidificado com 7,5 mL (60%) de meio Mandels e Sternberg, 1976.

O farelo de trigo foi utilizado como fonte de carbono para selecionar a cepa melhor produtora de celulases, pois observando os substratos utilizados por alguns autores, verifica-se alta produtividade em substrato farelo de trigo (GESSESSE; MAMO, 1999; RIDDER; NOKES; KNUTSON, 1999; SILVA; GOMES; ALSINA, 2007). Esse material apresenta-se como fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso, sendo, portanto considerado na literatura como a fonte de carbono ideal.

Todas as linhagens fúngicas apresentaram bom crescimento e infiltração das hifas no farelo de trigo, embora esse crescimento não foi quantificado em termos de biomassa.

## **5.2. Produção de xilanase pelos fungos isolados da Região Amazônica**

A Figura 18 mostra a produção de xilanase (U/g) pelos fungos isolados da região Amazônica. Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produção desta enzima. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção (U/g) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão.

Dessa forma os fungos selecionados foram: P6B2 (*Aspergillus oryzae*) com produção de 1076,94 U/g em 72h; o P41C1; o P49P11 (*Aspergillus* sp.) e P81B2, sendo que o valor da atividade enzimática foi: 894,38 U/g em 72h, 848,54 U/g em 72h e 816,13 U/g em 24h, respectivamente.

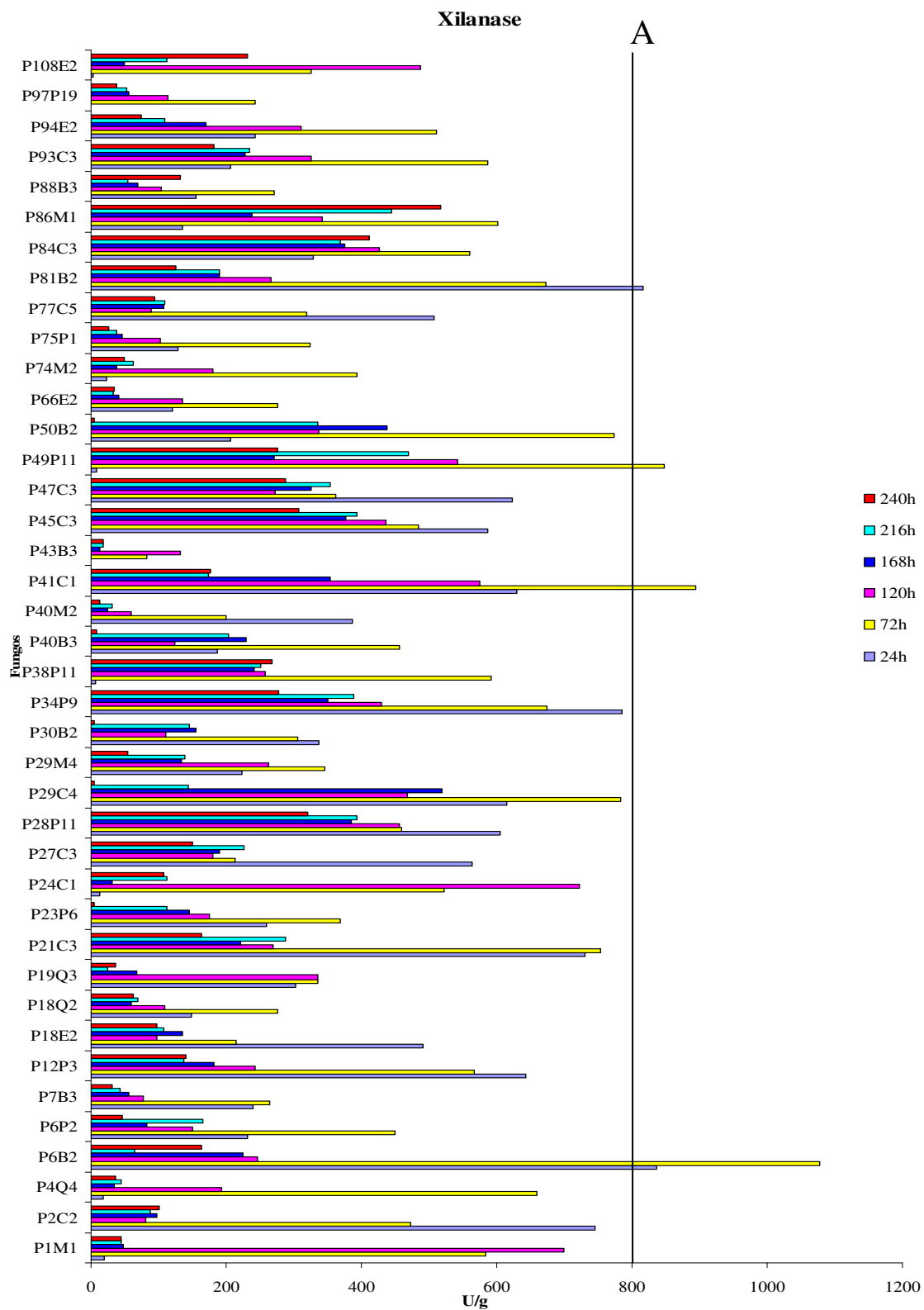


Figura 18: Produção de xilanase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

A Figura 18 revela que há uma queda de produção enzimática ao longo do processo fermentativo. Isso pode estar diretamente correlacionado com o esgotamento de nutrientes do meio ou ao processo respiratório que por ser exotérmico, faz com que a temperatura se eleve, e ao meio de cultivo não mantém as condições iniciais de pH e temperatura.

A Figura 19 correlaciona a produção de xilanase (U/g) com a produtividade da xilanase (U/gh). Observa-se uma linearidade entre os fungos sendo estritamente correlacionada com mesmo intervalo de tempo do picos de produção e produtividade da enzima, ou seja, em 24h, alguns fungos não seguem essa tendência diferem no tempo do pico enzimático de produção e produtividade da xilanase.



Tanto a Figura 18, como a Figura 19, corroboram que o P6B2 (*Aspergillus* sp) foi o melhor fungo produtor da xilanase (1076,94 U/g) e produtividade (34,85 U/gh).

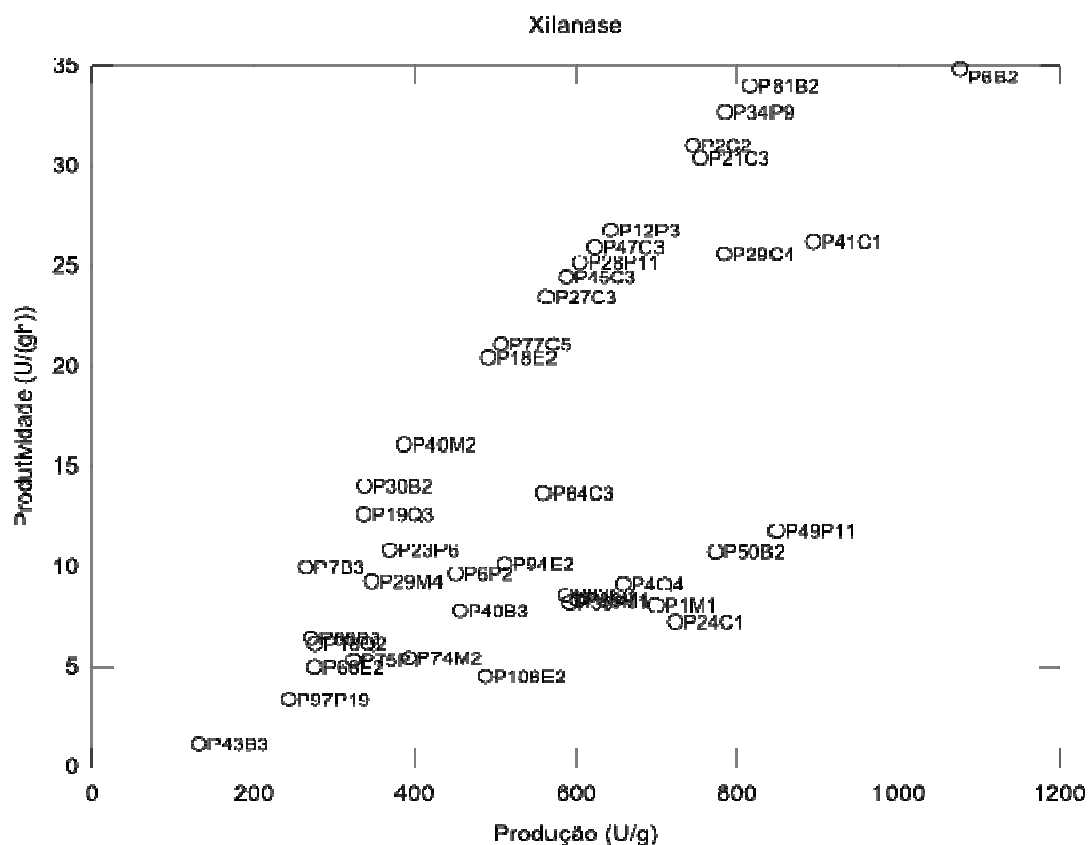


Figura 19: Produção de xilanase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

A maioria dos membros do gênero *Aspergillus* são notáveis produtores de enzimas extracelulares, sendo responsáveis pela síntese da enzima xilanase em larga escala (DE VRIES; VISSER, 2001).

A produção de xilanase pode ter sido induzida pelo fato do substrato utilizado na FES ser o farelo de trigo, pois essa fonte de carbono tem altos teores de hemicelulose que estimula os microrganismos sintetizarem mais essa enzima (KHANDEPARKAR; BHOSLE, 2006).

A produção da xilanase por outros autores utilizando cepas de fungos mutantes e selvagens durante a FES, foi comparado com os três melhores resultados obtidos neste trabalho (Tabela 13).

Tabela 13: Comparação da produção de xilanase com resultados obtidos nesse trabalho e valores da literatura, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo.

<b>Fungos</b>	<b>Produção (U/g)</b>	<b>Referência</b>
** <i>Aspergillus niger</i> BC-1 e <i>T. reesei</i> ATCC56765	2710,62 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Aspergillus niger</i> BC-1	2604,06 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30 (ATCC 56765)	2467,53 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
<i>Termomyces lanuginosus</i>	1843,60 U/g	(ALAM <i>et al.</i> , 1994)
<b>P6B2 (<i>Aspergillus</i> sp.)</b>	<b>1076,94 U/g</b>	<b>Presente Trabalho</b>
<b>P41C1</b>	<b>894,38 U/g</b>	<b>Presente Trabalho</b>
<b>P49P11 (<i>Aspergillus</i> sp.)</b>	<b>848,54 U/g</b>	<b>Presente Trabalho</b>
* <i>Aspergillus niger</i> DRF-5	820,00 U/g	(PAL; KHANUM, 2010)
<i>Thermomyces aurantiacus</i>	542,50 U/g	(ALAM <i>et al.</i> , 1994)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	417,12 U/g	(AZIN; MORAVEJ; ZAREH, 2007)
* <i>Trichoderma harzianum</i> 1073D3	185,20 U/g	(ISIL; NILUFER, 2005)
* <i>Aspergillus niger</i> 3T5B9	76,55 U/g	(COURI <i>et al.</i> , 2000)

\*\*fermentação com co-cultivo dos fungos *Aspergillus niger* BC-1 e *Trichoderma reesei* ATCC56765; \* fungos mutantes.

Os fungos isolados da Região Amazonica foram bons produtores de xilanase, pois o P6B2 é uma linhagem selvagem e produziu 1076,94 U/g (Tabela 13). Mutações podem induzir a produção da xilanase, pois de acordo com os trabalhos de Dhillon e colaboradores (2011) utilizaram dois fungos mutantes, como *Aspergillus niger* BC-1 e o *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765), que produziram por FES utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono: 2604,06 U/g e 2467,53 U/g, respectivamente.

Quando foram submetidos a co-cultivo produziram uma maior quantidade de xilanase do que quando separados (2710,62 U/g) (DHILLON *et al.*, 2011).

Entretanto ao comparar a produção de xilanase com outros fungos mutantes (COURI *et al.*, 2000; ISIL; NILUFER, 2005) ocorreu uma maior produção dessa enzima pelos três melhores fungos isolados da região Amazônica (Tabela 13), isso indica que os fungos deste trabalho são realmente bons produtores dessa enzima.

Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se considerar que há diferenças de metodologia de fermentação, tais como: umidade, aeração, pH e temperatura e da metodologia da dosagem das atividades. Vale destacar que em alguns desses trabalhos, as condições de cultivo foram otimizadas, o que não é o caso deste trabalho no qual foi feita uma caracterização da produção enzimática em uma mesma condição de cultivo. No entanto, os isolados selecionados aqui possuem um grande potencial para utilização em trabalhos futuros de otimização.

### **5.3. Produção de Endoglucanase pelos fungos isolados da Região Amazônica**

A Figura 20 mostra a produção de endoglucanase pelos fungos isolados. Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produção desta enzima. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção (U/g) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão.

Dessa forma os fungos selecionados foram: o P47C3 (*Aspergillus niger*) sendo o maior produtor de endoglucanase: 351,79 U/g em 120h e o fungo P40M2 (*Aspergillus fumigatus*) que produziu 294,33 U/g em 24h (Figura 20).

Após o pico de produção, a atividade de endoglucanase pelo fungo *Aspergillus niger* teve uma pequena redução entre 168h (227,76 U/g) e 216h. (222,65 U/g), porém em 240h, ocorre um aumento da produção da enzima (262,95 U/g). Diferentemente do perfil da atividade da enzima pelo fungo *Aspergillus fumigatus* pode se observar que o pico da atividade ocorreu em 24h, e posteriormente, a produção de endoglucanase teve um declive acentuado, em 240h registrou-se a menor medida (13,71 U/g) (Figura 20).

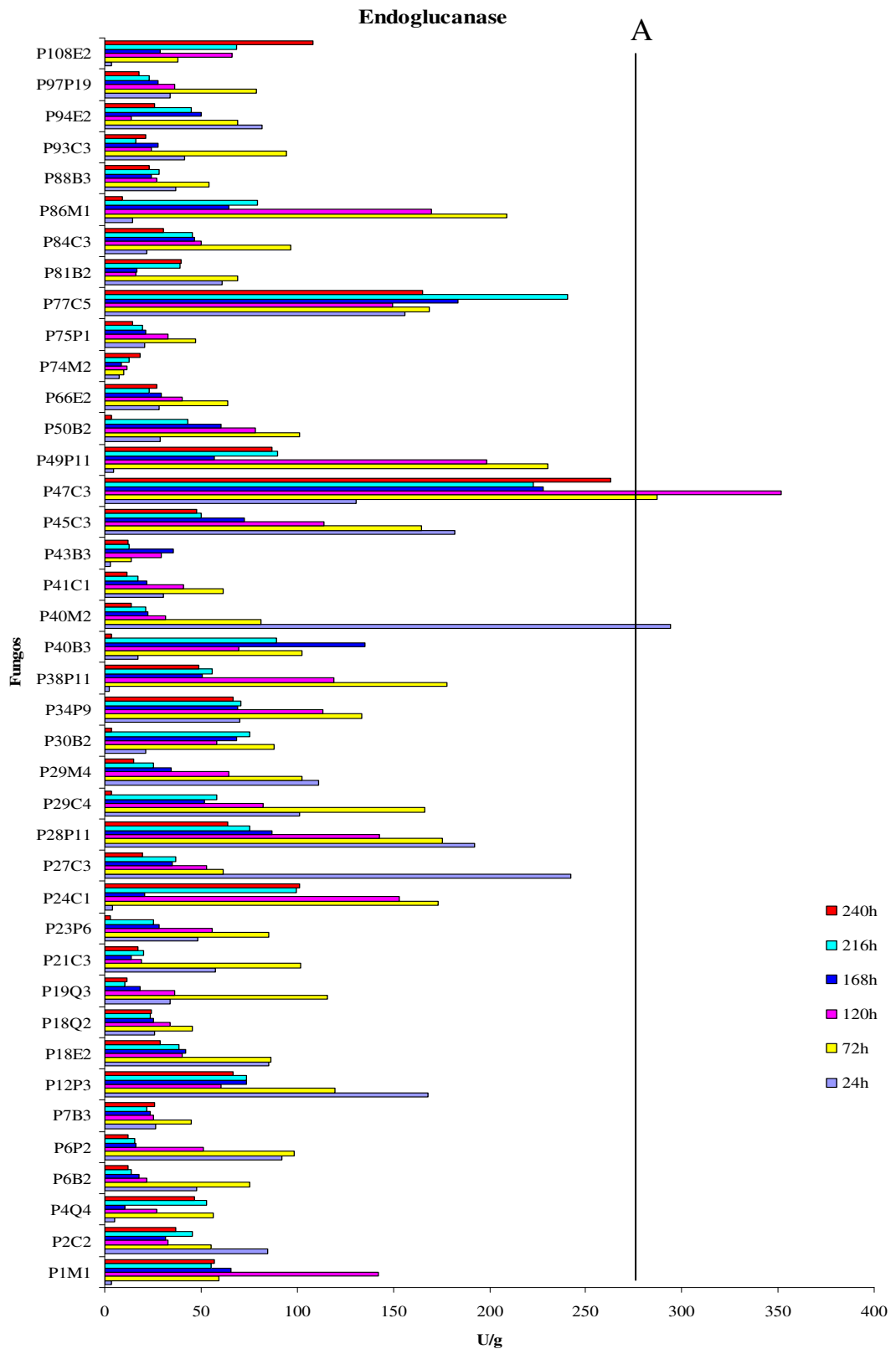


Figura 20: Produção de endoglucanases pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

A Figura 21 correlaciona a produção de endoglucanase (U/g) com a produtividade da endoglucanase (U/gh). Observa-se uma tendência linear sendo correlacionada com os picos de produção e produtividade da xilanase em 24h, porém alguns fungos não seguem essa linearidade, porque diferem no tempo de produção e produtividade dessa enzima.

Na Figura 21 destacou o fungo P40M2 (*Aspergillus fumigatus*) com maior produtor de endoglucanase, em menor tempo possível. Entretanto esse resultado difere da Figura 20, pois apontou como melhor produtor o fungo P47C3 (*Aspergillus niger*), na qual revela está diretamente relacionada somente com a produção dessa enzima.

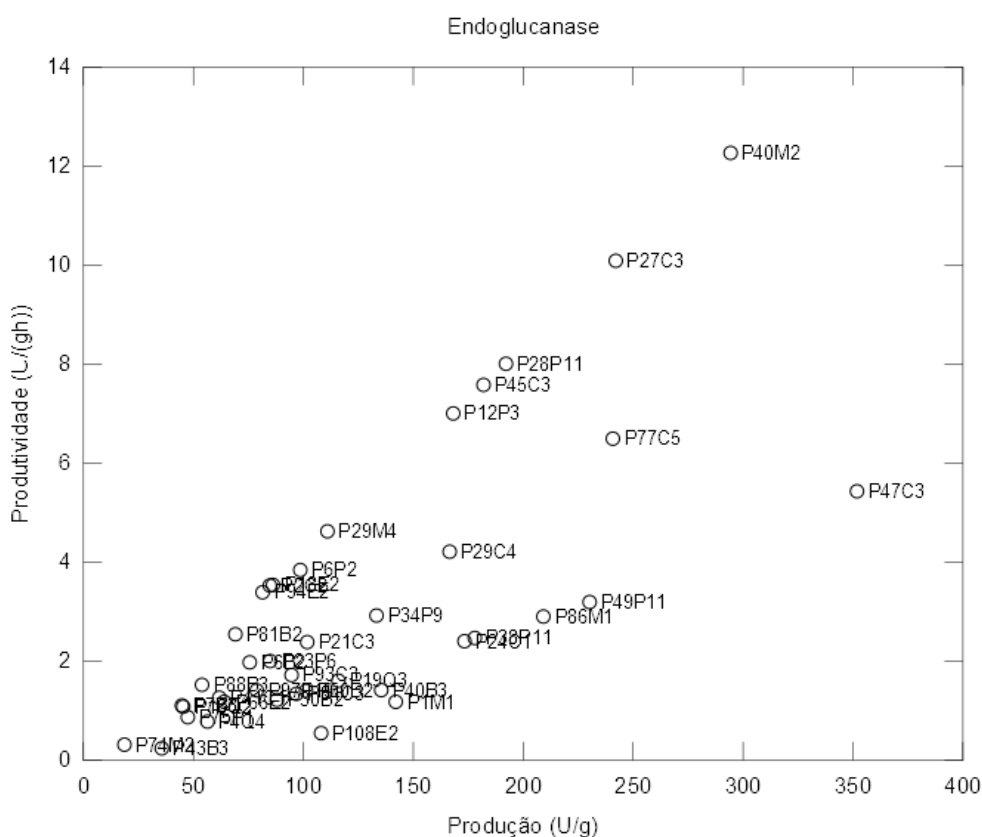


Figura 21: Produção de endoglucanase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

Na literatura, os fungos *Aspergillus* ssp. são tidos como bons produtores de endoglucanases (CEN; XIA, 1999; THYGESEN *et al.*, 2003; ADSUL *et al.*, 2005) e isso corrobora os resultados obtidos nesse trabalho, entretanto há poucos relatos sobre a produção de celulases por *Aspergillus fumigatus*.

Da mesma maneira, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) analisaram a produção de endoglucanase de 80 linhagens de fungos isolados do solo de uma estação ecológica em São Paulo. De todas as linhagens, a que apresentou a maior produção, foi a identificada como *Trichoderma harzianum* II (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004).

A Tabela 14 compara a produção da endoglucanase por outros autores, utilizando cepas de fungos mutantes e selvagens durante a FES com a produção de endoglucanase pelos fungos P47C3 (*Aspergillus niger*) e P40M2 (*Aspergillus fumigatus*) presentes nesse trabalho.

Tabela 14: Comparação da produção de endoglucanase com os resultados obtidos nesse trabalho e com os valores da literatura fonte de carbono o farelo de trigo, salvo exceções.

Fungos	Atividade (U/g)	Referência
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> IMI 216529	1709,00 U/g	(KALOGERIS <i>et al.</i> , 2003)
* <i>Aspergillus niger</i> CFTRI 1105	482,76 U/g	(NANDAKUMAR <i>et al.</i> , 1994)
<b>P47C3 (<i>Aspergillus niger</i>)</b>	<b>351,79 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>
* <i>Aspergillus niger</i> M11	315,00 U/g	(GAO <i>et al.</i> , 2008)
<b>P40M2 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)</b>	<b>294,33 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>
*** <i>Trichoderma koningi</i> F244	287,30 U/g	(LI <i>et al.</i> , 2004)
** <i>A. niger</i> BC-1 e <i>T. reesei</i> (ATCC56765)	117,71 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30 (ATCC 56765)	68,57 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Aspergillus niger</i> BC-1	48,22 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20,00 U/g	(SONI; NAZIR; CHADHA, 2010)
**** <i>Aspergillus fumigatus</i>	21,06 U/g	(GRIGOREVSKI-LIMA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i> (F-12)	13,00 U/g	(ZÚÑIGA <i>et al.</i> , 2011)

\*\*\*\* meio utilizado foi uma combinação de bagaço de cana e água de maceração de milho, \*\*\* meio suplementado com 9,43g de palha de arroz, \*\*fermentação com co-cultivo dos fungos *Aspergillus niger* BC-1 e *Trichoderma reesei* ATCC56765; \* fungos mutantes.

