



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

EDUARDO HENRIQUE DA SILVA RAMOS

*Avaliação da produção de celulasas por fungos
filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato*

Recife 2012

EDUARDO HENRIQUE DA SILVA RAMOS

Avaliação da produção de celulasas por fungos filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Recife 2012

Catálogo na Fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ramos, Eduardo Henrique da Silva

Avaliação da produção de celulasas por fungos filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato/ Eduardo Henrique da Silva Ramos– Recife: O Autor, 2012.

59 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro Cunha

Coorientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Enzimas 2. Fungos 3. Cana de açúcar I. Cunha, Maria das Graças Carneiro (orientadora) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (coorientadora) III. Título**

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 254

EDUARDO HENRIQUE DA SILVA RAMOS

“Avaliação da produção de celulases por fungos filamentosos
utilizando bagaço de cana como substrato”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Presidente)

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador interno)

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Examinador interno)

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto (Examinador externo)

*O nosso mal é que preferirmos
ser arruinados pelos
elogios do que
salvos pelas críticas.*

Autor Desconhecido.

SUMÁRIO

Agradecimentos	VI
Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de Abreviaturas	X
Lista de Figuras	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Microorganismos Celulolíticos	4
2.2.1 Fungos	4
2.2. Bagaço de cana	5
2.3. Organização estrutural de materiais lignocelulósico	6
2.4. Celulose	6
2.5. Hidrólise Enzimática	8
2.6. Celulase	9
2.6.1. Endoglucanase	11
2.6.2. Exoglucanase	11
2.6.3. β-glucosidase	12
2.7. Potenciais aplicações das celulasas	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
5. ARTIGO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	19
6. CONCLUSÃO	34
7. ANEXOS	43
7.1 ANEXO A: Instruções para Submissão de Trabalhos na Revista PAB	44
7.2 ANEXO B: Resumos Publicados em Eventos Científicos	53
Resumo: Activity of Cellulase of Filamentous Fungi Isolated From Substrate Lignocelulolytic	53
Resumo: Endoglucanase Produsction by <i>Fusarium moniliforme</i> URM2463	54
Resumo: Cellulase production by <i>Fusarium moniliforme</i> URM2463	55

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça me permitiu chegar até aqui, suprimindo minhas necessidades e me fortalecendo para conseguir vencer todas as barreiras que surgirem nesta longa caminhada, ao qual chamamos de vida.

In memoriam, a minha mãe Severina Alice da Silva, que quando conosco, me ensinou tudo o que era devido para que eu pudesse me tornar um homem digno e que conseguisse alcançar meus objetivos. Mesmo não estando entre nós, suas palavras ressoam em minha mente e me conduz a galgar um a um os degraus de ascensão que esta vida me oferecer.

Ao meu pai Josué Ferreira Ramos e minha irmã Maria Larissa da Silva Ramos, que sempre estiveram ao meu lado nesta jornada, me transmitindo segurança.

Aos meus parentes pelos seus estímulos constantes.

À Universidade Federal de Pernambuco por ter-me proporcionado uma formação de pós-graduação, abrindo novos horizontes numa longa caminhada que se inicia.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPE, que cedeu gentilmente as suas instalações para a realização deste trabalho.

A minha orientadora professora Dr^a. Maria das Graças Carneiro Cunha por sua grande paciência, dedicação, apoio e por acreditar na minha capacidade no desenvolver deste trabalho.

A minha co-orientadora professora Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto pelo seu auxílio no que lhe era possível. Ambas foram alavancas indispensáveis nas horas mais difíceis para a realização dessa dissertação.

A professora Dr^a Helena Simões Duarte por seu apoio incondicional para meu ingresso no campo da Bioquímica, sempre me incentivando na realização da pós-graduação.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia, Bruno Russo, Ana Linda, Marthyna Souza, Katarina Holanda, Pedro Clemente, Natalie Farias, Paulo Soares, Bartolomeu Medeiros, que ao longo dos meus experimentos, nesta convivência me ensinaram muitas coisas.

Em especial ao meu amigo Romero Marques, o qual me auxiliou no que lhe era possível para o desenvolvimento de minha pesquisa.

A todos do LABENZ, por sua presteza quando lhes solicitava ajuda ou utilização de aparelhagens.