Os melhores fungos produtores de endoglucanase isolados da Região Amazônica foram bons produtores dessa enzima quando comparados com os resultados da literatura. Isso pode ser corroborado pelo trabalho dos pesquisadores Dhillon e

colaboradores (2011) no qual submeteram sob as mesmas condições de fermentação deste trabalho a cepa mutante de *Aspergillus niger* BC-1 e obtiveram a produção máxima de 48,22 U/g. Para aumentar a indução na síntese dessa enzima, realizaram um co-cultivo com esse mesmo fungo e outra cepa mutante de *Trichoderma reesei* ATCC56765, porém o valor obtido (117,71 U/g) foi inferior em relação aos resultados apresentados neste trabalho (Tabela 14).

É difícil comparar valores em relação ao trabalho de Kalogeris e colaboradores (2003) que obtiveram a produção máxima de endoglucanase (1709 U/g) quando otimizaram temperatura e umidade no bioreator (KALOGERIS *et al.*, 2003).

Microrganismos de mesmo gênero ou espécie podem expressar proteínas em quantidades maiores ou menores dependendo do seu metabolismo e da sua necessidade nutricional em seu *habitat*. Outros fatores como pH e temperatura otimizadas podem influenciar a indução de atividade enzimática.

Sukumaran e colaboradores (2009) reportaram que a indução da produção de celulasas é fortemente afetada pelas concentrações de carbono e nitrogênio. Muitos microrganismos requerem quantidades diferentes de carbono e nitrogênio para indução de endoglucanases.

Portanto, a análise dos dados de produção de endoglucanase apresentados na Figura 20 deve ser feita considerando que os parâmetros fermentativos foram fixados e, desta forma, as condições de fermentação podem não ter sido as mais adequadas para algumas linhagens. Ainda que as atividades das enzimas foram determinadas em condições únicas de pH, temperatura e tipo de substrato o que pode ter resultado em atividades sub-estimadas.



## 5.4. Produção de $\beta$ -Glicosidase pelos fungos isolados da Região Amazônica

A Figura 22 mostra a produção de  $\beta$ -glicosidase pelos 40 fungos isolados durante 240h. Do mesmo modo que a produção da xilanase, o perfil enzimático da enzima  $\beta$ -glicosidase, mostra que após o pico da produção há um declive acentuado na síntese dessa enzima.

Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produção desta enzima. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção (U/g) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão.

Diante disso, o melhor fungo produtor de  $\beta$ -glicosidase foi o P47C3 (*Aspergillus niger*) com pico de produção de 62,31 U/g em 72h (Figura 22).

A maioria das enzimas comerciais disponíveis é produzida a partir dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, mas o fungo *Trichoderma reesei* produz pouca quantidade da enzima  $\beta$ -Glicosidase (GUSAKOV *et al.*, 2007; CHAUVE *et al.*, 2010). Neste sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar essa desvantagem, podendo ser avaliada em fermentações com culturas simples ou em co-culturas. Como no trabalho de Brijwani e colaboradores, 2010 relataram que o déficit de  $\beta$ -glicosidase foi superado quando o *T. reesei* foi co-cultivados com *A. oryzae* (BRIJWANI; VADLANI, 2011).

Além do fungo P47C3 (*Aspergillus niger*), a reta A da Figura 22 destaca outros dois fungos o P27C3 e o P28P11, com picos de produções enzimáticas de 38,71 U/g em 168h e 35,28 U/g em 216h, respectivamente.

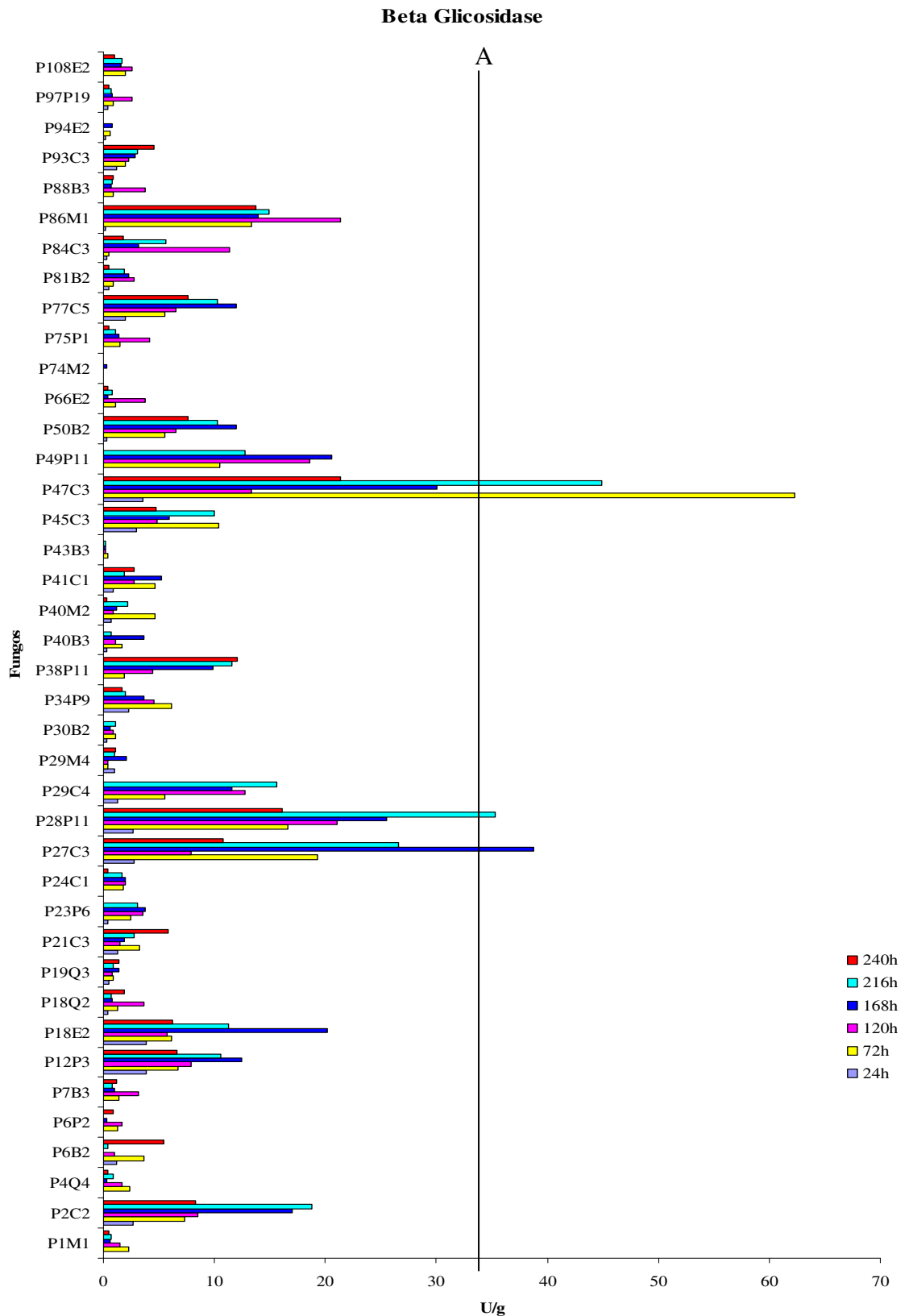


Figura 22: Produção de  $\beta$ -Glicosidases pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

A Figura 23 correlaciona a produção de  $\beta$ -Glicosidase (U/g) com a produtividade dessa enzima (U/gh). Tanto a Figura 22, como a Figura 23, corroboram que o P47C3 (*Aspergillus niger*) foi o melhor fungo produtor da  $\beta$ -Glicosidase.

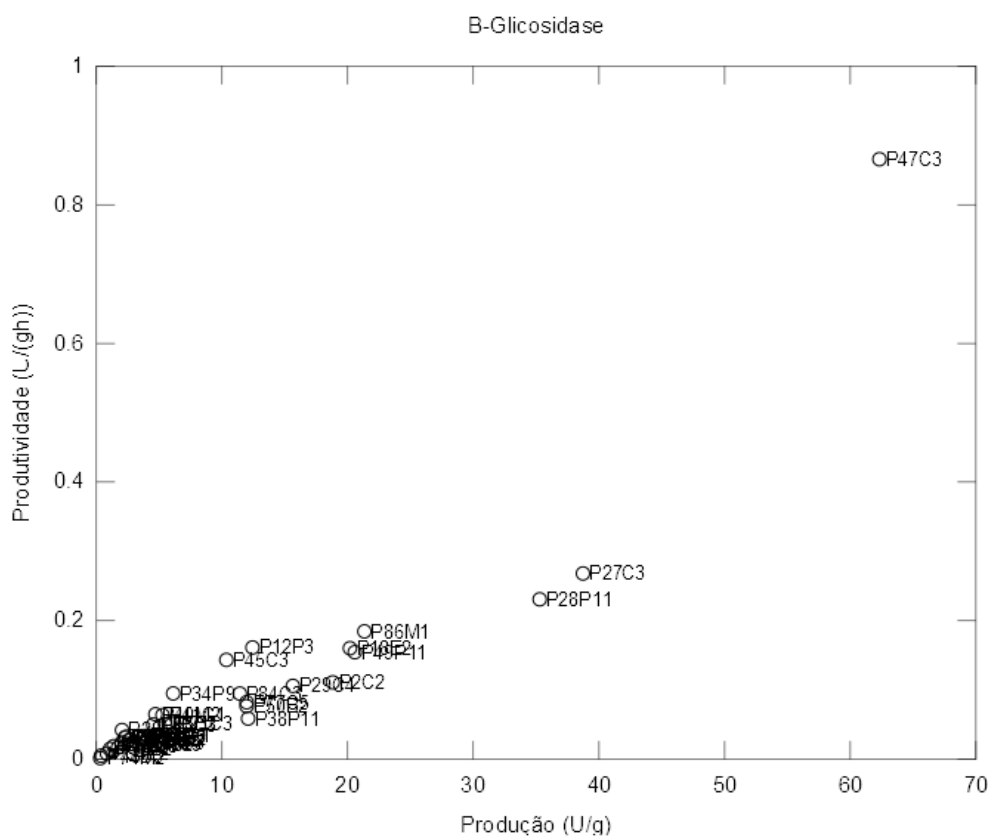


Figura 23: Produção de  $\beta$ -Glicosidase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

A Tabela 15 compara a produção de  $\beta$ -Glicosidase do fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) desse trabalho e outros trabalhos, utilizando cepas de fungos mutantes e selvagens durante a FES tendo como fonte de carbono o farelo de trigo.

O farelo de trigo contém uma quantidade adequada de hidratos de carbono, proteínas, gorduras, fibras, cinzas e íons como Ca, Mg, P, K, S além de vários

aminoácidos que são essenciais para o crescimento de fungos e a produção dessa enzima (BALKAN; ERTAN, 2006; RAJOKA *et al.*, 2006).

Tabela 15: Comparação da produção de  $\beta$ -Glicosidase com o resultado obtido nesse trabalho em relação aos valores registrados na literatura, utilizando como fonte de carbono, o farelo de trigo.

Fungos	Atividade (U/g)	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	875,00 U/g	(RAZA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	305,00 U/g	(RAZA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus awamori</i>	295,00 U/g	(RAZA <i>et al.</i> , 2011)
*** <i>Trichoderma koningi</i> F244	184,00 U/g	(LI <i>et al.</i> , 2004)
* <i>Aspergillus niger</i> M11	128,00 U/g	(GAO <i>et al.</i> , 2008)
<b>P47C3 (<i>Aspergillus niger</i>)</b>	<b>62,31 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>
** <i>Aspergillus niger</i> BC-1 e <i>Trichoderma reesei</i> ATCC56765	24,54 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Aspergillus niger</i> BC-1	21,69 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30 (ATCC 56765)	13,58 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus ellipticus</i>	11,75 U/g	(GUPTE; MADAMWAR, 1997)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7,65 U/g	(GUPTE; MADAMWAR, 1997)

\*\*\* meio de cultivo suplementado com 4,27 g de palha de arroz e 20,57 g de farelo de trigo\*\*fermentação com co-cultivo dos fungos *Aspergillus niger* BC-1 e *Trichoderma reesei* ATCC56765, \* fungos mutantes.

Da mesma forma que para a atividade de endoglucanase, os resultados obtidos para a atividade de  $\beta$ -glicosidase foram superiores ou da mesma ordem de grandeza aos relatados na literatura. Gupte e Madamwar (1997) avaliaram o cultivo isolado dos fungos *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de  $\beta$ -glicosidase de 11,75 e 7,65 U/g, respectivamente, após 8 dias de cultivo em FES. Dhillon e colaboradores (2011) obtiveram uma atividade máxima de  $\beta$ -glicosidase de 21,69 U/g após 96 horas de FES em farelo de trigo utilizando o fungo *A. niger*. Gao e colaboradores (2008) reportaram uma valores de  $\beta$ -glicosidase 128 U/g após 96 horas de cultivo do fungo *A. terreus* M11 em FES.

O fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) produziu uma maior quantidade de  $\beta$ -Glicosidase quando comparado com o co-cultivo dos fungos *Aspergillus niger* BC-1 e *Trichoderma reesei* ATCC56765 (DHILLON *et al.*, 2011), mas apresentou uma produção menor ao comparar o valor obtido (62,31 U/g) com os outros fungos do mesmo gênero (RAZA *et al.*, 2011). Essa diferença nos valores de atividade de  $\beta$ -

Glicosidase apresentada por esses autores pode estar atribuído à linhagem avaliada e também ao meio nutricional que foi otimizado para o aumento de atividade enzimática (Tabela 15).

## **5.5. Produção de Pectinase pelos fungos isolados da Região Amazônica**

A Figura 24 mostra a produção de pectinase durante 10 dias de FES dos 40 fungos isolados da região amazonica.

Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produção desta enzima. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção (U/g) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão.

Dessa forma os fungos selecionados foram: o P77C5 foi o maior produtor de pectinase, com pico de produção de 20,70 U/g em 24h, outro destaque foi o P81B2, que produziu praticamente mesma quantidade, 20,01 U/g em 24h. P1M1, P6P2 e P24C1 obtiveram o pico de produção de 18,54 U/g em 72h, 19,10 U/g em 24h, 18,51 U/g em 120h, respectivamente (Figura 24).

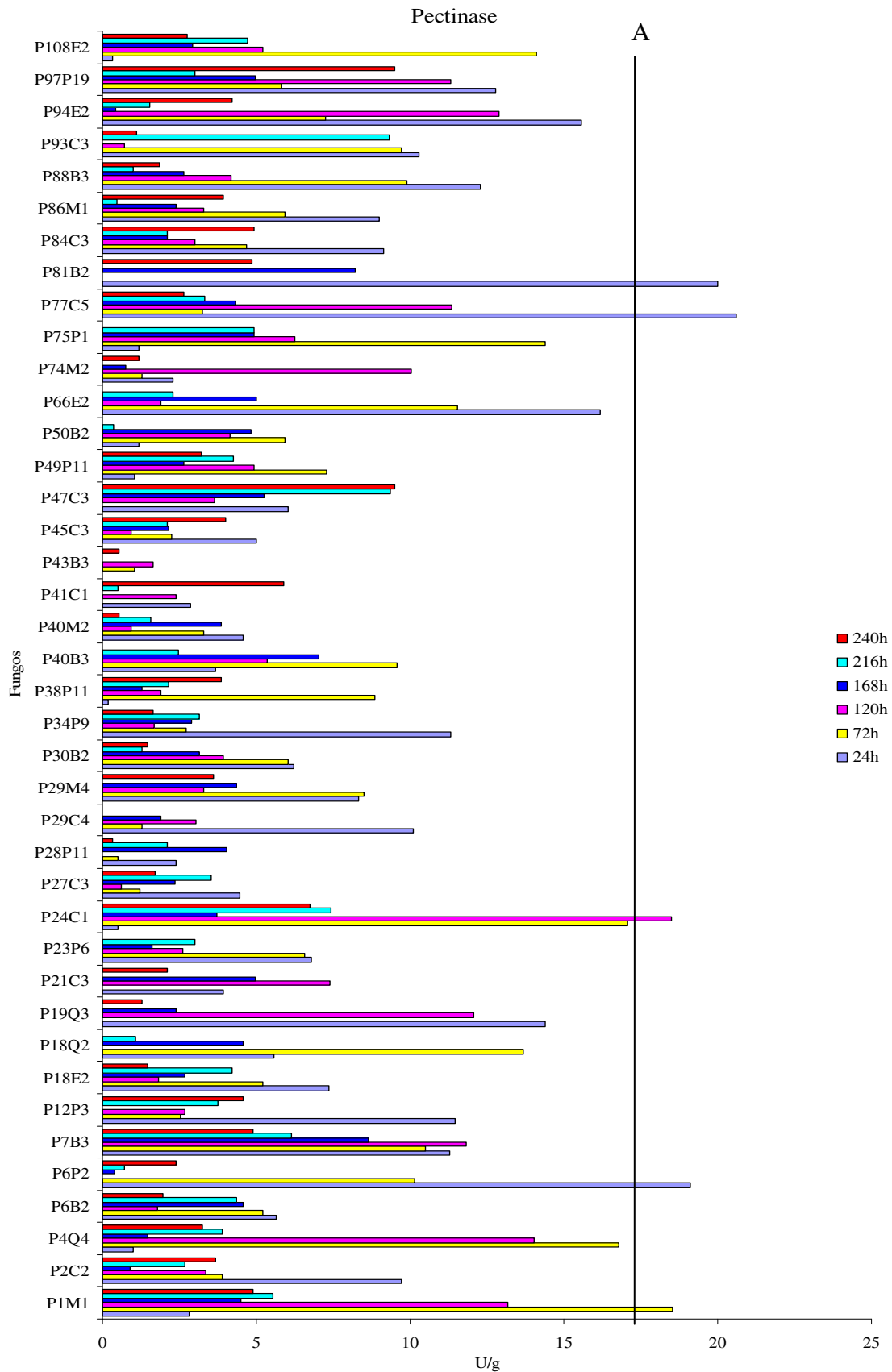


Figura 24: Produção de Pectinase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

A Figura 25 correlaciona a produção de Pectinase (U/g) com a produtividade dessa enzima (U/gh). Tanto a Figura 24 como a Figura 25 corroboram que o P77C5 foi o melhor fungo produtor da Pectinase.

Observa-se também uma tendência linear sendo correlacionada com os picos de produção e produtividade da pectinase ocorrerem em 24h. Os fungos que não seguem essa lineariedade é porque apresentaram diferentes tempos de picos enzimáticos tanto na produção quanto na produtividade dessa enzima.

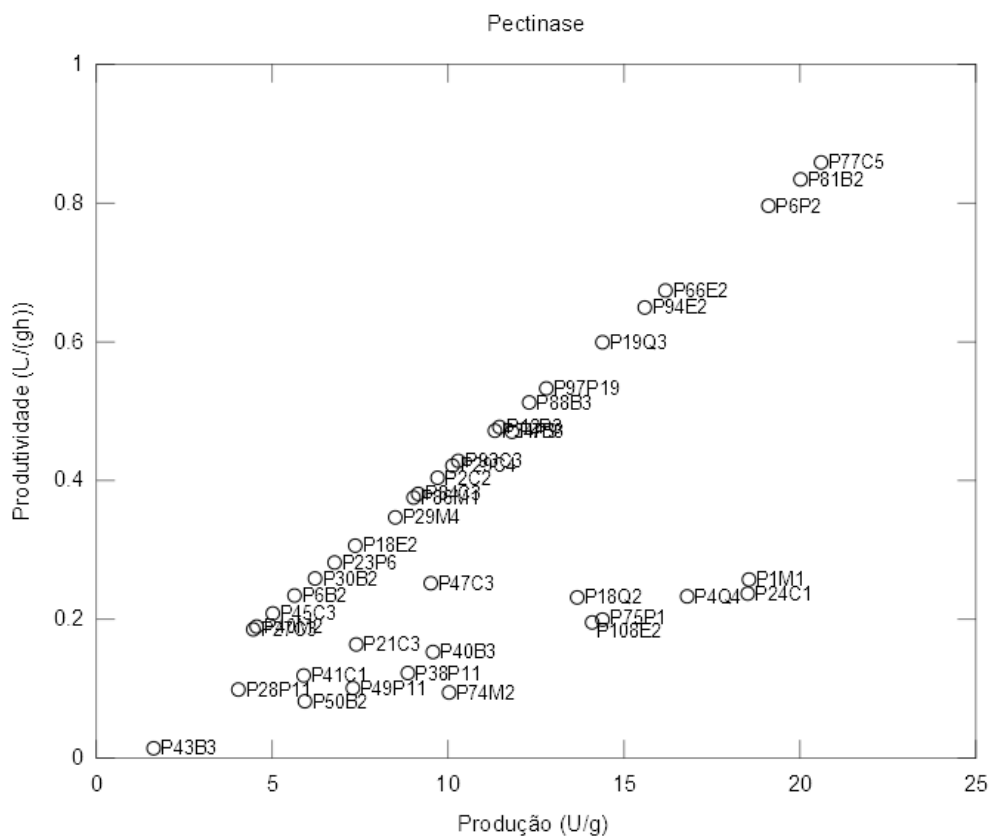


Figura 25: Produção de Pectinase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

A Tabela 16 compara a produção de pectinases de diferentes trabalhos em relação ao presente estudo utilizando diferentes substratos.

Tabela 16: Comparação da produção de Pectinase entre os resultados obtidos nesse trabalho com valores da literatura, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo.

<b>Fungos</b>	<b>Atividade (U/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i> (MTC 4163)	569,00 Ug	(PHUTELA <i>et al.</i> , 2005)
* <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	76,87 Ug	(COURI <i>et al.</i> , 2000)
* <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	30,0 U/g	(SILVA <i>et al.</i> , 2005)
<b>P77C5</b>	<b>20,70 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>
<b>P81B2</b>	<b>20,01 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>

\* fungos mutantes

Os valores obtidos na produção de pectinase desse trabalho são inferiores quando comparados com os da literatura (Tabela 16). Embora o farelo de trigo apresenta-se como fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso e para aumentar a produção de pectinase deve ser feita uma combinação com outros substratos (COURI *et al.*, 2000) para aumentar a indução na produção dessa enzima (SILVA *et al.*, 2005; SOLIS-PEREIRA *et al.*, 1993). Isso pode ser observado no trabalho de Silva e colaboradores (2005) que testaram diferentes fontes de carbono para indução de pectinase, sendo a máxima produção dessa enzima obtida com a mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja.



## **5.6. Produção de FPase pelos fungos isolados da Região Amazônica**

A Figura 26 corresponde aos fungos produtores de FPase e a quantidade de produção dessa enzima por meio da FES durante 10 dias, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo. Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produção desta enzima. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção (U/g) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão.

Dessa forma, os fungos selecionados foram: o P40B3 foi o maior produtor dessa enzima com o pico de produção de 2,46 U/g em 120h e outro destaque foi o P75P1 que obteve produção máxima de 2,25 U/g em 72h (Figura 26).

A reta A da Figura 26 também destaca os fungos P1M1, P4Q4, P30B2 e P66E2 foram: 1,82 U/g em 120h; 1,91 U/g em 120h; 2,09 U/g em 120h; 1,86 U/g em 120h, respectivamente.

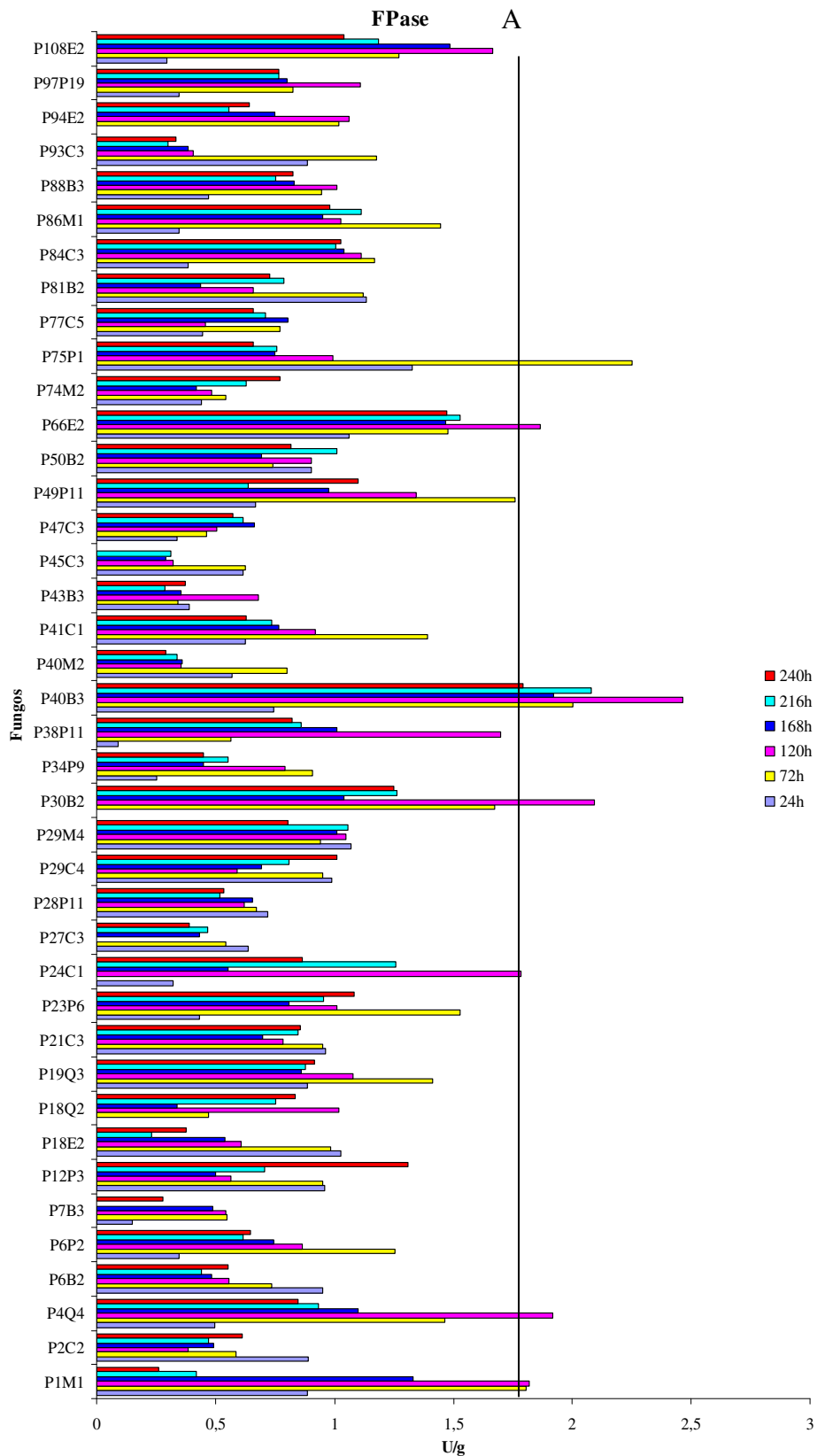


Figura 26: Produção de FPase pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

A Figura 27 que correlaciona a produção de FPase (U/g) com a produtividade dessa enzima (U/gh), demonstra que o fungo P75P1 apresentou a melhor produção dessa enzima em um menor intervalo de tempo. Isso difere do resultado observado na Figura 26 no qual o fungo P40B3 foi apontado como o melhor produtor dessa enzima, pois só considera a produção enzimática independente do tempo para isso ocorrer.

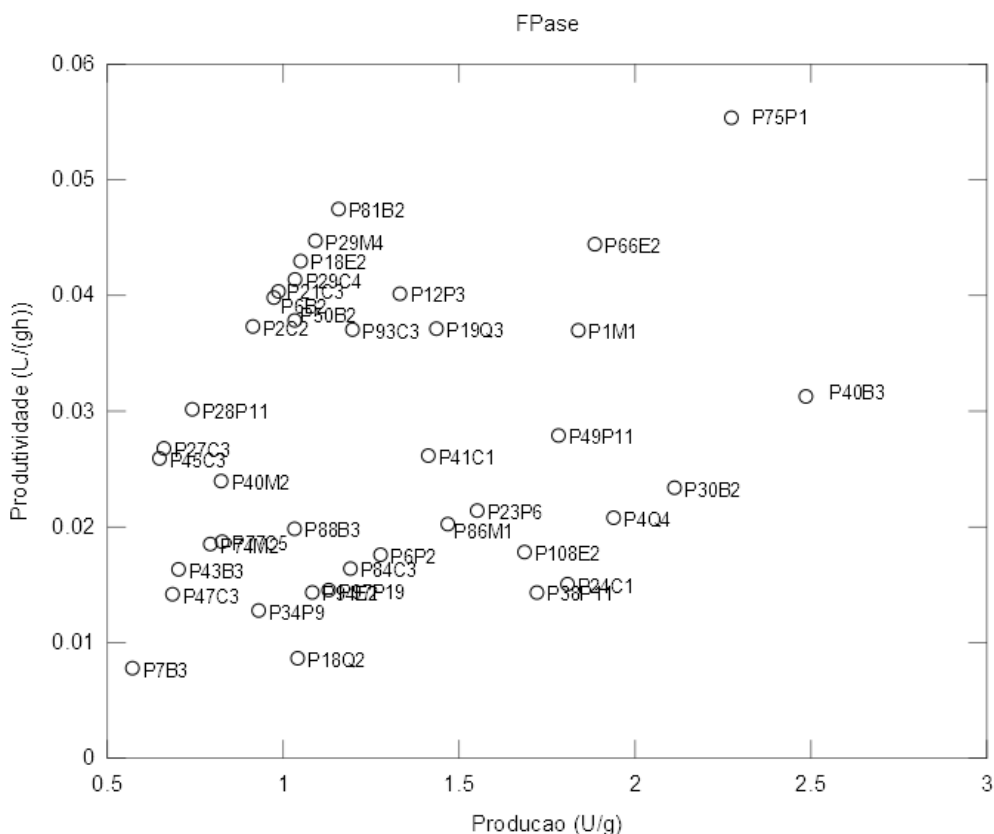


Figura 27: Produção de FPase (U/g) correlacionada com a produtividade (U/gh) pelos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado, durante 10 dias.

A Tabela 17 compara os valores obtidos pelos dois melhores fungos produtores de FPase desse trabalho com os resultados registrados na literatura na produção dessa enzima.

Tabela 17: Comparação da produção de FPase com diferentes cepas de fungos, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo.

<b>Fungos</b>	<b>Atividade (U/g)</b>	<b>Referência</b>
* <i>Aspergillus niger</i> M11	94,00 U/g	(GAO <i>et al.</i> , 2008)
** <i>Aspergillus niger</i> BC-1 e <i>Trichoderma reesei</i> ATCC56765	24,17 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>T. reesei</i> Rut C-30 (ATCC 56765)	22,89 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
* <i>Aspergillus niger</i> BC-1	13,57 U/g	(DHILLON <i>et al.</i> , 2011)
<b>P40B3</b>	<b>2,46 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>
<b>P75P1</b>	<b>2,25 U/g</b>	<b>Presente trabalho</b>

\*fermentação com co-cultivo, \* fungos mutantes.

Os fungos P40B3 e P75P1 produziram uma maior quantidade de FPase, sendo que o P75P1 se destacou em relação aos outros (2,25 U/g). No trabalho de Soni e colaboradores (2010) reportaram uma produção de FPase pelo *A. fumigatus* de 3,37 U/g após 120 horas de cultivo em FES em um estudo de seleção de substratos. No trabalho de Gupte e Madamwar (1997) avaliaram o cultivo isolado dos fungos *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de FPase de 2,1 e 3,75 U/g, respectivamente, após 8 dias de cultivo em FES. Os valores reportados neste trabalho em termos de atividade de FPase usando fungos isolados da região Amazônica são, portanto, da mesma ordem de grandeza ou superiores dos valores reportados na literatura. entretanto é difícil comparar valores com os obtidos dos fungos que foram modificados geneticamente para aumentar a produção de FPase como no fungo *Aspergillus niger* M11 (GAO *et al.*, 2008).

## **5.7. Avaliação das proteínas totais produzidas durante a Fermentação em Estado Sólido (FES) pelos fungos isolados da Região Amazônica**

A Figura 28 mostra a produção de proteínas totais dos fungos isolados. Essa produção segue uma normal em relação a média. Baseando-se nisso, estabeleceu-se um linear, representado pela reta A, tal que apenas 11,5% dos fungos se destacaram na produções proteicas. Para a escolha desse valor, levou-se em consideração os valores de produção ( $\mu\text{g/mL}$ ) que se apresentavam mais afastados da média e de menor desvio padrão. Diante disso, os fungos que apresentaram maior produção proteica foram o P29C4 (451,19  $\mu\text{g/mL}$  em 216h), P49P11 (*Aspergillus ssp.*) (418,72  $\mu\text{g/mL}$  em 72h) e P86M1 (373,80  $\mu\text{g/mL}$  em 72h).

O fungo P29C4 foi maior produtor de proteínas totais em 216h sendo que esse tempo corresponde ao pico de produção da enzima  $\beta$ -Glicosidase desse fungo. Enquanto que o pico de produção da Xilanase do fungo P49P11 (*Aspergillus ssp.*) ocorreu em 72h sendo o mesmo tempo do pico de produção das proteínas totais. Da mesma forma, o fungo P77C5 obteve um pico de produção da enzima Pectinase em 24h que corresponde com o pico de produção de proteínas totais desse fungo.

O fungo P86M1 foi o terceiro melhor produtor de proteínas totais em 72h e esse tempo corresponde ao pico de produção de três enzimas celulósicas, a xilanase, a endoglucanase e a FPase.

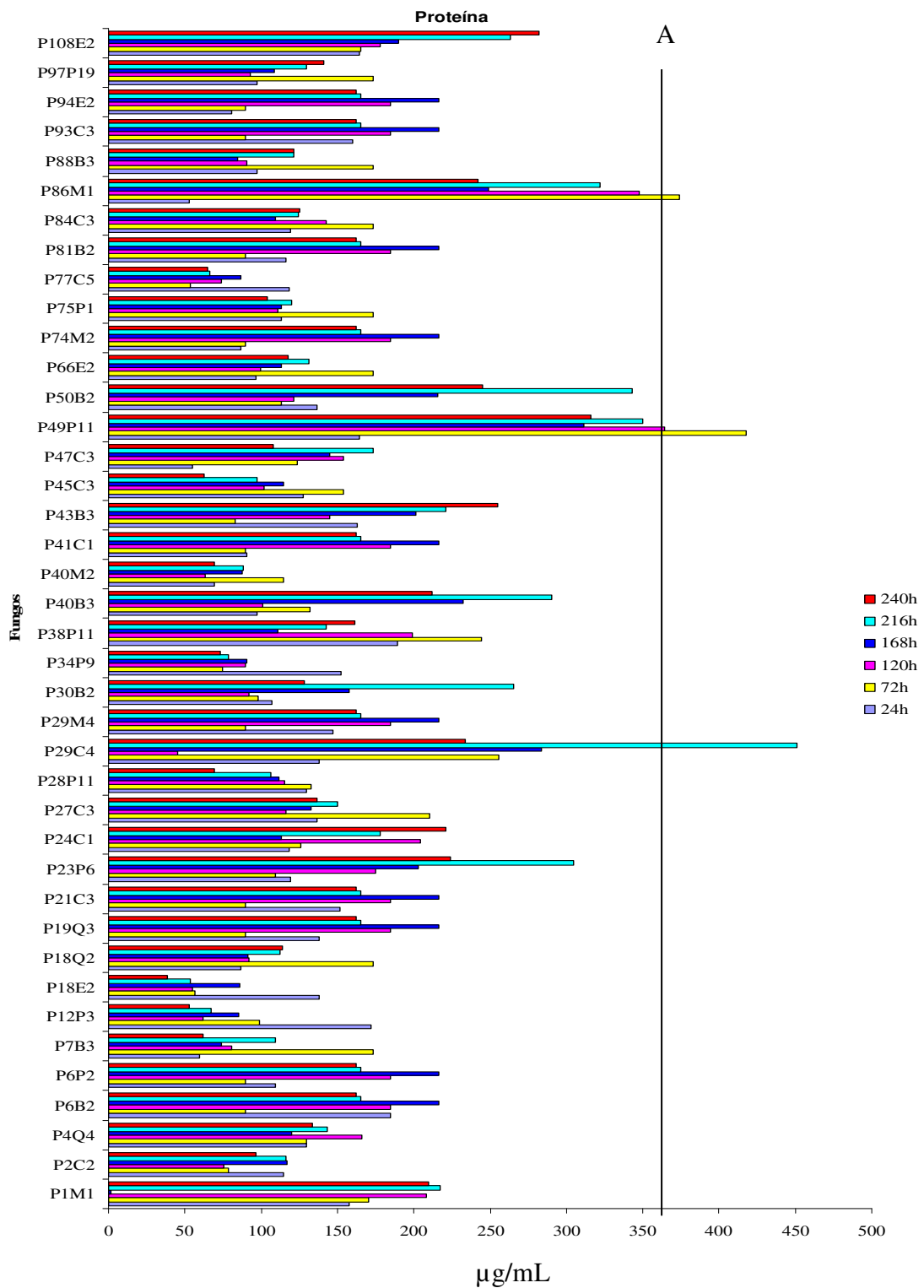


Figura 28: Produção proteica dos fungos isolados da Região Amazônica, por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

O método de Bradford é sensível para detecção de macromoléculas de proteínas que apresentam cadeias laterais básicas ou aromáticas, entretanto apresenta desvantagens como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade (FOUNTOULAKIS; JURANVILLE; MANNEBERG, 1992) ou baixo peso molecular das mesmas (GOREN; LI, 1986).

### **5.8. Seleção dos três melhores fungos produtores de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal**

Os fungos isolados da região amazônica que mais se destacaram no *screening* de produções de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal na FES foram: P6B2 (*Aspergillus oryzae*), como melhor produtor de xilanase, P47C3 (*Aspergillus niger*) como melhor produtor de endoglucanase e  $\beta$ -Glicosidase e o P40B3 como melhor produtor de FPase. Descartou-se a produção de pectinase, pois a produção dessa enzima foi muito baixa ou nula para alguns fungos com mais de 216h de fermentação.

Na segunda etapa deste trabalho os três fungos em destaque na FES foram submetidos a FSm para a avaliação da produção de xilanase, FPase, endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e dosagem das proteínas totais.

## 5.9. Produção de xilanase pelos fungos selecionados submetidos a FSm

Os valores de xilanase durante o cultivo de 120 horas por meio de FSm, tendo como substrato o farelo de trigo, utilizando os fungos, o P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e o P47C3 (*Aspergillus niger*) são mostrados na Figura 29.

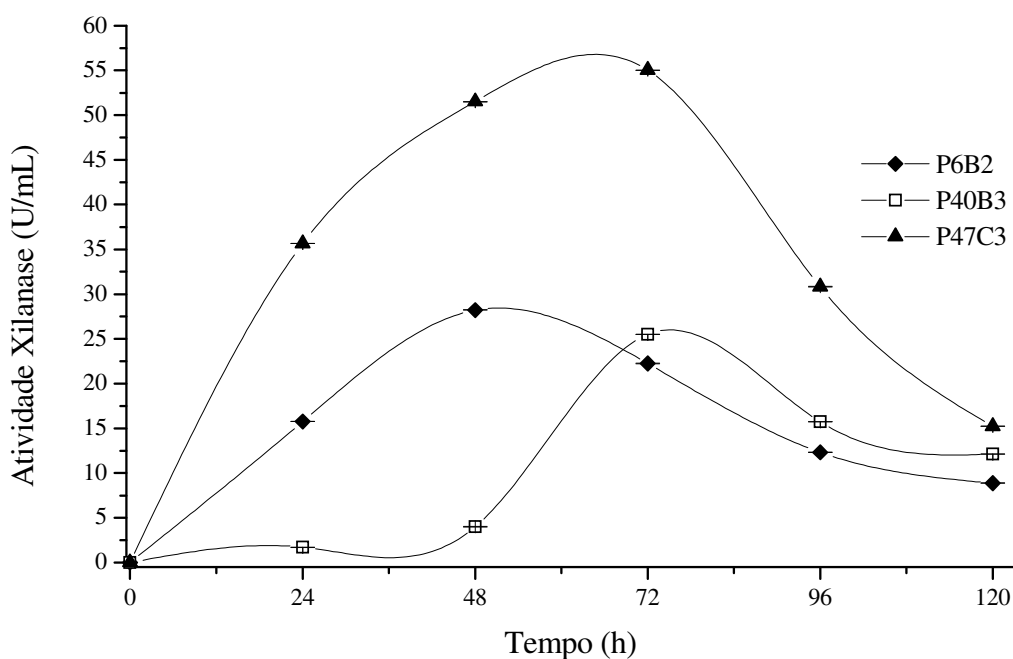


Figura 29: Produção de xilanase pelos fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*), através da FSm utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo lavado.

Os fungos P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*) apresentaram o mesmo pico de produção para a enzima xilanase que foi em 72h com um valor de 25,50 U/mL e 55,04 U/mL, respectivamente. Enquanto que o fungo P6B2 apresentou um pico de produção de 28,22 U/mL em 48h (Figura 29).



Em 72h ocorreu o pico de produção de xilanase de forma semelhante para os três fungos. Após esse período houve uma queda acentuada ao longo do processo fermentativo (Figura 29). Provavelmente, ocorreu um esgotamento dos nutrientes do meio de cultura, de tal forma que ocorreu uma inibição no crescimento do fungo e resultou em diminuição da síntese enzimática. Do mesmo modo, Camacho e Aguiar, 2003 utilizaram o fungo *Aspergillus* sp., tendo como fonte de carbono o farelo de trigo na FSm, resultando na máxima atividade da xilanase em 72h (CAMACHO; AGUILAR, 2003). Entretanto Palma e colaboradores, 1996 utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para a produção da enzima xilanase em um bioreator, tendo como substrato o bagaço de cana, sendo obtida máxima produção em 96h (98,52 U/mL) (PALMA *et al.*, 1996). Gawande e Kamat, 1999 relataram máxima produção da enzima xilanase em 48h de incubação (26,7 U/mL) (GAWANDE; KAMAT, 1999).

O maior fungo produtor de xilanase na FSm foi o P47C3 (*Aspergillus niger*) e a Tabela 18 compara o valor com outros trabalhos que utilizaram diferentes cepas de fungos.

Tabela 18: Comparação da produção de xilanase com os resultados obtidos nesse trabalho e com os valores da literatura, tendo como fonte de carbono o farelo de trigo.

<b>Fungos</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>Referência</b>
** <i>Trichoderma reesei</i> MCG-77	130,00 U/mL	(DOPPELBAUER <i>et al.</i> , 1987)
<i>Aspergillus niger</i>	78,03 U/mL	(AHMAD <i>et al.</i> , 2009)
<b>P47C3 (<i>Aspergillus niger</i>)</b>	<b>55,04 U/mL</b>	<b>Presente trabalho</b>
* <i>Aspergillus niger</i> NRCC 401127	27,07 U/mL	(JOHNSON <i>et al.</i> , 1989)
* <i>Aspergillus awamori</i> VTT-D-75028	12,00 U/mL	(POUTANEN <i>et al.</i> , 1987)
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> BT 2079	8,39 U/mL	(GOMES; GOMES; STEINER, 1994)
* <i>Aspergillus niger</i> ANL 301	6,47 U/mL	(OKAFOR <i>et al.</i> , 2007)
* <i>Pleurotus ostreatus</i> SYJ042	2,67 U/mL	(QINNGHE <i>et al.</i> , 2004)

\*\* meio de cultivo utilizado foi palha de trigo tratada no vapor, \* Fungos mutantes

Nos diferentes trabalhos de Poutanen e colaboradores (1987) e Okafor e colaboradores (2007) submeteram uma cepa mutante de *Aspergillus niger* e apresentaram uma produção de xilanase de: 12,00 U/mL e 6,47 U/mL respectivamente,

sendo esses valores inferiores ao resultado obtido (55,04 U/mL) pelo fungo selvagem P47C3 (*Aspergillus niger*) (Tabela 18).

Outro destaque é que o fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) foi maior produtor de xilanase na FSm, enquanto que o P6B2 (*Aspergillus oryzae*) foi o maior produtor de xilanase na FES.

Porém a produção enzimática do fungo isolado da Região Amazônica foi inferior quando comparados com os dois primeiros trabalhos da Tabela 18, pois ocorreram o uso do pré-tratamento com ácido (NaOH) da palha de trigo e além disso a maioria destes fungos eram mutantes. Portanto, o fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) apresentou uma boa produção de xilanase.

## 5.10. Produção de endoglucanase pelos fungos selecionados submetidos a FSm

A Figura 30 mostra os resultados da atividade enzimática da endoglucanase resultante da FSm durante 120 horas produzidas pelos fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*).

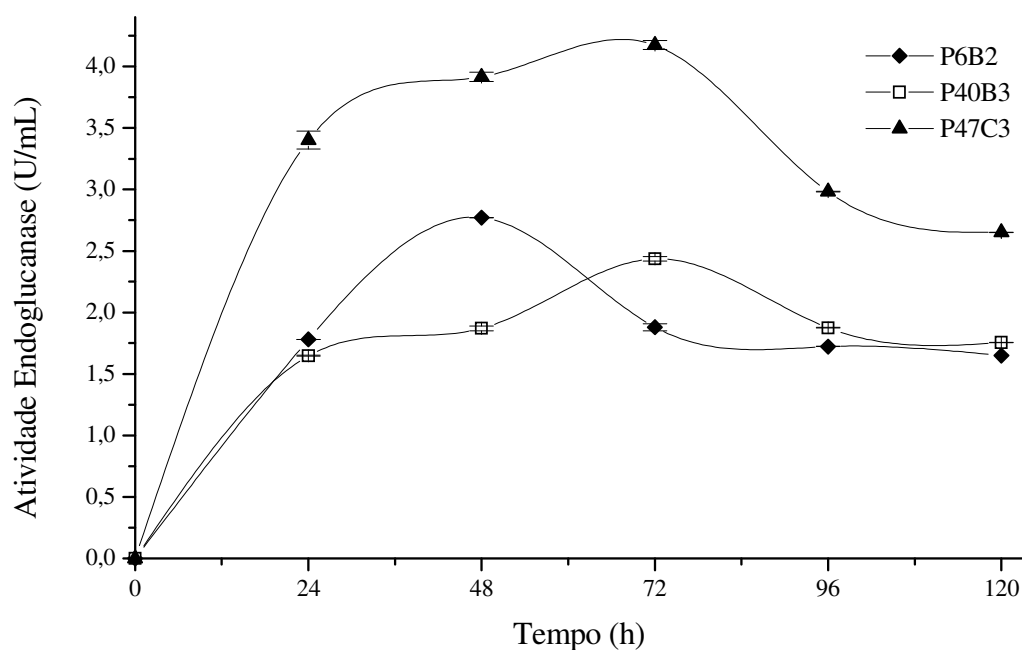


Figura 30: Produção de Endoglucanase pelos fungos: P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3; P47C3 (*Aspergillus niger*).

O pico na produção de endoglucanase ocorreu em 72h para os fungos P40B3 (2,43 U/mL) e P47C3 (*Aspergillus niger*) (4,17 U/mL), enquanto que o fungo P6B2 (*Aspergillus oryzae*) apresentou o pico da produção enzimática em 48h (2,77 U/mL) (Figura 30). O tempo de produção ótimo para fungo *Aspergillus niger* foi de 72h (MRUDULA; MURUGAMMAL, 2011).

A Tabela 19 compara o valor obtido pelo fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) com outros trabalhos registrados na literatura.

Tabela 19: Comparação da produção de endoglucanase pelo fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) com outros trabalhos registrados na literatura, usando como substrato farelo de trigo.

<b>Fungos</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>Referência</b>
* <i>Aspergillus fumigatus</i> SMN1	321 U/mL	(SAQIB <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus heteromorphous</i>	83,00 U/mL	(SINGH; SINGH, BISHNOI, 2009)
<b>P47C3 (<i>Aspergillus niger</i>)</b>	<b>4,17 U/mL</b>	<b>Presente Trabalho</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,72 U/mL	(MRUDULA; MURUGAMMAL, 2011)
* <i>Aspergillus fumigatus</i> FBSPE-05	0,153 U/mL	(GRIGOREVSKI-LIMA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Scytalidium thermophilum</i>	0,13 U/mL	(ÖGEL <i>et al.</i> , 2001)

\* fungos mutantes

O fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) apresentou uma menor produção de endoglucanase que nos cinco primeiros trabalhos da Tabela 19, porém é difícil comparar com fungos mutantes como *Aspergillus fumigatus* SMN1, pois essa cepa secretou uma grande quantidade dessa enzima (321 U/mL) (SAQIB *et al.*, 2010). Entretanto o fungo mutante *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 apresentou uma produção de endoglucanase menor (0,153 U/mL) do que o resultado obtido nesse trabalho (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2009).

A queda na produção pode ser explicada como uma depressão dos macro e micronutrientes no meio de fermentação, o qual resulta em um estress físico para fungo (NOCHURE; ROBERTS; DEMAINE, 1993).

A produção de endoglucanase pelo P47C3 (*Aspergillus niger*) foi superior em relação aos cinco últimos trabalhos da Tabela 19. Dentre esses se destaca o trabalho do Mrudula e Murugammal (2011) que utilizaram o fungo selvagem *Aspergillus fumigatus* e obtiveram a produção enzimática de 0,72 U/mL utilizando o farelo de trigo como substrato nas mesmas condições de FSm deste trabalho. Portanto o fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) foi um bom produtor de endoglucanase na FSm.

## 5.11. Produção de $\beta$ -Glicosidase pelos fungos selecionados submetidos a FSm

A Figura 31 mostra os resultados da atividade enzimática da  $\beta$ -Glicosidase resultante da FSm durante 120 horas produzidas pelos fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*).

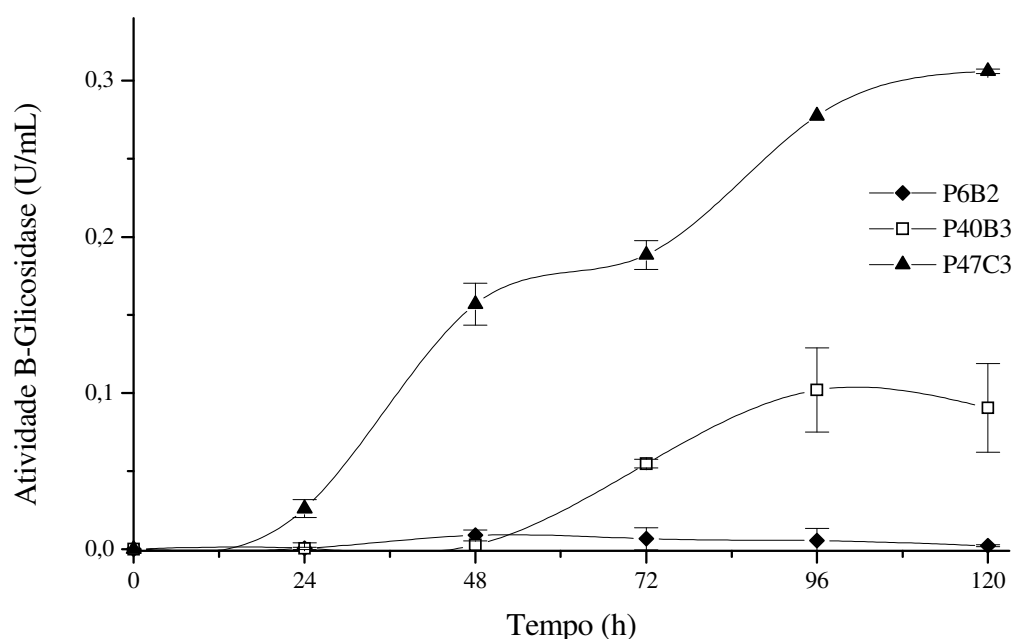


Figura 31: Produção de  $\beta$ -Glicosidase pelos fungos: P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3; P47C3 (*Aspergillus niger*); P84C3.

O maior produtor de  $\beta$ -Glicosidase foi o fungo P47C3 (*Aspergillus niger*), com atividade de 0,31 U/mL em 120h, enquanto que o fungo P40B3 produziu uma quantidade da enzima, com atividade de 0,10 U/mL em 96h. O fungo P6B2 não apresentou uma atividade enzimática abaixo de 0,09 U/mL. A produção máxima da enzima  $\beta$ -Glicosidase pelo fungo *Aspergillus phoenicis* ocorreu em 12 dias de cultivo (GEIMBA *et al.*, 1999), possivelmente o pico da enzima  $\beta$ -Glicosidase do fungo P47C3 (*Aspergillus niger*) não ocorreu em 120h, portanto é necessário um tempo maior de

cultivo isso também pode ser atribuído a baixa produtividade nos fungos P6B2 e P40B3 pode ser resultante devido ao elevado tempo de produção dessa celulase (Figura 31).

O gênero *Aspergillus* é um bom produtor da enzima  $\beta$ -Glicosidase na FSm (WEN; LIAO; CHEN, 2005). A produção de  $\beta$ -Glicosidase é também descrita em outros fungos. Thygesen e colaboradores, 2003 tiveram elevadas produção de  $\beta$ -Glicosidase em *Botrytis cinerea* e *Penicillium brasilianum* quando comparado com os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, cultivados em palha de trigo (THYGESSEN *et al.*, 2003).

O fungo *Aspergillus fumigatus* produziu uma quantidade de  $\beta$ -Glicosidase de 0,40 U/mL utilizando como fonte de carbono o resíduo industrial, palha de trigo. Nesse mesmo trabalho os fungos *Sporotrichum thermophile* produziu uma quantidade de 0,47 U/mL (LATIF; RAJOKA; MALIK, 1995).

O fungo *Trichoderma reesei* MCG-77 produziu uma quantidade de  $\beta$ -Glicosidase de 0,72 U/mL utilizando palha de trigo não pré-tratada, mas quando ocorre um pré-tratamento da palha de trigo com ácido (NaOH) a atividade enzimática é maior (1,04 U/mL) (DOPPELBAUER *et al.*, 1987).

O fungo selvagem *Aspergillus niger* (P47C3) produziu uma menor quantidade de  $\beta$ -Glicosidase com relação aos valores citados acima, mas considerando o fato de ser um microrganismo ser selvagem e que não foi realizado uma otimização da produção, nem mesmo pré-tratamento do substrato utilizado como fonte de carbono como no trabalho de Doppelbauer e colaboradores (1987) pode-se inferir que esse fungo foi um bom produtor dessa enzima.

## 5.12. Produção de FPase pelos fungos selecionados submetidos a FSm

A Figura 32 mostra os resultados da atividade enzimática da FPase resultante da FSm durante 120 horas produzidas pelos fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*).

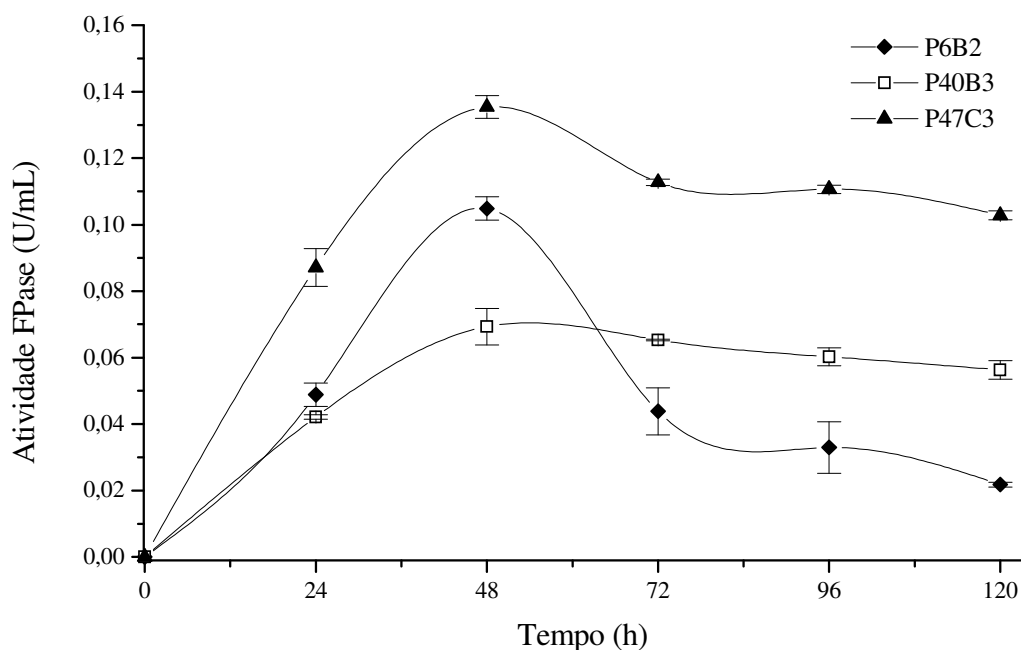


Figura 32: Produção de FPase pelos fungos: P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3; P47C3 (*Aspergillus niger*).

Observa-se pela Figura 32 mostra que o pico de produção da enzima FPase para os três fungos, ocorreu em 48h. O maior fungo produtor de FPase foi o P47C3 (*Aspergillus niger*) com produção máxima de 0,13 U/mL. O fungo P6B2 (*Aspergillus oryzae*) apresentou um valor de 0,10 U/mL, sendo que a produção da FPase por esse fungo apresentou uma queda acentuada após 48 horas de cultivo, e em 120 horas de fermentação, o valor da produção foi 0,02 U/mL. No entanto, os fungos P40B3 e P47C3

(*Aspergillus niger*) apresentaram uma leve variação na produção dessa enzima, sendo que o valor da produção em 120h foi de 0,05 U/mL e 0,10 U/mL, respectivamente.

Poutanen (1987) utilizaram o fungo mutante *Aspergillus awamori* VTT-D-75028 que apresentou uma produção de FPase de 3,1 U/mL tendo como fonte de carbono o farelo de trigo (POUTANEN *et al.*, 1987). Um valor semelhante foi encontrado no trabalho de Singh e colaboradores (2009) foi de 3,2 U/mL, porém o fungo utilizado foi o *Aspergillus heteromorphous* (SINGH; SINGH, BISHNOI, 2009).

No trabalho do Dopplbauer e colaboradores (1988) utilizaram o fungo mutante *Trichoderma reesei* MCG-77 e a fonte de carbono foi a palha de trigo sem tratamento e obtiveram 1,1 U/mL de FPase (DOPPELBAUER *et al.*, 1987).

O fungo isolado da região Amazônica, *Aspergillus niger* (P47C3), não foi um bom produtor de FPase quando comparados com os valores da literatura.



### 5.13. Produção de Proteína Totais pelos fungos selecionados submetidos a FS<sub>m</sub>

A Figura 33 ilustra a produção de proteínas totais pelos fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*) durante a FS<sub>m</sub> em 120 horas de cultivo.

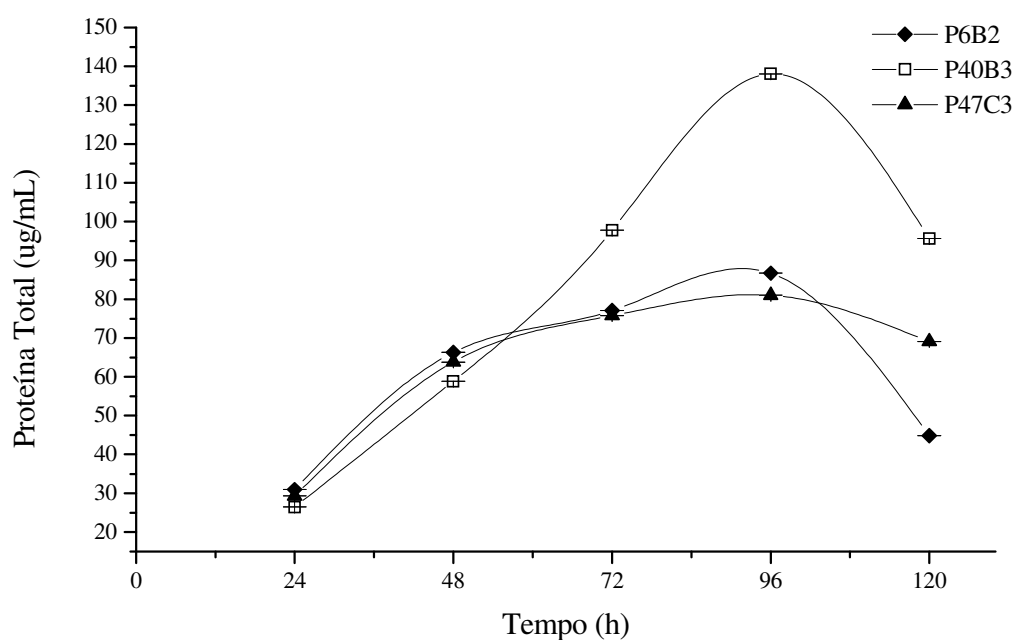


Figura 33: Produção de proteínas totais durante a FS pelos fungos: P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3; P47C3 (*Aspergillus niger*).

O pico na produção de proteínas ocorreu em 96 horas de cultivo para os três fungos. A produção máxima de proteínas totais foi de 86,70  $\mu\text{g/mL}$ , 138,09  $\mu\text{g/mL}$  e 81,03  $\mu\text{g/mL}$ , para os fungos P6B2 (*Aspergillus oryzae*), P40B3 e P47C3 (*Aspergillus niger*), respectivamente (Figura 33).

#### **5.14. Seleção do melhor fungo produtor de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal na FSm**

O melhor fungo produtor de celulase da FSm foi o P47C3 identificado como *Aspergillus niger*. Este apresentou melhor produção de xilanase (55,04 U/mL em 72h) ; de endoglucanase (4,17 U/mL em 72h); FPase (0,13 U/mL em 48h) e de  $\beta$ -glicosidase (0,30 U/mL em 120h) de acordo com as Figuras 29, 30, 31 e 32, respectivamente. Portanto, o fungo P47C3, *Aspergillus niger*, foi o selecionado para a terceira etapa desse trabalho.

A última etapa envolveu a escolha de uma enzima relacionada à degradação da biomassa vegetal que não tem sua estrutura proteica elucidada. Entretanto, as enzimas do *screening* desse trabalho produzidas principalmente pelo *Aspergillus niger*, tem a grande maioria das estruturas proteicas bem conhecidas e depositadas em bancos de dados, como PDB (*Protein Data Bank*). Dessa forma a escolha da  $\beta$ -Galactosidase produzida pelo *Aspergillus niger* justificou-se baseado neste fato, pois desconhece a estrutura tridimensional dessa enzima. Essa etapa contou com a colaboração do pesquisador Dr. Alexander Golubev do Instituto de Física Nuclear em São Petesburgo-Rússia.

A purificação da  $\beta$ -Galactosidase é a fase essencial para a obtenção de cristais dessa proteína. Os mesmos são conificados com nitrogênio líquido e posteriormente são submetidos a difração de raio X o qual releva todas as coordenadas dos átomos e assim obter o mapa da densidade eletrônica que define a forma tridimensional da proteína.

## 5.15. Produção de $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* (P47C3)

Primeiramente os micélios do fungo *Aspergillus niger* foram cultivados com o meio descrito no item 4.4. Porém para aumentar a indução de  $\beta$ -Galactosidase, o meio foi suplementado com 1% de lactose para verificar se esse carboidrato seria indutor na síntese  $\beta$ -Galactosidase (Figura 34).

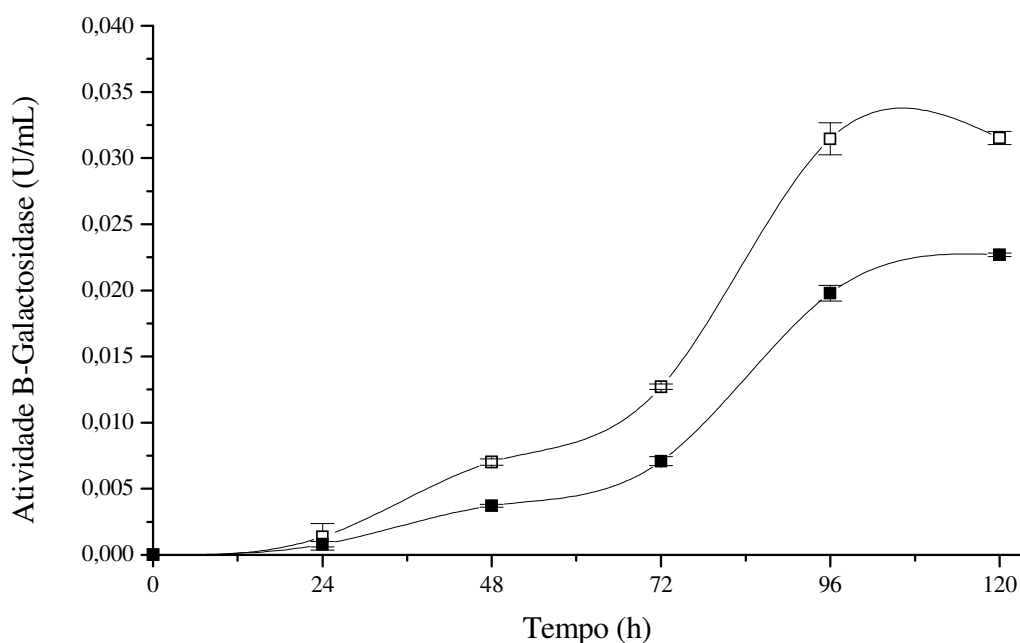


Figura 34: Produção da enzima  $\beta$ -Galactosidase durante cinco dias de FSm, com suplementação de lactose no meio (□) e sem suplementação de lactose no meio (■).

Observa-se pela Figura 34 que a produção de  $\beta$ -Galactosidase foi maior quando o meio foi suplementado com lactose, sendo portanto a lactose é um bom indutor dessa enzima.

Cultivos utilizando outros microrganismos para a produção de  $\beta$ -Galactosidase são reportados na literatura.

No trabalho de Kowalewska-Piontas e Bednarski (2003) a avaliação da biossíntese de  $\beta$ -Galactosidase pela cepa de levedura de *Candida sphaerica* WKIIW3b e *Kluyveromyces fragilis* 28 e cepa fúngica *Penicillium canescens* cresceram em meios com lactose e sem lactose e assim como nesse trabalho, ocorreu uma maior produção de  $\beta$ -Galactosidase quando a lactose estava presente no meio de cultivo dos três microrganismos, porém outros oligossacarídeos presentes no meio de cultivo podem ter auxiliado na indução dessa enzimas, tais como o farelo de trigo ou farelo de soja. Em destaque, a levedura *Candida sphaerica* WKIIW3b apresentou uma síntese maior de  $\beta$ -Galactosidase nas três culturas de crescimento que continham lactose (1,73; 3,35; 3,46 AU/cm<sup>3</sup>), em relação as outras três culturas que não continham lactose no meio (1,32; 0,76 e 0,29 AU/cm<sup>3</sup>).

Entretanto no trabalho de Nevalainen (1981) depois de um tratamento mutagenico do *Aspergillus niger* VTT-D-79106 com N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, esse fungo foi submetido a fermentação em shaker sendo o meio de cultivo suplementado com 2% de lactose, porém a lactose não foi indutor de  $\beta$ -Galactosidase (NEVALAINEN, 1981).

Paszewski e colaboradores (1970) utilizaram o fungo *Aspergillus nidulans* e corroboram que a enzima  $\beta$ -Galactosidase é induzida na presença de lactose no meio (PASZEWSKI *et al.*, 1970).

O mesmo procedimento foi realizado por Fantes e Roberts (1973) que cultivaram os micélios do fungo *Aspergillus nidulans* R21 e observaram que o fungo produzia 30 vezes mais  $\beta$ -Galactosidase quando o meio continha lactose como única fonte de carbono. Quando o meio de cultivo continha duas fontes de carbono como lactose e glicose, a quantidade da  $\beta$ -Galactosidase diminuía drasticamente, pois provavelmente há uma indução da via glicolítica (FANTES; ROBERTS, 1973).

## 5.16. Purificação e isolamento da enzima $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*

No fim de cinco dias de FSm, o meio líquido, como descrito no item 4.4, foi filtrado a 10000 g para separar os micélios das enzimas secretadas pelo fungo, posteriormente foi submetido às etapas de purificação.

Durante as etapas de purificação, a atividade da  $\beta$ -Galactosidase foi determinada utilizando o substrato PNPG, como descrito no item 4.5.6 e a concentração de proteína que foram monitoradas por absorbância a 280 nm no AKTA e pelo método de Bradford conforme descrito no item 4.7. Os resultados das etapas da purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* está representada na Tabela 20.

Tabela 20: Resumo das etapas de purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*.

<b>Etapa</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>Atividade Específica (U/mg)</b>	<b>Fator de Purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	0,0721	0,0121	0,168	1,00	100
<b>SP-Sephadex C-50</b>	0,1473	0,0310	0,210	1,25	19,51
<b>SP-Sephadex C-50</b>	0,0647	0,0321	0,496	2,96	1,93
<b>Sephacryl S-200</b>	0,0364	0,0323	0,887	5,29	24,84

Na primeira etapa da purificação, o extrato bruto (5000 mL) foi dialisado contra 50mM de tampão acetato de sódio pH 4,0, com duas trocas de tampão durante a noite. Após dessalinizado foi submetido a cromatografia de troca iônica na resina SP - Sephadex C-50 equilibrada com 50 mM de tampão acetato de sódio, pH 4,0, sendo que as proteínas foram eluídas com um gradiente salino crescente (0-0,5M), formado por um volume de coluna de 50 mM tampão acetato de sódio pH 4,0. A cromatografia foi

realizada a temperatura ambiente, resultando em um pico único, com volume total de 100 mL (Figura 35).

As proteínas foram detectadas por equipamento de bancada Biorad Detector com detector UV acoplado a uma bomba peristáltica. O volume de 100 mL foi dialisado contra 2L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, sendo realizado duas trocas durante a noite.

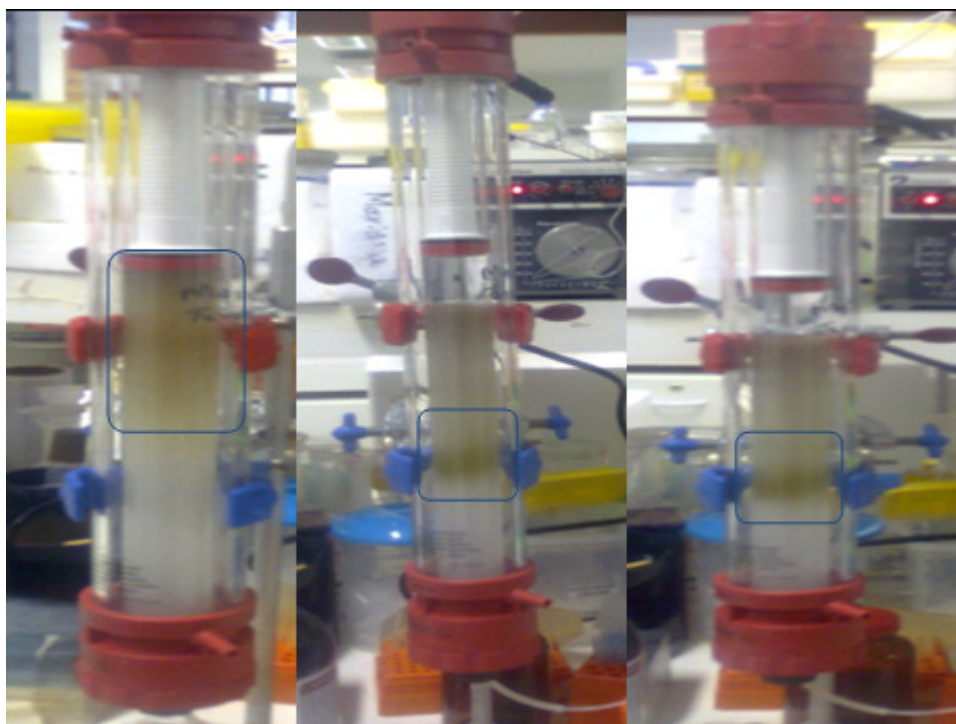


Figura 35: Eluição da proteína na coluna cromatográfica com a resina SP-Sephadex C-50.

Nesta fase a atividade específica da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* foi: 0,210 U/mg, um fator de purificação de 1,25 e a taxa de recuperação da enzima foi de 19,51%.

Nos trabalhos de purificação de  $\beta$ -Galactosidase são reportados na literatura, dentre esses se destacam Akasaki e colaboradores (1976) utilizaram a resina CM-Sephadex C-50 na primeira etapa de purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase da

preparação comercial FERM-P1680 obtida do fungo *Aspergillus niger* RT 102, com um rendimento de 79% (AKASAKI *et al.*, 1976).

Muitos autores utilizam como primeira etapa da purificação a precipitação das proteínas com sal, como o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sendo frequentemente utilizado para esse propósito em virtude da sua alta solubilidade em água.

Sykes e colaboradores (1982) utilizaram esse método para a purificação da enzima β-Galactosidase da preparação comercial (Rhozyme HP-150) obtida das enzimas do fungo *Aspergillus niger* (SYKES *et al.*, 1983). Gindy (2003) isolou o fungo *Aspergillus carbonarius* do solo, no Egito, precipitou as proteínas do extrato bruto com o sulfato de amônio, conseguindo um rendimento de 94,5% da purificação da β-Galactosidase (EL-GINDY, 2003).

O mesmo procedimento foi descrito por Zoltán Nagy e colaboradores (2001) que utilizaram o fungo *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237. O extrato bruto foi submetido a uma purificação parcial com sulfato de amônio e conseguiram um rendimento de 47% (NAGY *et al.*, 2001).

Park e colaboradores (1979) obtiveram a β-Galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae* utilizando 80% de sulfato de amônio para a precipitação das proteínas. A atividade específica da enzima β-Galactosidase aumentou em relação ao extrato bruto de 0,42 U/mg para 40,0 U/mg, respectivamente (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979).

Quando o sal é adicionado no meio aquoso que contém proteínas, as cargas provenientes da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas proteicas, diminuindo assim a interação entre elas. Consequentemente há um aumento da solubilidade das proteínas no meio aquoso, as moléculas de água interagem tanto com as proteínas como com os íons provenientes da dissociação do sal, caracterizando o processo de precipitação das proteínas (LEHNINGHER, 2000).

A precipitação de proteínas pela alta 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. Neste estudo foram realizados testes em diferentes concentrações de sulfato de amônio, porém a enzima  $\beta$ -Galactosidase precipitava-se em baixas concentrações de sais, portanto não foi possível realizar a separação dessa enzima das demais proteínas presente no extrato bruto.

O volume total da etapa anterior (100 mL) foi submetido a cromatografia de troca iônica na coluna SP -TSK 5PW (21,5 x 150 mm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0.

As proteínas foram eluídas, com taxa de fluxo a 1 mL/min, por meio de um gradiente salino crescente (0-0,5M de NaCl) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, formado por cinco volumes de coluna de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, acrescidos de 0,5 M de NaCl. Assim como na etapa anterior, a cromatografia foi realizada a temperatura ambiente e as frações contendo atividade  $\beta$ -Galactosidase foram reunidas e o volume final foi de 50 mL.

O perfil da cromatografia revelou a presença de pelo menos dois picos, esses picos foram denominados F1 e F2. Somente a fração F1 continha as atividades  $\beta$ -Galactosidase produzidas pelo *Aspergillus niger* e um conjunto de proteínas indesejáveis foram eliminadas (Figura 36). Nessa etapa, o fator de purificação foi de 2,96 (Tabela 20).



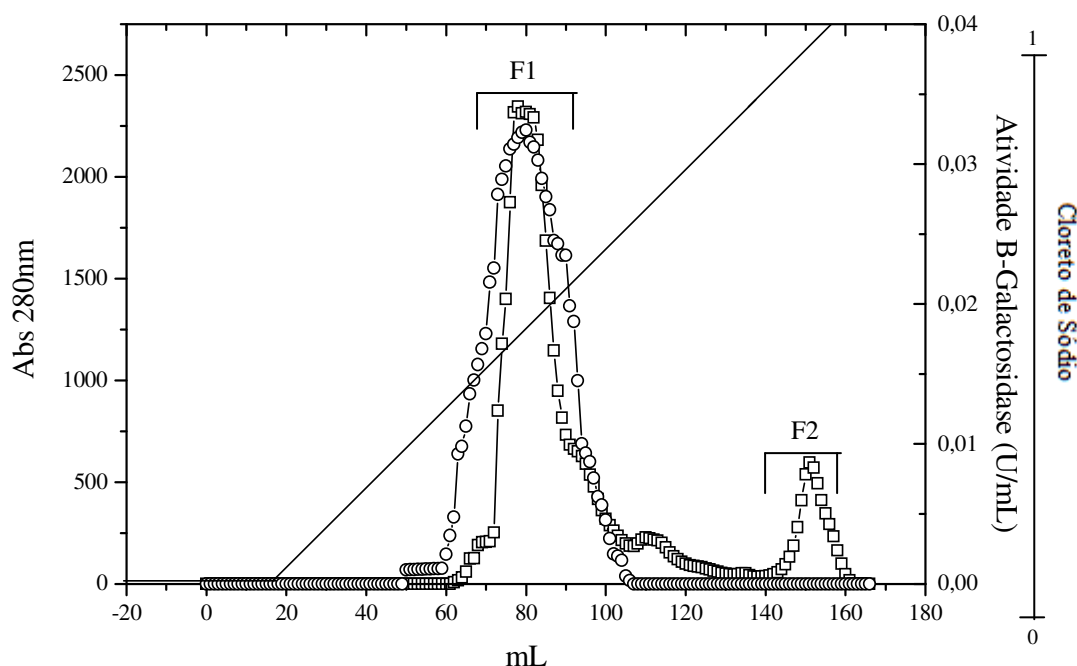


Figura 36: Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo  $\beta$ -Galactosidase, somente na fração 1, de *Aspergillus niger* em resina Sephadex. A absorbância ( $\square$ ), atividade  $\beta$ -Galactosidase ( $\circ$ ), gradiente de NaCl (0-0,5M) representado por ( $\nearrow$ ).

A  $\beta$ -Galactosidase das famílias GH 2 são normalmente purificadas em colunas de troca iônica, devido a forma estrutural de suas proteínas, normalmente representados por dímeros ou monômeros, sendo o pI da  $\beta$ -Galactosidase produzida por *Aspergillus* ssp. são valores superiores a 4,0.

Manzanares e colaboradores (1998) purificaram a enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* N400. O pI apresentou um valor de 4,6 (MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER, 1998), a valores obtidos de *Aspergillus fonsecaus* isolado de cacau foi de 4,2 (GONZALEZ; MONSAN, 1991). Semelhante valor foi encontrado no trabalho de Widmer e Leuba (1979) foram isolados três isoformas de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* e o ponto isoelétrico foi estimado em 4,6 (WIDMER; LEUBA, 1979; WIDMER; GREENBERG; MAHONEY, 1981). Os maiores valores reportados

foram encontrados no trabalho de Casteren e colaboradores (2000) em que reportaram um valor de pI do fungo *Aspergillus aculeatus* compreendido entre 5,3 e 5,7. Tanto a resina SP-Sephadex C-50 como a coluna SP-TSK 5PW apresentam as mesmas características, sendo colunas de troca catiônicas. Como a purificação ocorreu com tampão 50mM acetato de sódio, pH 4,0, em vista disso, o pH apresentava um valor menor que o do pI, então a enzima  $\beta$ -Galactosidase possuía predominantemente cargas positivas (LENINGHER, 2000). Por isso a proteína foi adsorvida à coluna e quando o sal (NaCl) era introduzido no sistema, ocorria uma troca da enzima  $\beta$ -Galactosidase pelo sódio, essa então era eluída quando a concentração de sal atingia um gradiente de 30%.

Na literatura, a  $\beta$ -Galactosidase foi purificada de vários microrganismos diferentes. A maioria dos trabalhos (Tabela 21) utilizam nas etapas de purificação a coluna DEAE (dietilaminoetil), tendo uma propriedade de troca aniônica.

Tabela 21: Purificação da  $\beta$ -Galactosidase utilizando a coluna DEAE.

Fungo	Coluna	Atividade específica		Recuperação da enzima			Referência
		U/mg	Substrato	Tampão	pH	(%)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	DEAE-Sephadex			0,05M acetato de sódio			(PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979)
	A-50	106	ONPG		5	-	
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Shepharose			50mM Tris HCl	7,8	88,6	(WIDMER; LEUBA, 1979)
	CL-6B	83,30	ONPG				(SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999b)
<i>Rhizomucor</i> sp.	DEAE-Celulose I	25,71	PNPG	fosfato de sódio	7,2	72	(SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999b)
				20mM			
<i>Rhizomucor</i> sp.	DEAE-Celulose II	33,00	PNPG	fosfato de sódio	7,2	66	(SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999b)
				20mM			
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DEAE-Sephadex			0,01 M citrato			(NAGY <i>et al.</i> , 2001)
	NCAIM 00237	3,74	ONPG	fosfato de sódio	7	15	(MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER, 1998)
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Sephadex			20mM fosfato de sódio	6	80,4	(SYKES <i>et al.</i> , 1983)
	A-50	2,18	PNPG				
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Sephadex			50mM fosfato de sódio	6,8	67	(SYKES <i>et al.</i> , 1983)
	A-50 (I)	79	PNPG				
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Sephadex			50mM fosfato de sódio	6,8	46	(SYKES <i>et al.</i> , 1983)
	A-50 (II)	116	PNPG				(OSIRIPHUN; JATURAPIREE, 2009)
Termófilo B1.2	DEAE-Sepharose	0,65	ONPG	fosfato de sódio	6,5	94	
				0,05mM			
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Sephadex			fosfato de sódio			(TANAKA <i>et al.</i> , 1975)
	RT 102	40,7	ONPG		7	21,5	

\*(-) Dados não mostrados.

Nesse trabalho foram realizados testes iniciais com a coluna (21,5 x 150 mm) DEAE Sephadex (Shodex-coluna HPLC) equilibrada com o tampão 500 mM acetato de

sódio, pH 4,5 porém a  $\beta$ -Galactosidase não aderiu à coluna, sendo eluída antes de iniciar o gradiente de cloreto de sódio.

As frações que continham maior atividade  $\beta$ -Galactosidase no pico F1 foram reunidas e posteriormente foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, utilizando o tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0. O perfil dessa cromatografia está representado na Figura 37.

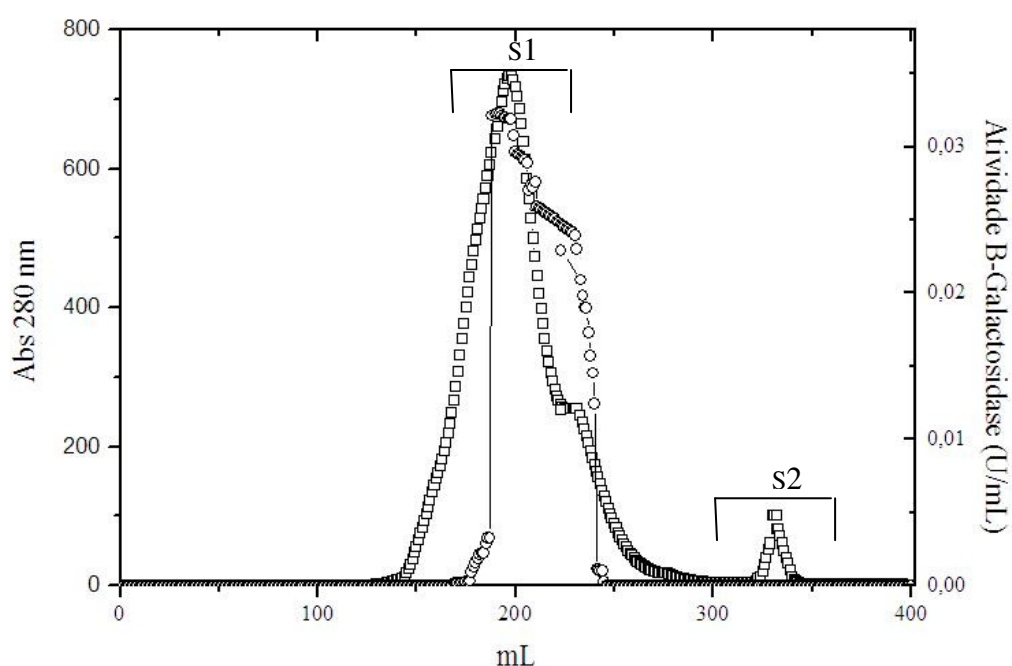


Figura 37: Perfil cromatográfico da fração enzimática S1, contendo  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* em resina Sephacryl S-200. Atividade de  $\beta$ -Galactosidase ( $\circ$ ) e proteínas ( $\square$ ).

O perfil cromatográfico de exclusão molecular apresentou dois picos, mas a atividade de  $\beta$ -Galactosidase estava presente somente no pico S1 (Figura 37). As frações eluídas da Sephacryl S-200 que apresentaram atividade  $\beta$ -Galactosidase foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, 10% sob condições desnaturantes. A análise eletroforética revelou a presença de uma banda intensa no final do processo de

purificação permitindo afirmar a indicação enzimática de um alto grau de pureza (Figura 38). As frações purificadas foram reunidas resultando no final do processo um volume de 2,0 mL.

Ao final do processo de purificação, a enzima apresentou um fator de purificação de 5,29, com rendimento de 24,84% (Tabela 20). Shaikh e colaboradores, 1999, utilizaram a resina Sephacryl S-300 como etapa final da purificação da enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Rhizomucor* sp. A coluna foi equilibrada com 20mM de tampão citrato fosfato, pH 4,5, a recuperação da enzima no final do processo foi de 36%, porém foi realizada uma recromatografia. Nessa nova etapa, a atividade específica aumentou de 195 U/mg para 200 U/mg (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999).

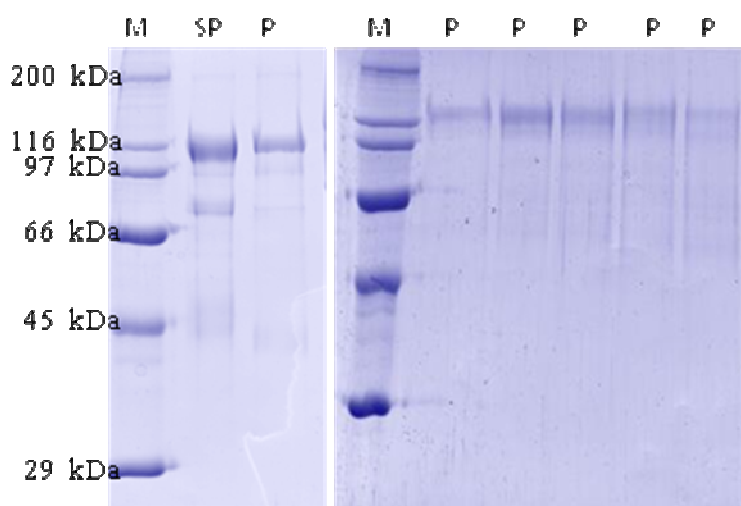


Figura 38: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 10%), corado com *Cromassie Blue*, de amostra de  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*. Cada poço continha 10  $\mu$ g/mL de proteína. A esquerda observa-se os marcadores de massa molecular; frações obtidas da cromatografia de troca iônica da resina Sephadex (SP) e as frações enzimáticas que continham a  $\beta$ -Galactosidase purificada após cromatografia em Sephacryl S-200 (P), e o marcador representado (M).

## 5.17. Estimativa da massa molecular

A massa molecular da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* purificada foi estimada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a distância percorrida no gel SDS-PAGE (Figura 39).

Para a distância de 8 mm percorrida pela enzima foi estimado o valor da massa molecular de aproximadamente de 125 kDa.

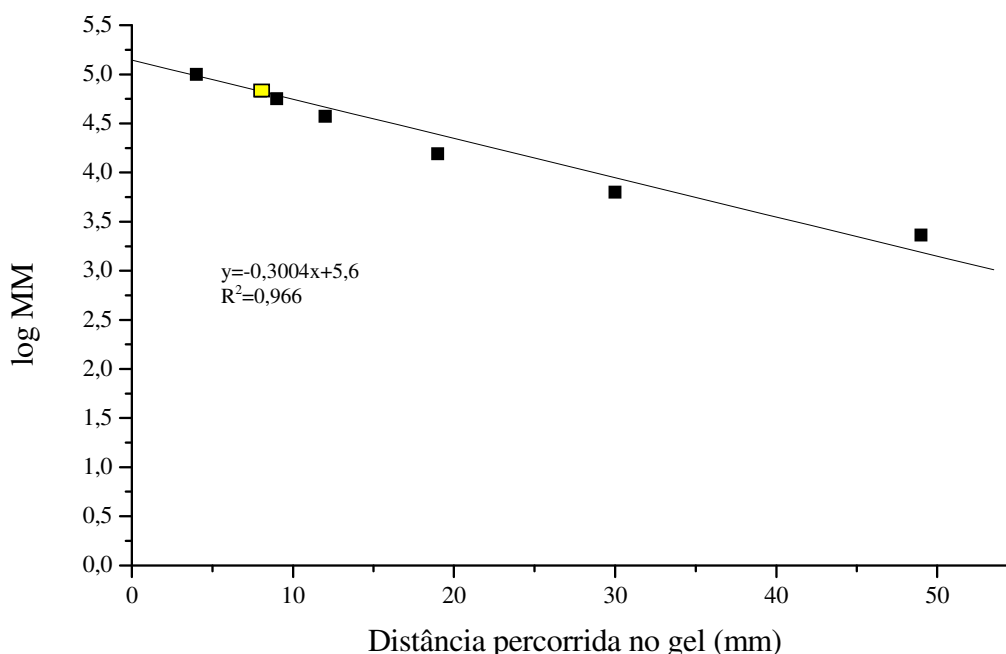


Figura 39: Determinação da massa molecular da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*. Marcadores de massa molecular: Catalase (200kDa), Lactase Deidrogenase (116kDa), Fosforilase (97kDa), Albumina (66kDa), Ovoalbumina (45kDa), Anidrase Carbônica (29kDa). Massa molecular da  $\beta$ -Galactosidase (■).

A  $\beta$ -Galactosidase apresenta a massa molecular de 120kDa (GUL-GUVEN *et al.*, 2007). Estudos com  $\beta$ -Galactosidase da preparação comercial, Sigma Chemical (Rhozyme HP-150) do fungo *Aspergillus niger* apresentou uma massa molecular de 130 kDa (SYKES *et al.*, 1983).

François Widmer e Jean-Louis (1979) isolaram três isoformas da enzima  $\beta$ -Galactosidase da preparação comercial da cedida pela empresa Rapidase (59113-Seclin, França) do fungo *Aspergillus niger* a forma da enzima I, II e III apresentaram uma massa molecular de 124, 150 e 173 kDa, respectivamente (WIDMER; LEUBA, 1979).

Tanaka e colaboradores (1974) purificaram a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae* RT 102 que apresentou uma massa molecular de 105 kDa (TANAKA *et al.*, 1975), esse valor foi semelhante ao trabalho realizado por Moriaki Akasaki e colaboradores (1976) que obtiveram uma massa molecular de 100 kDa pelo mesmo fungo utilizado na preparação comercial (Ferm-P1680) (AKASAKI *et al.*, 1976).

A  $\beta$ -Galactosidase purificada de *Aspergillus fonsecaeus* apresentou uma massa molecular semelhante a obtida nesse trabalho, em torno de 126 kDa (GONZALEZ; MONSAN, 1991).

Pode-se concluir que a enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* apresentou uma massa molecular semelhante a várias  $\beta$ -Galactosidasas de diferentes fontes descritas na literatura.

## **5.18. Caracterização da $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger***

### **5.18.1. Efeito do pH na estabilidade sobre a atividade da enzima $\beta$ -Galactosidase**

O pH influencia fortemente na atuação enzimática, pois os sítios ativos das enzimas são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar em uma forma iônica adequada para manter sua conformação e com isso possam se ligar eficientemente aos substratos para catalisar a reação (SEGEL, 1979).

Muitas vezes, o próprio substrato utilizado também possui grupos ionizáveis, dos quais uma ou outra forma pode ligar-se preferencialmente à enzima por meio de ligações do tipo não-covalentes (STRYER, 1992). Além disso, a menos que a enzima seja mantida saturada com o substrato durante todo o tempo reacional, variações no pH afetam a constante de afinidade da enzima pelo substrato,  $K_m$  (LEHNINGER, 2000).

A atividade da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* foi testada na faixa de pH compreendida entre 3,0 à 9,0, na temperatura de 37°C por 10 min, conforme descrito no item 4.11.1, utilizando como substrato sintético 20mM de PNPG (Figura 40). A maior atividade da enzima  $\beta$ -Galactosidase ocorreu entre pH 4,0 e pH 5,0, apresentando como atividade relativa 100% e 99,8%, respectivamente. Praticamente tanto no pH 3 quanto para o pH 9, a enzima manteve sua atividade acima de 80%, portanto não houve dependência de pH para a atividade da enzima  $\beta$ -Galactosidase.



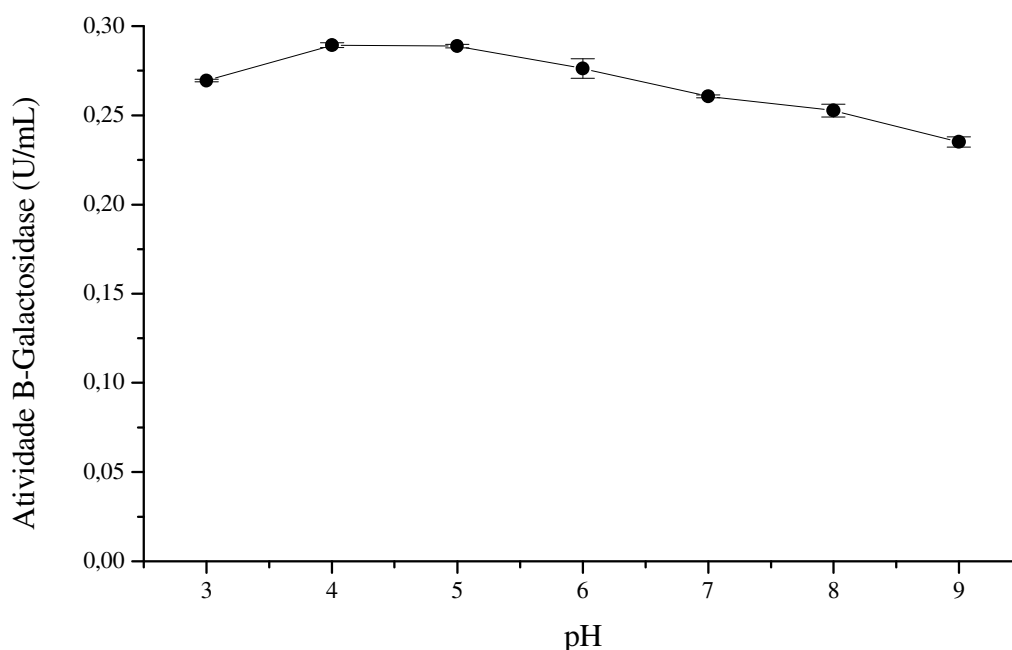


Figura 40: Efeito da variação do pH na atividade da enzima  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* quando incubada à 37°C.

Enzimas estáveis apresentam vantagens em aplicações industriais e biotecnológicas, tais como resistência a produtos químicos como detergentes, proteases e solventes orgânicos (ASGHARI *et al.*, 2004; COWAN, 1997), portanto tendo uma melhor aplicação no processamento industrial da lactose (HAKI; RAKSHIT, 2003).

A taxa de variação do pH para a enzima  $\beta$ -Galactosidase reportada por outros fungos da família GH-2 é de 3 a 5 (O'CONNELL; WALSH, 2008). A enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus carbonarius* demonstrou um pH de maior atividade igual a 4,5 (EL-GINDY, 2003).

A enzima  $\beta$ -Galactosidase dos fungos *Aspergillus niger*, obtida da preparação comercial Sigma Chemical (Rhozyme HP-150), apresentou uma maior atividade entre os pH 4,0 e 4,5 (SYKES *et al.*, 1983), semelhante valor foi reportado pelo fungo *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237, porém a atividade enzimática diminui

acentuadamente abaixo do pH 4,0, em pH 3,0 apresentou apenas 15% de sua atividade e em pH 7,0 a enzima apresentou apenas 30% da sua atividade (NAGY *et al.*, 2001).

Park e colaboradores obtiveram a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae*, que apresentou como pH ótimo no valor de 5,0, sendo que a enzima apresentou grande estabilidade entre os pH 3,5 a 8,0 (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979). Diferentemente do valor obtido para os fungos, as  $\beta$ -Galactosidases das leveduras geralmente apresentam valores de pH maior e mais estabilidade em condições alcalinas.

O valor de maior atividade para a  $\beta$ -Galactosidase em pH 6,7 a 7,2 foi encontrado para a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* (FISCHER; SCHECKERMANN; WAGNER, 1995) e a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Rhizomucor* ssp. também manteve 90% da atividade enzimática entre os pH 3,5-7,5, sendo o pH ótimo reportado em 4,5 (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999). Cho, Shin e Bucke (2003) reportaram um valor de pH ótimo da  $\beta$ -Galactosidase em torno de 5 para a levedura *Bullera singularis* KCTC 7534 (CHO; SHIN; BUCKE, 2003).

Portanto o fungo *Aspergillus niger* isolado da região Amazônica não apresentou variações significativas na atividade  $\beta$ -Galactosidase em diferentes pH, pois provavelmente não ocorreram mudanças conformacionais na enzima. Isso contribui de forma significativa para uma futura aplicação industrial, pois essa enzima apresenta atividade e estabilidade contínua em extremos de pH.

## 5.19. Efeito da temperatura sobre a atividade da $\beta$ -Galactosidase

A influência do incremento da temperatura no meio reacional imprime maior energia cinética às moléculas participantes das reações (enzimas e substratos), ocasionando um maior número de colisões por unidade de tempo. Porém, se a enzima absorver uma maior quantidade de energia, sua estrutura terciária se romperá, acarretando na sua desnaturação (SEGEL, 1979).

De uma forma geral, espera-se que aumentos na temperatura promovam elevação da atividade enzimática, até o ponto de atividade “ótima”, originando uma curva, geralmente unimodal, semelhante a uma parábola convexa. Até o ponto de máxima atividade, a contribuição decorrente de incrementos na taxa reacional (que estão relacionados à energia cinética das moléculas), é maior que a taxa de desnaturação térmica da estrutura protéica (devido ao rompimento de ligações intermoleculares), resultando em aumentos da atividade enzimática.

Em temperaturas acima da “ótima”, a taxa de desnaturação térmica passa a ser maior que a relacionada à energia cinética, sendo observados, portanto, decréscimos na capacidade catalítica (LEHNINGER, 2000).

Posto isso, a temperatura ótima da enzima  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* foi determinada nas temperaturas: 27°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C e 80°C, em pH 4,0, utilizando substrato sintético PNPG, conforme descrito no item 4.11.2 (Figura 41).

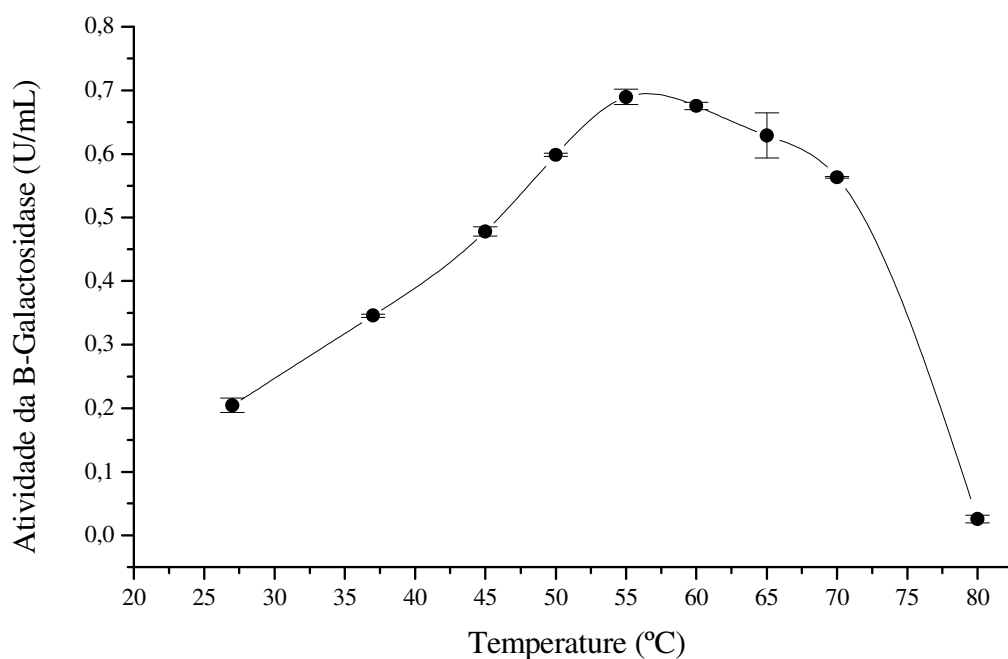


Figura 41: Efeito da temperatura na atividade da enzima β-Galactosidase.

As maiores atividades foram obtidas entre 50°C e 65°C, sendo a maior atividade enzimática à 55°C. Em temperaturas acima de 60°C foi observado um decréscimo acentuado na temperatura na atividade da β-Galactosidase, sendo praticamente nula a 80°C (Figura 41), pois provavelmente ocorreu uma desnaturação.

A β-Galactosidase de *Aspergillus carbonarius* ATCC 6276 apresentou uma maior atividade a 55°C (O'CONNELL; WALSH, 2008).

A β-Galactosidase do fungo *Rhizomucor* sp apresentou uma atividade máxima a 60°C (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999). O valor da temperatura ótima mais alta da β-Galactosidase reportada pela literatura é 75°C obtido pelo fungo *Aspergillus niger* van Thiegh (HU *et al.*, 2010). No trabalho de Sykes e colaboradores (1983) essa enzima produzida por *Aspergillus niger* apresentou atividade máxima em 65°C (SYKES *et al.*, 1983).

Portanto a temperatura ótima da  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* isolado da região Amazônica foi semelhante aos valores encontrados na literatura.

## **5.20. Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ )**

A enzima  $\beta$ -Galactosidase purificada e liofilizada do fungo *Aspergillus niger* foi utilizada para a estimativa de dois parâmetros de elevada importância na cinética enzimática,  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . A  $K_m$  é um parâmetro dinâmico que está relacionado à afinidade de uma enzima pelo substrato ao qual foi mantida em contato e expressa a concentração de substrato que proporciona à enzima atuar em uma taxa correspondente à metade da taxa máxima reacional,  $V_{m\acute{a}x}$ . Dessa forma, quanto maior o valor da constante  $K_m$ , menor é a afinidade da enzima pelo substrato avaliado (SEGEL, 1979).

Já  $V_{m\acute{a}x}$  indica a taxa máxima de atuação enzimática, alcançada quando todos os sítios catalíticos estão promovendo, simultaneamente, a hidrólise das moléculas de substrato. Em termos práticos, essa situação só seria atingida pela incubação da enzima a concentrações infinitamente elevadas de substrato (desconsiderando-se efeitos inibitórios).

A estimativa experimental dos parâmetros cinéticos foi realizada incubando-se a enzima no tampão 50 mM de acetato de sódio em pH ajustado a 4,0, com distintas concentrações de substrato, seguindo a metodologia padrão descrita (seções 4.11.3 e 4.11.4).

Em seguida, as velocidades das reações foram plotadas versus as correspondentes concentrações de substrato utilizados, como o ONPG e a lactose, para determinar a curva de Michaelis-Menten (Figuras 42 e 43), respectivamente.

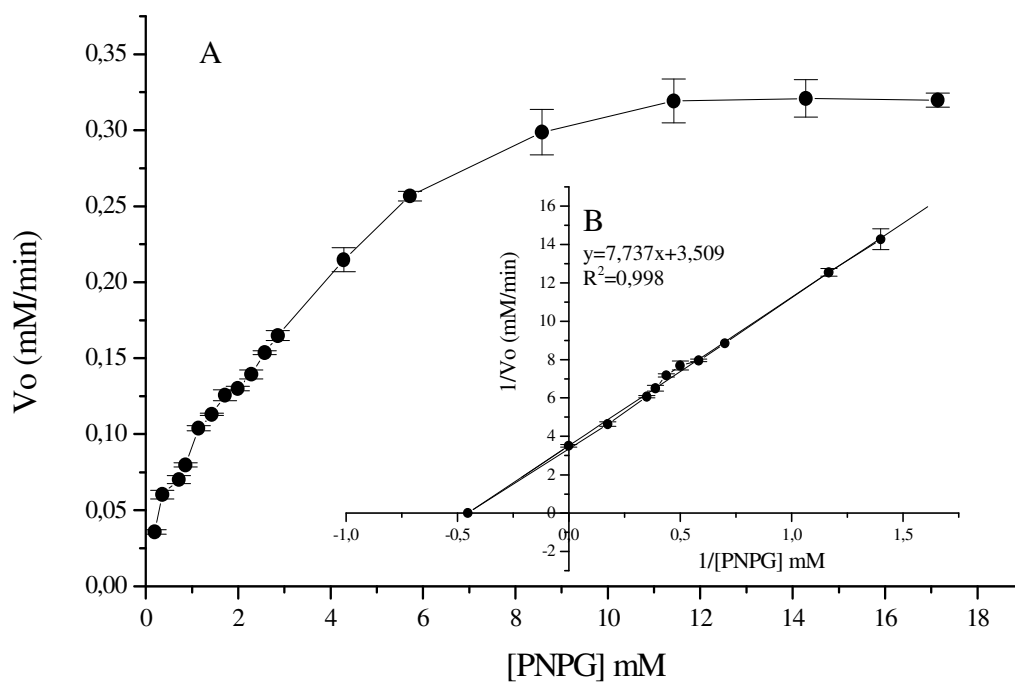


Figura 42: **A**- Concentração do substrato OPNG na velocidade da reação catalisada pela  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*. **B**- Gráfico Duplo Recíproco.

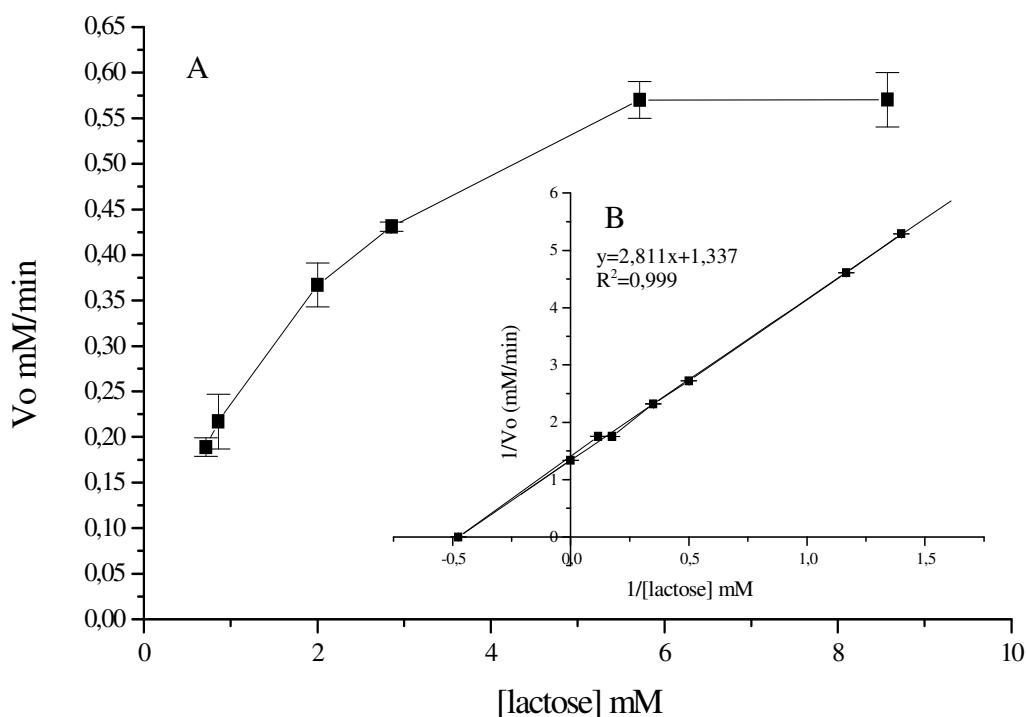


Figura 43: **A**- Efeito da concentração do substrato lactose na velocidade da reação catalisada pela  $\beta$ -Galactosidase. **B** – Gráfico Duplo Recíproco.

Os valores da constante cinética ( $K_m$ ) e da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para cada substrato estão representados na Tabela 22.

Tabela 22: Valores de  $K_{m_{ap}}$  e  $V_{m\acute{a}x_{ap}}$ , determinados pelas curvas de Michaelis-Menten com os substratos PNPG e lactose.

Substratos	$K_{m_{ap}}$ (mM)	$V_{m\acute{a}x_{ap}}$ (mM/min) *
PNPG	2,204	0,285
Lactose	2,101	0,750

\* Para o substrato PNPG,  $V_{m\acute{a}x}$  está expressa em mM de  $\rho$ -NP.min<sup>-1</sup>, enquanto que para o substrato lactose está expressa em mM de açúcar redutor.min<sup>-1</sup>.

A hidrólise do substrato sintético, PNPG, e lactose, pela  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger*, revelou valores de  $K_{m_{ap}}$  praticamente iguais, enquanto que a  $V_{m\acute{a}x_{ap}}$  foi maior para a lactose (Tabela 22).

Os valores de  $Km_{ap}$  para o substrato sintético ONPG descrito pela levedura *Saccharomyces lactis* foi de 0,1; 2,5; 2,6; 12,5 de quatro isoformas de  $\beta$ -Galactosidase (MBUYI-KALALA; SCHNEK; LEONIS, 1988) e *Aspergillus* ssp. 0,77 (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979), 2,02 mM (GREENBERG; MAHONEY, 1981), à 2,4 mM e 1,78 mM (GONZALEZ; MONSAN, 1991)

Da mesma forma, Hu e colaboradores, 2010 encontraram para a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* van Thiegh (HU *et al.*, 2010), uma  $Km_{ap}$  e  $Vmáx_{ap}$  no valor de 2,21 mM e 0,172 mM/min.mg, respectivamente.

Shaikh e colaboradores, 1999 determinaram o valor de  $Km_{ap}$  e  $Vmáx_{ap}$  para o substrato ONPG de 0,66mM e 22,14 mM/min, respectivamente para o fungo *Rhizomucor* sp (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999).

S'O'Connell e colaboradores, 2008, obtiveram valores de  $Km_{ap}$  de 1,60 mM e 1,165 mM do fungo *Aspergillus carbonarius* ATCC 6276 de duas isoformas de  $\beta$ -Galactosidase e  $Vmáx_{ap}$  nos valores de 0,2 mM/min.mg e 0,011249 mM/min.mg (O'CONNELL; WALSH, 2007; O'CONNELL; WALSH, 2008). A  $Km_{ap}$  encontrado por Manzanares e colaboradores, 1998 foi 1,3mM para a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* N400 (MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER, 1998) utilizando os substrato PNPG e ONPG, respectivamente.

Para o substrato lactose, o valor de  $Km_{ap}$  encontrado por Shaik e colaboradores, 1999 foi 50mM e a  $Vmáx_{ap}$  foi 12mM/min para a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Rhizomucor* sp (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999). Conell e colaboradores, 2009 encontraram valores da  $Km_{ap}$  no valor de 82,68 mM e 308,79 mM que correspondem as duas isoformas de  $\beta$ -Galactosidase da fungo *Aspergillus carbonarius* ATCC 6276 (O'CONNELL; WALSH, 2007).



Da mesma forma, a  $\beta$ -Galactosidase de três isoformas da preparação comercial Rapidase Company (59113-Seclin, França) obtida do fungo *Aspergillus niger* apresentaram as  $Km_{ap}$  no valor de 85 mM; 105mM e 125mM (WIDMER; LEUBA, 1979). Park et al, 1979 determinaram o  $Km_{ap}$  para a  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae* foi de 50mM (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979) ambos para o substrato lactose.

A literatura descreve que o valor de  $Km$  e  $Vmáx$  quando utilizado substrato sintético, PNPG, são menores quando comparados com os parâmetros cinéticos da lactose (NAGY *et al.*, 2001). Porém Tanaka e colaboradores, 1974 corroboram os resultados obtidos nesse trabalho, pois relataram um  $Km$  maior para a hidrólise do substrato sintético, ONPG, do que para a hidrólise da lactose pela  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae* RT 102 nos valores de 0,018mM e 0,00072mM, respectivamente (TANAKA *et al.*, 1975).

Os mais elevados valores de  $Km$  na hidrólise da lactose pela  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* foi 20mM (WOYCHIK; WONDOLOWSKI, 1972).

Dessa forma pode-se concluir que a enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* da região Amazônica, apresenta uma afinidade igual para os dois substratos, tanto para o sintético como para o natural.

### **5.21. Determinação da constante de inibição ( $Ki$ ) para o açúcar Galactose**

Para a determinação da constante de inibição ( $Ki$ ) da enzima  $\beta$ -Galactosidase utilizou-se diferentes concentrações de galactose através da hidrólise do substrato sintético PNPG.

A Figura 44 representa o gráfico da hidrólise de PNPG pela  $\beta$ -Galactosidase na ausência e na presença de diferentes concentrações de galactose. Para uma mesma concentração do substrato PNPG, a velocidade da reação foi maior quando a concentração de galactose era menor e diminuiu com o aumento da concentração da galactose, caracterizando um efeito de inibição, portanto a velocidade da reação é inversamente proporcional a concentração de galactose.

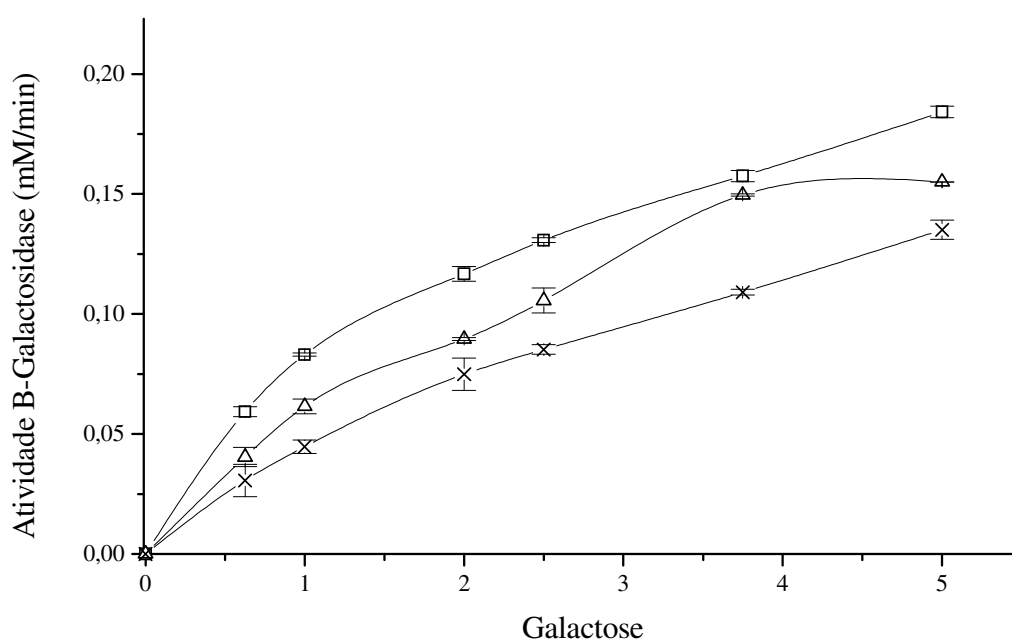


Figura 44: Diferentes concentrações de galactose. 1mM de galactose (□), 2mM de galactose (Δ), 5mM de galactose (x).

A Figura 45 mostra que as retas praticamente convergem para um mesmo ponto no eixo Y, isso indica que o valor da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) permaneceu constante, mesmo na presença do inibidor, enquanto que o valor do  $K_m$  aumentou, sugerindo uma inibição competitiva.

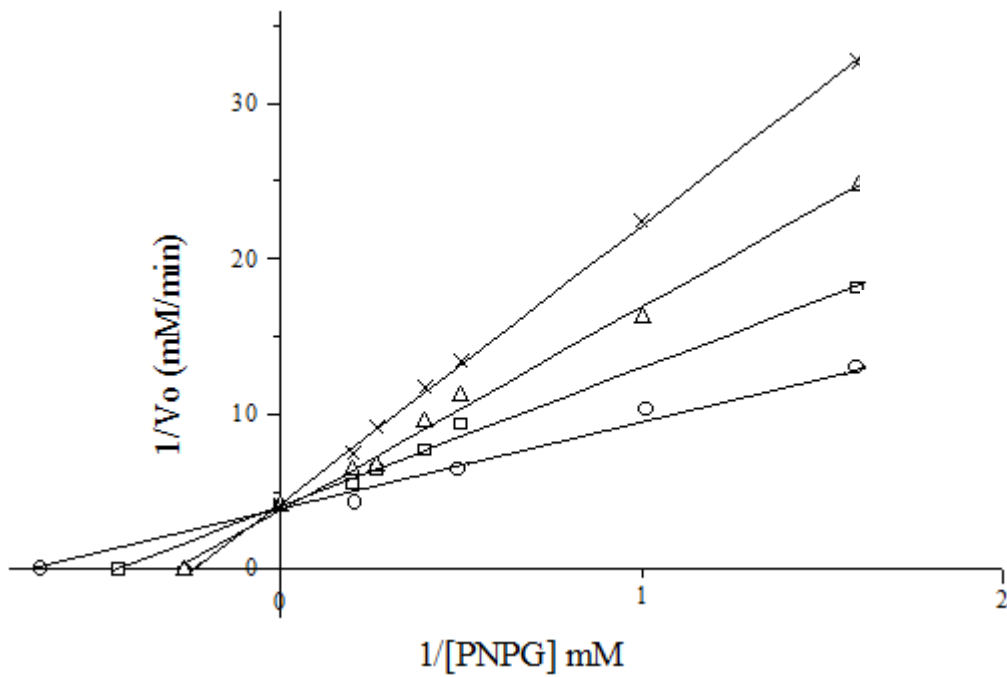


Figura 45: Duplo recíproco. Ausência de galactose (○), 1mM de galactose (□), 2mM de galactose (Δ), 5mM de galactose (x).

O valor do  $K_i$  foi determinado pelo gráfico da concentração de galactose em função do  $K_m$  aparente. A inibição da hidrólise do substrato PNPG pela  $\beta$ -Galactosidase na presença do produto inibidor galactose apresentou um valor de  $K_i$  de 5,01 mM (Figura 46).

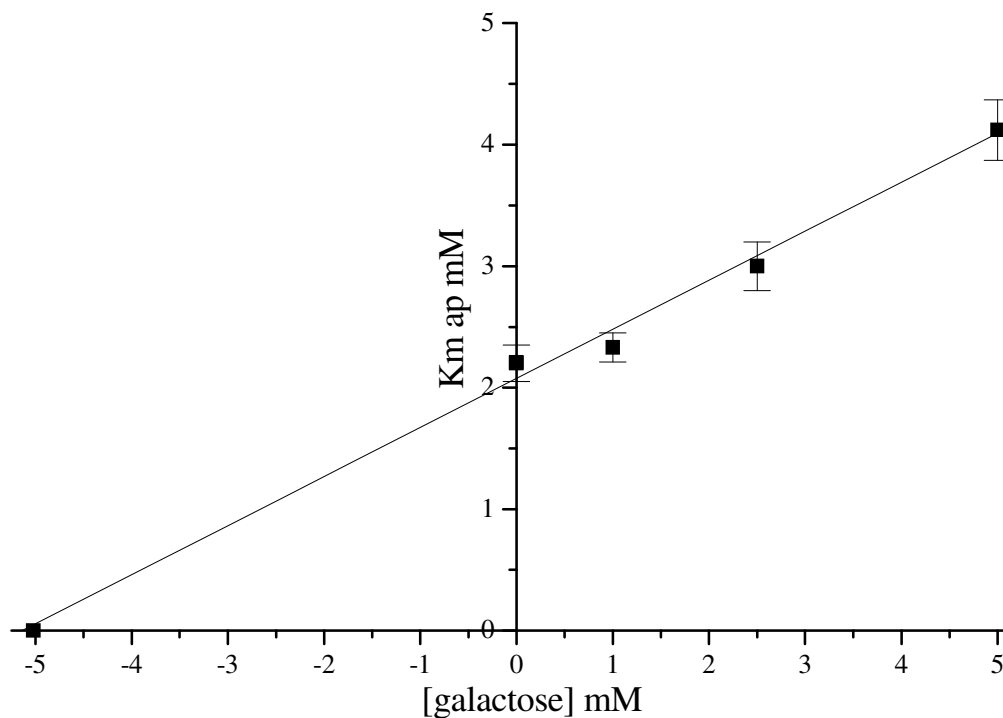


Figura 46: Concentração de galactose em função de  $K_m/V_{m\acute{a}x}$  para determinação do  $K_i$ .

O inibidor competitivo se combina com a enzima livre de uma forma tal que impede a ligação do substrato, ou seja, o inibidor e o substrato são mutuamente exclusivos, em geral porque há uma verdadeira competição pelo mesmo sítio na enzima.

Desta forma, na presença de uma concentração de substrato muito alta (saturante), toda a enzima estará aderida com o substrato. Como consequência, a velocidade inicial máxima, na presença de um inibidor competitivo, é igual a  $V_{m\acute{a}x}$ , velocidade inicial máxima na ausência do inibidor.

A  $K_{m_{ap}}$  aumentará na presença de um inibidor competitivo porque, qualquer que seja a concentração do inibidor, existirá uma fração de enzima sob forma de enzima-inibidor, a qual não possui afinidade pelo substrato (SEGEL, 1979).

A hidrólise da lactose em galactose e glicose sugere que a galactose pode atuar como inibidor da enzima  $\beta$ -Galactosidase (SAMOSHINA; LOTMENCEVA, BORISOVA, 1985). Sendo um inibidor competitivo (PARK; DE SANTI; PASTORE, 1979).

No trabalho de Manzanares e colaboradores (1998) obtiveram um  $K_i$  de 1,4 mM da enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo *Aspergillus niger* N400 (MANZANARES; DE GRAAFF; VISSER, 1998). No trabalho de Shaikh Khire e Khan (1999) reportaram um  $K_i$  de 2,0 mM da enzima  $\beta$ -Galactosidase do fungo termófilo *Rhizomucor* sp. (SHAIKH; KHIRE; KHAN, 1999), enquanto que o trabalho de Hu e colaboradores (2010) obtiveram um  $K_i$  de 0,76 mM para o fungo selvagem *Aspergillus niger* van Thieg e que após mutação apresentou um  $K_i$  de 6,46 mM (HU *et al.*, 2010).

Os valores reportados na literatura demonstram que as enzimas  $\beta$ -Galactosidases sofrem mais inibição pela galactose do que a enzima presente nesse trabalho. Isso reflete uma aplicação industrial, pois  $\beta$ -Galactosidase do *Aspergillus niger* isolado da região Amazônica não será fortemente inibida pelo seu produto.

## **5.22. Condições de cristalização**

Os cristais da enzima  $\beta$ -Galactosidase foram obtidos ao fim de quinze dias e alcançando tamanho máximo em trinta dias (Figura 47). A concentração requerida para a cristalização da proteína é 10 mg/mL, porém os cristais crescidos usando essa concentração foram muito pequenos ou placas muito finas.

Foi feito um *screening* ao redor das condições reportadas, visando melhorar a qualidade dos cristais (Tabela 23).

Tabela 23: Ensaios de cristalização para a  $\beta$ -Galactosidase.

Tampão	Agente Precipitante	pH	Concentração da proteína
0,2 M Tris-HCl	PEG 4000 12%	8	10 mg/mL
0,2 M Tris-HCl	PEG 4000 12%	8,3	10 mg/mL
0,2 M Tris-HCl	PEG 4000 12%	8,5	10 mg/mL
0,2 M Tris-HCl	PEG 4000 12%	8,6	10 mg/mL

O pH 8,6 foi a melhor condição para formações de cristais de  $\beta$ -Galactosidase. Infelizmente, os cristais não foram submetidos à difração de raio X, porém as condições de cristalizações estabelecidas nesse trabalho, podem contribuir para futuros estudos na determinação da estrutura terciária da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger*.

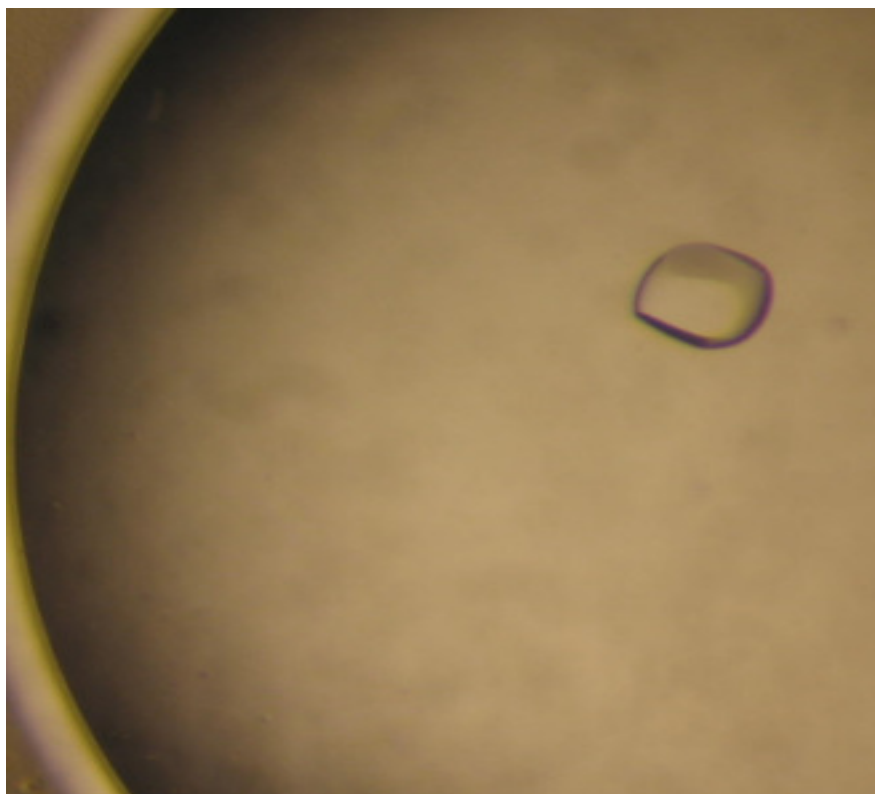


Figura 47: Cristais de  $\beta$ -Galactosidase crescidos em 12 % de PEG 4000, 0,2 M Tris-HCl, pH 8,6 e 10 mg/mL de proteína.

## 6. Conclusões

Na primeira etapa do trabalho, três fungos se destacaram na FES, sendo esses o P6B2 (*Aspergillus* sp.) o maior produção de xilanase; o P40B3 o melhor produtor de FPAse e o P47C3 (*Aspergillus niger*) sendo o melhor produtor de  $\beta$ -glicosidase e endoglucanase.

Os três fungos selecionados na primeira etapa do trabalho, foram submetidos a FSm, caracterizando a segunda etapa do trabalho, no qual o P47C3, identificado como *Aspergillus niger*, foi o melhor produtor de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal pois apresentou a melhor produção de xilanase (55,04 U/mL em 72h); de endoglucanase (4,17 U/mL em 72h); de  $\beta$ -Glicosidase (0,30 U/mL em 120h) e FPAse (0,13 U/mL em 48h).

Na terceira etapa do trabalho, após uma extensa busca na literatura, selecionou-se a enzima  $\beta$ -Galactosidase do *Aspergillus niger* para ser purificada e cristalizada.

Para a purificação dessa enzima utilizou-se combinações diferentes na sequência de técnicas cromatográficas sendo duas cromatografias com propriedades de troca cationicas (SP-Sephadex C-50 e a SP-TSK 5 PW) e na última etapa, uma cromatografia de gel filtração obtendo no final do processo um rendimento de 24,84%. No final da purificação, a enzima foi liofilizada e utilizada para processos cinéticos e cristalização.

O gel de poliacrilamida confirmou a pureza da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* e sua massa molecular foi estimada em 125 kDa. Então, a enzima foi liofilizada e utilizada para processos cinéticos e cristalização.

A enzima  $\beta$ -Galactosidase apresentou atividade máxima em pH 4,0 e 55°C, sendo que a atividade enzimática não variou quanto aos extremos de pH, essa estabilidade é importante para processos industriais.

A enzima apresentou mesma atividade para os substratos PNPG e lactose, sendo a velocidade de reação maior com a lactose.

O  $K_{m_{ap}}$  para o substrato PNPG foi de 2,204 mM e para a Lactose foi de 2,101 mM, ou seja, a  $\beta$ -Galactosidase apresentou uma afinidade maior para o substrato sintético, PNPG, do que para a lactose.

Na presença do substrato PNPG a enzima sofreu uma inibição competitiva pela galactose (5,01 mM).

Após extenso *screening*, as condições de cristalizações foram estabelecidas e os cristais da enzima  $\beta$ -Galactosidase foram obtidos ao fim de quinze dias e alcançando tamanho máximo.

Portanto este trabalho contribuiu na determinação das condições de cristalização da  $\beta$ -Galactosidase de *Aspergillus niger* e com isso permite, no futuro, auxiliar na determinação da estrutura proteica e aprimorar os conhecimentos sobre o modo de ação catalítico dessa enzima.



## 7. Referências Bibliográficas

ACEBAL, C.; CASTILLON, M. P.; ESTRADA, P.; MATA, I.; COSTA, E.; AGUADO, J.; ROMERO, D.; JIMENEZ, F. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 3, p. 218-223, 1986.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, n. 1, p. 6-10, 2005.

AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; ANJUM, F. M.; ASGHER, M. Effect of Wheat Bran Concentration on Xylanase Biosynthesis by *Aspergillus niger*. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 11, n. 5, p. 571-576, 2009. ISSN 1560-8530.

AYYILDIZ, A.; Characterization of Catalytic Phenotype of B-Galactosidase From LacI Mutant, *E. Coli* CSH-36, as a Tool For The Management of Lactose Intolerance. *Journal of Medical Sciences*, v. 29, n.1, p. 521-527, 1999.

AKASAKI, M.; SUZUKI, M.; FUNAKOSHI, I.; YAMASHINA, I. Characterization of beta-galactosidase from a special strain of *Aspergillus oryzae*. *Journal Biochemistry*, v. 80, n. 6, p. 1195-200, 1976.

ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 4, p. 298-302, 1994.

ALEXANDER, M. Crystallization of macromolecules: General principles. In: HAROLD W. WYCKOFF, C. H. W. H. S. N. T. (Ed.). *Methods in Enzymology*: Academic Press, v.114, p 112-120, 1985.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, v.1, n.1, p. 865, 1996.

ALEXANDER, M. A brief history of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, v. 110, n. 1-2, p. 1-10, 1991.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels*, v. 3, p. 4, 2010.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, v. 29, n. 4, p. 719-39, 2005.

ASGHARI, S. M.; KHAJCH, K.; RANJBAR, B.; SAEDI, R. J. J.; NADERI-MANESH, H.; *Int. J. Biol. Macromol*, v. 34, p. 173, 2004

ASHOK, P. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E.; REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnol Bioeng*, v. 41, n. 11, p. 1007-13, 1993.

AVILA-CABADILLA, L. D.; STONER, K. E.; HENRY, M.; AÑORVE, M. Y. A. Composition, structure and diversity of phyllostomid bat assemblages in different successional stages of a tropical dry forest. *Forest Ecology and Management*, v. 258, n.6, 986-996, 2009.

AWAFO, V. A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics, v.1, n.255, 1997. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Quebec, Canadá.

AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 801-805, 2007.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n. 6, p. 559-561, 2002.

BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of alpha amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation by using some agricultural by products. *Food Technology Biotechnology*, v. 45, p.4439-4442, 2006.

BARBOSA, M. F. S.; SILVA, D. O.; PINHEIRO, A. J. R.; GUIMARÃES, W. V.; BORGES, A. C. Production of Beta-D-Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* Grown in Cheese Whey. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 7, p. 1618-1623, 1985.

BATRA, N.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C.; PATNAIK, P. R.; SOBTI, R. C. Production and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnol Appl Biochem*, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2002.

BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DÍAZ, R.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: Purification and properties of two of the enzymes. *Journal of Biotechnology*, v. 41, n. 1, p. 71-79, 1995.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 6, p. 881-896, 2003.

BENNETT, J. W. *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *J Biotechnol*, v. 66, n. 2-3, p. 101-7, 1998.

BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnology Letters*, v. 17, n. 10, p. 1077-1080, 1995.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; CLAEYSSSENS, M. The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. *Eur J Biochem*, v. 200, n. 1, p. 157-63, 1991.

BIERMANN, L.; GLANTZ, M. D. Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochim Biophys Acta*, v. 167, n. 2, p. 373-7, 1968.

BISWAS, S.; KAYASTHA, A. M.; SECKLER, R. Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *J Plant Physiol*, v. 160, n. 4, p. 327-37, 2003.

BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; FERRARA, M. A. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. *Editora Interciência*, v. 1, n. 1, p. 508, 2008.

BONINI, C.; D'AURIA, M.; DI MAGGIO, P.; FERRI, R. Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: The role of superoxide ion and ozone. *Industrial Crops and Products*, v. 27, n. 2, p. 182-188, 2008.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN 'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n. 2-4, p. 271-281, 2000.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007. ISSN 1359-5113.

BOURNE, Y.; HENRISSAT, B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, n. 5, p. 593-600, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 1-15, 1992.

BRASIL. Enzimas e Preparações Enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano, 2006.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Cellulolytic Enzymes Production via Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. *Enzyme Res*, v. 2011, p. 86, 2011.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, L.; MIEZELIENE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A.  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. *Central European Journal of Chemistry*, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2005.

CAI, J. M.; KE, W.; ZHOW, Y.; JIE, Z.; BANG, J.; RUIPEN, R. Production of xylanase by *Penicillium* sp. P1 using solid state fermentation. *ShipinYu Fajio Gongye*, v.1, n.23, p.30–33, 1997.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR O, G. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 104, n. 3, p. 159-72, 2003.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J Appl Microbiol*, v. 103, n. 6, p. 2196-204, 2007. ISSN 1364-5072.

CANTAREL, B.L.; COUNTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, v.1, p 312, 1991.

CARLE-URIOSTE, J. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. *Informações Econômicas*, v. 22, n. 12, p. 31-46, 1992.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.

CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CASTEREN, W. H. M.; EIMERMANN, M.; L. A. M. V. D. B.; , VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Purification and characterisation of a  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B39 and B891. *Carbohydrate Research*, v. 329, n.1, p. 75-85, 2000.

CAVILLE-LEFEBVRE, D.; COMBES, D. Irreversible high pressure inactivation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparison with thermal inactivation. *Journal of Biotechnology*, v.61, n.2, p. 85-93, 1998.

CEN, P.; XIA, L. Production of Cellulase by Solid-State Fermentation Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* v.65, n.1, p. 69-92, 1999. p.69-92.

CHAHAL, D. S. Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production. *Appl Environ Microbiol*, v. 49, n. 1, p. 205-10, 1985.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; GAURAV, S. S.; DAROKAR, M. P.; SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresour Technol*, v. 100, n. 4, p. 1659-62, 2009.

CHANG, B. S.; MAHONEY, R. R. Purification and thermostability of beta-galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *J Dairy Res*, v. 56, n. 1, p. 117-27, 1989.

CHAUVE, M.; MATHIS, H.H.D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; LOPES, F.N. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnol Biofuels*, v. 3, n.1, p. 123-30, 2010.

CHO, Y. J.; SHIN, H. J.; BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing beta-galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters*, v. 25, n. 24, p. 2107-11, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas: Unicamp, 279 p, 1997.

COTÉ, A.; BROWN, W. A.; CAMERON, D.; VAN WALSUM, G. P. Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 6, p. 1608-1620, 2004.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P; DA COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

COUTO, S. R.; DOMÍNGUEZ, A.; SANROMÁN, A. Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation*, v. 12, n. 5, p. 283-289, 2001.

COWAN, D. A.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 1997, v. 118, p. 429, 1997

DAHOT, M. U.; NOONRIO, M. H. Microbial production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source. *Enzymologic Technology*, v.9, n.4, p. 119-124, 1996.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *J Agric Food Chem*, v. 28, n. 3, p. 567-71, 1980.

DE SANTIAGO, R.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Enzymatic synthesis of disaccharides by  $\beta$ -galactosidase-catalyzed glycosylation of a glycocluster. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, n. 2-3, p. 71-79, 2000.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 4, p. 497, 2001.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, n. 2, p. 244-250, 2006.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v.37, n.0, p. 243-250, 2012.

DOE - DEPARTAMENT OF ENERGY US , 2011 – Joint Genome Institute. Acesso em: novembro de 2011.

DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

DOCTORFUNGUS.<Disponível em: [www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org)> Acesso em: 15 de outubro de 2011.

DOPPELBAUER, R.; ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LAFFERTY, R. M.; STEINMÜLLER, H. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 5, p. 485-494, 1987.

DORSEY, J. G.; COOPER, W. T.; WHEELER, J. F.; BARTH, H. G.; FOLEY, J. P. Liquid chromatography: theory and methodology. *Anal Chem*, v. 66, n. 12, p. 500-546, 1994.

DRITSA, V.; RIGAS, F.; NATSIS, K.; MARCHANT, R. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 9, p. 1741-1747, 2007.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnol Adv*, v. 11, n. 3, p. 591-7, 1993.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium*

*citrinum*: production and characterization. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 35, n. 4, p. 275-82, 2008.

EL-GINDY, A. Production, partial purification and some properties of beta-galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. Folia Microbiol (Praha), v. 48, n. 5, p. 581-584, 2003.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2009.

FANTES, P. A.; ROBERTS, C. F. Beta-galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, v. 77, n. 2, p. 417-86, 1973.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; NETO, V. B.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. Embrapa Instrumentação, v.1, n.2, p.15, 2008.

FIEDUREK, J.; ILCZUK, Z. Screening of microorganisms for improvement of beta-galactosidase production. Acta Microbiol Pol, v. 39, n.1, p. 37-42, 1990.

FINOCCHIARO, T.; OLSON, N.; RICHARDSON, T. Use of immobilized lactase in milk systems. Advances in Biochemical Engineering, Springer Berlin / Heidelberg, v.15, n.1, p.71-88, 1980.

FISCHER, L.; SCHECKERMANN, C.; WAGNER, F. Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. Appl Environ Microbiol, v. 61, n. 4, p. 1497-501, 1995.

FOUNTOULAKIS, M.; JURANVILLE, J. F.; MANNEBERG, M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. J Biochem Biophys Methods, v. 24, n. 3-4, p. 265-74, 1992.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, n. 1, p. 45-48, 2002.

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, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GARRETT e GRISHAM. Biochemistry. Saunders College Pub, n. 1, v.3, p. 34-78, 1995.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. J Appl Microbiol, v. 87, n. 4, p. 511-9, 1999.

GEIMBA, M. P.; RIFFEL, A.; AGOSTINI, V.; BRANDELLI, A. Characterisation of cellulose-hydrolysing enzymes from the fungus *Bipolaris sorokiniana*. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 79, n. 13, p. 1849-1854, 1999. ISSN 1097-0010.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Hydrolyses of Lactose – A Literature Review. Process Biochemistry, v.20, n.1, p.2-12, 1985.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. J Chromatogr A, v. 808, n. 1-2, p. 141-51, 1998.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v. 25, n. 1-2, p. 68-72, 1999.

GIACOMINI, A.; CORICH, V.; OLLERO, F. J.; SQUARTINI, A.; NUTI, M. P. Experimental conditions may affect reproducibility of the  $\beta$ -galactosidase assay. FEMS Microbiology Letters, v.100, n.3, p.87-90,1992.

GIEGE, R.; DRENTH, J.; DUCRUIX, A.; MCPHERSON, A.; SAENGER, W. Crystallogenesis of biological macromolecules. Biological, microgravity and other physico-chemical aspects. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, v. 30, n. 4, p. 237-281, 1995.

GIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIÉ, J. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Oil & Gas Science and Technology, v. 54, n. 1, p. 67-94, 1999.

GLATZ, C.E. Precipitation. In: Bioseparation and bioprocessing a handbook. Ed: New York: Marcel Dekker, v. 2, p. 329-356, 1998.

GODFREY, T.; WEST, S. Industrial Enzymology. Second Edition. London: The Macmillan Press Ltda, 1996.

GOMES, D. J.; GOMES, J.; STEINER, W. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. Journal of Biotechnology, v. 37, n. 1, p. 11-22, 1994.

GONZALEZ, R. R.; MONSAN, P. Purification and some characteristics of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 13, n. 4, p. 349-352, 1991.

GONÇALVES, A. R.; MORIYA, R. Y.; OLIVEIRA, L. R. M.; SAAD, M. B. W. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. Enzyme and Microbial Technology, v. 43, n. 2, p. 157-163, 2008.



GOREN, M. P.; LI, J. T. The Coomassie Brilliant Blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. *Clin Chem*, v. 32, n. 2, p. 386-8, Feb 1986.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; HONDEL, C. A. V. D. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 47, n. 1, p. 1-11, 1997.

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

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

GREENBERG, N. A.; MAHONEY, R. R. Rapid Purification of Beta-Galactosidase (*Aspergillus niger*) from a Commercial Preparation. *Journal of Food Science*, v. 46, n. 3, p. 684-687, 1981.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; DA VINHA, F. N. M.; SOUZA, D. T.; BISPO, A. S. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 155, n. 1-3, p. 321-329, 2009.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M.; SIPOCZ, M.; SEDLÁCKOVÁ, B. Entrapment of beta-galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnol Lett*, v. 30, n. 4, p. 763-7, 2008.

GUIMARAES, W. V.; DUDEY, G. L.; INGRAM, L. O. Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, v. 40, n. 1, p. 41-5, 1992.

GUL-GUVEN, R.; GUVEN, K.; POLI, A.; NICOLAUS, B. Purification and some properties of a  $\beta$ -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1570-1577, 2007.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng*, v. 97, n. 5, p. 1028-38, 2007.

GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Progress*, v. 13, n. 2, p. 166-169, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

GUTKOSKI, L.; PEDÓ, I. Aveia: composição química, valor nutricional e processamento. São Paulo: 191 p. 2000.

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

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HATTI-KAUL, S. F. B. G. O. D. J. C. R.  $\beta$ -Galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 3, p. 313-321, 2002.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford: CABI, v.1, ed 8, p. 616, 1995.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, v. 280, p. 309-16, 1991. ISSN 0264-6021.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, v. 316, p. 695-6, 1996.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour Technol*, v. 100, n. 3, p. 1238-45, 2009.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; JOSEPH F. BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNENDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P. W.; DAI, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v.3, n. 1, p. 509-547.

HIDAKA, M.; FUSHINOBU, S.; OHTSU, N.; MOTOSHIMA, H.; MATSUZAWA, H.; SHOUN, H.; WAKAGI, T. Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. *J Mol Biol*, v. 322, n. 1, p. 79-91, 2002.

HOFF, B.; PÖGGELER, S.; KÜCK, U. Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 3, p. 465-70, 2008.

HOLMES, M. L.; DYALL-SMITH, M. L. Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Mol Microbiol*, v. 36, n. 1, p. 114-22, 2000.

HOYOUX, A.; JENNES, I.; DUBOIS, P.; GENICOT, S.; DUBAIL, F.; FRANÇOIS, J. M.; BAISE, E.; FELLER, G.; GERDAY, C. Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, n. 4, p. 1529-35, 2001.

HU, X.; ROBIN, S.; O'CONNELL, S.; WALSH, G.; WALL, J. G. Engineering of a fungal beta-galactosidase to remove product inhibition by galactose. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, n. 5, p. 1773-82, 2010.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, p. 62, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Projeto PRODES: monitoramento da floresta amazônica brasileira por satélite. 2010. Acesso em: 01 out. 2011.

IRVINE, G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 352, n. 1-3, p. 387-397, 1997.

ISIL, S.; NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 2, p. 187-193, 2005.

JEFFRIES, T. W.; EVELEIGH, D. E.; MACMILLAN, J. D.; PARRISH, F. W.; REESE, E. T. Enzymatic hydrolysis of the walls of yeast cells and germinated fungal spores. *Biochim Biophys Acta*, v. 499, n. 1, p. 10-23, 1977.

JOHNSON, K.; SILVA, M.; MACKENZIE, C.; SCHNEIDER, H.; FONTANA, J. Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 20-21, n. 1, p. 245-258, 1989.

JONES, C. S.; KOSMAN, D. J. Purification, properties, kinetics, and mechanism of beta-N-acetylglucosamidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 255, n. 24, p. 11861-9, 1980.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of

cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Mode of action of a minor xylanase from *Thermoascus aurantiacus* on polysaccharides and model substrates. *J Biosci Bioeng*, v. 87, n. 6, p. 819-21, 1999.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresour Technol*, v. 86, n. 3, p. 207-13, 2003.

KHANDEPARKAR, R.; BHOSLE, N. B. Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTCC 5112. *Res Microbiology*, v. 157, n. 4, p. 315-25, 2006.

KIM, S. H.; LIM, K. P.; KIM, H. S. Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by  $\beta$ -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 10, p. 2264-2269, 1997.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol*, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KOWALEWSKA-PIONTAS, J.; BEDNARSKI, W. The effect of selected inductors on biosynthesis and properties of  $\beta$ -galactosidase. *Polish journal of food and nutrition sciences*, v. 12, n. 3, p. 31-37.

KU, M. A.; HANG, Y. D. Production of yeast lactase from sauerkraut brine. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 10, p. 925-928, 1992.

KULA, M.-R.; KRONER, K.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction *Reaction Engineering*. Springer Berlin / Heidelberg, v.24, n.1, p.73-118., 1982.

JANCARIK, J.; KI, S.H. Sparse matrix simpling: a screening method for crystalization of proteins. *Journal Applie Crystalography*, v.24, p 409-411, 1991.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol*, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa fusca* straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 11, n. 3, p. 347-348, 1995.

LAURENCE, W. F.; FEARNside, P. M.; LAURENCE, S. G.; DELAMONICA, P.; LOVEJOY, T. E.; MERONA, J. M. R.; CHAMBERS, J. Q.; GASCON, C Relationship between soils and Amazon forest biomass: a landscape-scale study. Forest Ecology and Management, p.127-138, 1999.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. Appl Biochem Biotechnol, v. 105 -108, p. 457-69, 2003.

LEAL, P. L.; STURMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from colis under different lan use systems in the Amazon, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 1, p. 111-121, 2009. ISSN 1517-8382.

LEHNINGER, A L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, v.3, p.1013 , 2000.

LEVASSEUR, A; PIUMI, F.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; ASTHER, M; DELATTRE, M.; HENRISSAT, B; PONTAROTTI, P; ASTHER, M; RECORD, E FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. Fungal Genetics and Biology, v. 45, n. 5, p. 638-645, 2008.

LI, L. H.; FLORA, R. M.; KING, K. W. Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. Arch Biochem Biophys, v. 111, n. 2, p. 439-47, 1965.

LI, P. J.; JING, D. B.; ZHOU, Q. X.; ZHANG, C. G. Optimization of solid fermentation of cellulase from *Trichoderma koningii*. J Environ Sci (China), v. 16, n. 5, p. 816-20, 2004.

LI, S.; HAN, J.; CHEN, K; CHEN, C. Purification and characterization of isoforms of  $\beta$ -galactosidases in mung bean seedlings. Phytochemistry, v. 57, n. 3, p. 349-359, 2001.

LIM, K. S.; HUH, C. S.; BAEK, Y. J.; KIM, H. U. A Selective Enumeration Medium for Bifidobacteria in Fermented Dairy Products. Journal of Dairy Science, v. 78, n. 10, p. 2108-2112, 1995.

LIMA, L. F.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. Appl Biochem Biotechnol, v. 151, n. 2-3, p. 283-94, 2008.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration Biodegradation*, v. 65, n. 5, p. 717-725, 2011.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman and company, n 1, v 5, p 310, 2004.

LUIZA, J. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. MICROBIAL cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 66, n. 3, p. 506-77, table of contents, 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. *Biotechnol Bioeng*, v. 77, n. 4, p. 467-75, 2002.

MAA, Y. F.; HORVÁTH, C. Rapid analysis of proteins and peptides by reversed-phase chromatography with polymeric micropellicular sorbents. *Journal of Chromatography A*, v. 445, n. 0, p. 71-86, 1988.

MACRIS, B. J. Production of extracellular lactase from *Fusarium moniliforme*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 161-164, 1981. ISSN 0175-7598.

MAHONEY, R. R. Enzymes exogenous to milk in dairy technology  $\beta$ -d-Galactosidase. In: Editor-in-chief: HUBERT, R. (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier, 2002. p.907-914. ISBN 978-0-12-227235-6.

MAISCHBERGER, T.; LEITNER, E.; NITISINPRASERT, S.; JUAJUN, O.; YAMABHAI, M.; NGUYEN, T. H.; HALTRICH, D. Beta-galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnol J*, v. 5, n. 8, p. 838-47, 2010.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. *J. Ferment Technology*, v. 54, p. 267-286, 1976.

MANZANARES, P.; DE GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel alpha-galactosidase activity. *Enzyme Microb Technol*, v. 22, n. 5, p. 383-90, 1998.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007.

MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E. G.; GRIGORIEV, I. V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C. P.; HAN, C. S.; HO, I.; LARRONDO, L. F.; DE LEON, A. L.; MAGNUSON, J. K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBERTSE, B.; SALAMOV, A. A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C. L.; YAO, J.; BARABOTE, R.; BARBOTE, R.; NELSON, M. A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C. R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D. S.; LUCAS, S. M.; RUBIN, E. M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, T. S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, v. 26, n. 5, p. 553-60, 2008.

MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B. C. C.; VIAN, A.; CARRASCOSA, A. V.; GARCIA, J. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *Journal of Chromatography A*, v. 915, n. 1-2, p. 97-106, 2001.

MATHEW, G. M.; SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Science Industrial Resources*, v. 67, p. 898-907, 2008.

MATTHEWS, S. B.; WAUD, J. P.; ROBERTS, A. G.; CAMPBELL, A. K. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J*, v. 81, n. 953, p. 167-73, 2005.

MATTHIES, C.; ERHARD, H.-P.; DRAKE, H. L. Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils. *Journal of Basic Microbiology*, v. 37, n. 5, p. 335-343, 1997.

MBUYI-KALALA, A.; SCHNEK, A. G.; LEONIS, J. Separation and characterization of four enzyme forms of beta-galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *European Journal of Biochemistry*, v. 178, n. 2, p. 437-43, 1988.

MCPHERSON, A.; WEICKMANN, J. X-ray analysis of new crystal forms of the sweet protein thaumatin. *J Biomol Struct Dyn*, v. 7, n. 5, p. 1053-60, 1990.

MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.52, n.2, p. 97-100, 2003.

MEKALA, N.; SINGHANIA, R.; SUKUMARAN, R.; PANDEY, A. Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 151, n. 2, p. 122-131, 2008.

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

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.

MLICHOVA, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of beta-galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 45, n. 2, p. 47-54, 2006.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl Environ Microbiol*, v. 34, n. 6, p. 777-82, 1977.

MOSHE, R. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science Camp Technology*, v. 6, n. 1, p. 12-19, 1995.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n.1, p. 1119-1127, 2011.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRO, S.  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. *Protein Expression and Purification*, v. 21, n. 1, p. 24-29, 2001.

NANDAKUMAR, M. P.; THAKUR, M. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 29, n. 7, p. 545-551, 1994.

NEVALAINEN, K. M. Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of beta-galactosidase. *Appl Environ Microbiol*, v. 41, n. 3, p. 593-6, 1981.

NIGAM, P.; PANDEY, A. Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. In: NIGAM, P. e PANDEY, A. (Ed.): Springer Netherlands, p.197-221, 2009.

NIVEN, G. W.; SCURLOCK, P. G. A method for the continuous purification of proteins by affinity adsorption. *J Biotechnol*, v. 31, n. 2, p. 179-90, 1993.

NOCHURE, S.V.; ROBERTS, M.F.; DEMAINE, A.L. True cellulase production by *C.thermocellum* grown on different carbon sources. *Biotech. Lett.*, v.15, n. 6, p.641-646, 1993.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. Application relevant studies of fungal beta-galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 149, n. 2, p. 129-38, 2008.



O'CONNELL, S.; WALSH, G. Purification and properties of a beta-galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 141, n. 1, p. 1-14, 2007.

O'CONNOR D. The World Dairy Situation 2005. *International Journal of Dairy Technology*, v.60, n.3, p. 234-235, 2007.

ÖGEL, Z.B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 8, p. 689-695, 2001

OHTSU, N.; MOTOSHIMA, H.; GOTO, K.; TSUKASAKI, F.; MATSUZAWA, H. Thermostable beta-galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus* sp. A4: Enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, n. 8, p. 1539-1545, 1998.

OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGEME-OKERENTA, B. M.; NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 14, p. 1710-1714, 2007.

OKAMOTO, K.; NITTA, Y.; MAEKAWA, N.; YANASE, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, n. 3, p. 273-277, 2011.

ORIOLE, E.; SCETTINO, B.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT, M. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology*, v. 66, n. 1, p. 57-62, 1988.

OSIRIPHUN, S.; JATURAPIREE, P. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from the thermophile B12. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, v.2, n.4, p.135-143, 2009.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 19, p. 7563-7569, 2010.

PALMA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; PRATA, A. M. R.; DE MANCILHA, I. M. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 2, p. 141-145, 1996.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Res*, v. 1, n.1, p. 473137, 2010.

PARK, Y. K.; DE SANTI, M. S. S.; PASTORE, G. M. Production and characterization of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, v. 44, n. 1, p. 100-103, 1979.

PASZEWSKI, A.; CHOJNACKI, T.; LITWIŃSKA, J.; GAJEWSKI, W. Regulation of lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. Acta Biochim Pol, v. 17, n. 4, p. 385-91, 1970.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. Adv Appl Microbiol, v. 44, p. 1-80, 1997

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. São Paulo: MAKRON Books, v.1, p. 521, 1996.

PENNISI, E. In industry, extremophiles begin to make their mark. Science, v. 276, n. 5313, p. 705-6, 1997.

PESELA, B. C. C.; TORRES, R.; FUENTES, M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; VIAN, A.; CARRASCOSA, A. V.; GARCIA, J. L.; GUIŚÁN, J. M.; LAFUENTE, R. F. Selective and mild adsorption of large proteins on lowly activated immobilized metal ion affinity chromatography matrices: Purification of multimeric thermophilic enzymes overexpressed in *Escherichia coli*. Journal of Chromatography A, v. 1, n.2, p. 93-98, 2004.

PIVARNIK, L. F.; SENEAL, A. G.; RAND, A. G. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial beta-galactosidase (lactase) in food processing. Adv Food Nutr Res, v. 38, p. 1-102, 1995.

POUTANEN, K.; RÄTTÖ, M.; PULS, J.; VIKARI, L. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. Journal of Biotechnology, v. 6, n. 1, p. 49-60, 1987.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling, v. 50, n.1, p.1-39, 2007.

PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S.; B.S. CHADHA, B. S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 63-69, 2005.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos.v.2. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry, v. 39, n. 11, p. 1561-1566, 2004.

RABIU, B. A.; JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. Appl Environ Microbiol, v. 67, n. 6, p. 2526-30, 2001.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, v.1, p. 174-188, 1998.

RAJOKA, M. I.; AKHTAR M. W.; HANIF, A.; KHALID, A. M. Production and characterization of a highly active cellobiose from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 991-998, 2006.

RASSI, E. A. Z.; LEE, A. L.; HORVÁTH, C. Reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of peptides and proteins. In: *Separation processes in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, v.1, p.447-494, 1990.

RASTALL, R. A.; MAITIN, V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol*, v. 13, n. 5, p. 490-496, 2002.

RÄTTÖ, M.; SIIKA-AHO, M.; BUCHERT, J.; VALKEAJÄVI, A.; VIKARI, L. Enzymatic hydrolysis of isolated and fibre-bound galactoglucomannans from pine-wood and pine kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 2, p. 449-454, 1993.

RAZA, F.; RAZA, N. A.; HAMEED, U.; HAQ, I. U.; MARIAM, I. Solid state fermentation for the production of  $\beta$ -Glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Institute of Industrial Biotechnology*, v.43, n.1, p. 75-83, 2011.

RAYMOND R, M. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

REESE, E. T. History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. *Biotechnol Bioeng Symp*, n. 6, p. 9-20, 1976.

RESHAMWALA, S.; SHAWKY, B.; DALE, B. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal bermudagrass and switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 51-52, n. 1, p. 43-55, 1995.

REX, L. Activation diagrams in enzyme catalysis. *Journal of Theoretical Biology*, v.24, n.3, p. 247-265, 1969.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. D.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 67-72, 2002.

RIDDER, E. R.; NOKES, S. E.; KNUTSON, B. L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. *American Society of Agricultural Engineers*, v. 42, p.1785-1790, 1999.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*, v. 65, n. 0, p. 43-52, 2001.

ROGALSKI, J.; LOBARZEWSKI, J. The purification and immobilization of *Penicillium notatum*  $\beta$ -galactosidase. *Acta Biotechnologica*, v.15, n.2, p. 211-222, 1995.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. Tratado de Microbiologia. Editora Manole, v.2, p.312, 1991.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J.; GONZÁLEZ, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. Enzyme and Microbial Technology, v. 25, n. 3-5, p. 244-250, 1999.

ROSSI, E.; LENTZE, M. J. Clinical significance of enzymatic deficiencies in the gastrointestinal tract with particular reference to lactase deficiency. Ann Allergy, v. 53, n. 6 Pt 2, p. 649-56, 1984.

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

RUSTOM, I. Y. S.; FODA, M. I.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis — analysis of factors. Food Chemistry, v. 62, n. 2, p. 141-147, 1998.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. Biotechnol Prog, v. 21, n. 3, p. 816-22, 2005.

SAMOSHINA, N. M.; LOTMENCEVA, E. J.; BORISOVA, V. N. Hydrophobic immobilization of fungal  $\beta$ -galactosidases on inorganic supports with carboxylic groups. Prikladnaja biochimija I mikrobiologija. v. 20, n.6, p. 817-821, 1984.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol Adv, v. 27, n. 2, p. 185-94, 2009.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 22, n. 7, p. 558-567, 1998.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). Process Biochemistry, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SEGEL, IRWIN H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley, v.1, n.3, p. 957, 1979.

SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R. L.; SUOMINEN, P. L.; KUBICEK, C. P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. J Bacteriol, v. 179, n. 17, p. 5318-20, 1997.

SENTHILKUMAR, S. R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour Technol*, v. 96, n. 12, p. 1380-6, 2005.

SHAIKH, S. A.; KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Characterization of a thermostable extracellular beta-galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochim Biophys Acta*, v. 1472, n. 1-2, p. 314-22, 1999.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol*, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003.

SHERIDAN, P. P.; BRENCHLEY, J. E. Characterization of a salt-tolerant family 42 beta-galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, n. 6, p. 2438-44, 2000.

SHUKLA, T. P.; WIERZBICKI, L. E. Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 5, n. 3, p. 325-356, 1975.

SIEBER, R.; STRANSKY, M.; DE VRESE, M. Lactose intolerance and consumption of milk and milk products. *Z Ernährungswiss*, v. 36, n. 4, p. 375-93, 1997.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, 2005.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. M. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, p. 27-32, 2007.

SILVEIRA, V. D. Micologia. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydr Res*, v. 303, n. 1, p. 79-92, 1997.

SIMS, I. M.; CRAIK, D. J.; BACIC, A. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydrate Research*, v.303, n.1, p. 79-92, 1997.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, n. 8, p. 761-765, 2001.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. Introduction to food engineering. San Diego, USA: Academic Press, v. 2, n.1, p.499, 1993.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N.R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, v. 1, n.1, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 142, n. 1, p. 60-70, 2007.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 1, p. 541-549, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P.; MATHEW, A.; GOTTUMUKKALA, L.; PANDEY, A. Properties of a major beta-glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 7, p. 1521-1524, 2011.

SOLIS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GUTIERREZ-ROFAS, M. Effects of different carbon source on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biothnology*, v.39, p. 36-41, 1993.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*, v. 31, n. 2, p. 277-283, 2010.

SOUZA, H. K.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 1-9, 2008.

STRYER, Lubert. *Biochemistry*. Guanabara Koogan, v.3, n.1, p. 675-881, 1992.

STROBEL, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v.67, n.1, p.257-268, 2004.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

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

SYKES, D. E.; ABBAS, S. A.; BARLOW, J. J.; MATTA, K. L. Substrate specificity and other properties of the beta-D-galactosidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res*, v. 116, n. 1, p. 127-38, 1983.

SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; VARGA, A.; RÉCZEY, K. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrates. Appl Biochem Biotechnol, v. 84-86, p. 679-91, 2000.

TANAKA, Y.; KAGAMIISHI, A.; KIUCHI, A.; HORIUCHI, T. Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J Biochem, v. 77, n. 1, p. 241-7, 1975.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v. 25, n. 3-5, p. 411-419, 1999.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochemical Engineering Journal, v.13, n.3, p.169-179, 2003.

TEOTIA, S.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, n. 9-10, p. 792-795, 2001.

THIEME, M.; LEHNER, B.; ABELL, R.; HAMILTON, S. K.; KELLNDORFER, J.; POWELL, G.; RIVEROS, J. C. Freshwater conservation planning in data-poor areas: An example from a remote Amazonian basin (Madre de Dios River, Peru and Bolivia). Biological Conservation v.4, p. 484-501, 2007.

THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B.; SCHMIDT, A. S.; JØRGENSEN, H.; AHRING, B. K.; OLSSON, L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. Enzyme and Microbial Technology, v. 32, n. 5, p. 606-615, 2003.

TODOROVA-BALVAY, D.; STOILOVA, I.; GARGOVA, S.; VIJAYALAKSHMI, M. A. An efficient two step purification and molecular characterization of  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. Journal of Molecular Recognition, v.19, n.4, p. 299-304, 2006.

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

TSAO, G. T.; XIA, L.; CAO, N.; GONG, C. S. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production. Appl Biochem Biotechnol, v. 84-86, p. 743-9, 2000.

VAN TILBEURGH, H.; CLAEYSSSENS, M. Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. Febs Letters v.187, n.2, p.283-288, 1985.

VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. Adv Biochem Eng Biotechnol, v. 108, p. 121-45, 2007.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An Overview. *Bioresouce Technology*, v. 36, p. 3-14, 1991.

WASE, D. A.; MCMANAMEY, W. J.; RAYMAHASAY, S.; VAID, A. K. Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor. *Biotechnol Bioeng*, v. 27, n. 8, p. 1166-72, 1985.

WEBER, K.; SUND, H.; WALLENFELLS, K.; *Biochemistry*, v. 1, n. 339, p. 498, 1964.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 3087-3094, 2005.

WESTFALIA, Oelde. Precipitation. Germany, v.1, n.1, p 12-14. Acesso: 01/12/2011.

WIDMER, F.; LEUBA, J. L.  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, v. 100, n. 2, p. 559-567, 1979.

WIDMER, F.; LEUBA, J. L. beta-Galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms. *European Journal of Biochemistry*, v. 100, n. 2, p. 559-567, 1979b.

WOYCHIKA, J. H.; WONDOLOWSKBI, V. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 289, p. 347-351, 1972.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*, v. 24, p. 189-226, 1999.

YANG, Y. H.; WANG, B. C.; WANG, Q. H.; XIANG, L. J.; DUAN, C. R. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2004.

ZADOW, J. G. Lactose: Properties and Uses. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2654-2679, 1984.

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, v. 24, n. 5, p. 452-81, 2006.

ZÚÑIGA, U. F. R.; , SANCHEZ, C. S.; , NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S.; Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.