A todos da Micoteca URM do Departamento de Micologia da UFPE, o qual gentilmente cederá as linhagens para o desenvolvimento de minha pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, que de sua forma me ensinaram muito.

Aos meus professores que me ensinaram cada um de sua forma a crescer profissionalmente.

Enfim, agradeço a todos que direto ou indiretamente me ajudaram e apoiaram, tornando possível à realização deste trabalho.

RESUMO

As celulasas são enzimas capazes de degradar a celulose, biopolímero mais abundante na natureza. Estas enzimas têm as mais variadas aplicações, destacando-se nas indústrias alimentícia, têxtil e de papel, e são produzidas por vários microrganismos dentre eles os fungos. Atualmente, sabe-se que as celulasas secretadas por fungos filamentosos são formadas por três componentes enzimáticos, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. O presente trabalho objetivou avaliar a produção de celulasas por fungos filamentosos isolados de bagaço de cana-de-açúcar provenientes da Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE (URM), tendo como substrato o bagaço tratado (NaOH 4% p/v, 121°C, 30 min) e não tratado. Das 8 espécies de fungos avaliadas, contendo como única fonte de carbono a celulose tratada, o *Fusarium moniliforme* URM2463 foi a espécie que apresentou maior índice enzimático (5,42 mm), sendo esta selecionada procedeu-se a fermentação em meio submerso para a avaliação da produção de celulasas. O estudo da produção pelo *F. moniliforme* URM2463 foi realizado com auxílio de um planejamento fatorial completo 2^3 , utilizando como variáveis independentes: tipo de substrato, concentração de substrato e temperatura e, como variáveis resposta: a produção da endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase e a celulase total. Discos de 1,0 cm de diâmetro da cultura, previamente crescida em meio batata dextrose ágar, a 28°C, durante oito dias, foram cortados e transferidos para Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio de crescimento suplementado com diferentes concentrações de fontes de carbono [4, 12 e 20% de bagaço de cana tratado e não tratado (p/v)], a pH 4,5 previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm em diferentes temperaturas (28, 35 e 42°C) durante 240 h. As amostras foram coletadas a cada 48 h, filtradas e centrifugadas a 10.000 g por 5 min. Os sobrenadantes (extratos enzimáticos) obtidos foram utilizados para determinação da atividade enzimática e concentração protéica. O planejamento utilizado revelou que a melhor condição para a produção das enzimas celulolíticas em cultivo submerso ocorreu com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, na concentração de 20% a temperatura de 28°C com 192 h de cultivo, a qual apresentou atividades para celulase total de $2,37 \pm 0,005$ U, $7,12 \times 10^{-3}$ para exocelobiohidrolase, $2,15 \pm 0,005$ U para endoglucanase e $5,9 \pm 0,005$ U para a β -glucosidase. O presente estudo demonstra que entre os fungos avaliados, o *Fusarium moniliforme* URM2463 mostrou ser uma fonte viável para produção de celulasas, com potencial aplicação de interesse biotecnológico.

ABSTRACT

Cellulases are enzymes able to degrade the cellulose, the biopolymer more abundant in the nature. These enzymes have a large variety of applications such as, in the food, textile and paper industry, and are produced by several microorganisms among which are the fungi. At present, it is known that the cellulases segregated by filamentous fungi are composed of three enzymatic components, the endoglucanases, the cellobiohidrolases (exoglucanases) and the β -glucosidases. The present work aimed to evaluate the cellulase production by filamentous fungi isolated from sugarcane bagasse, supplied by Micoteca of Mycology Department of UFPE (URM), with treated (NaOH 4% p/v, 121°C, 30 min) and not treated bagasse as substrate. It was identified that among the 8 species studied the *F. moniliforme* URM2463 was that one which presented the bigger enzymatic index (5.42 mm). After this selection, the fermentation in submerged medium was performed for evaluation of cellulases production. The study of the production by *F. moniliforme* URM2463 was performed with the assistance of a complete 2^3 factorial design using as independent variables the type and substrate concentration and the temperature, and as response variables the endoglucanase production, exoglucanase, β -glucosidase and the total cellulase. Discs of culture with 1.0 cm of diameter, previously grown in potato dextrose agar (PDA) medium at 28°C during eight days, were cut and transferred to 125 mL Erlenmeyers flasks containing 50 mL of growth medium supplemented with different concentrations of carbon sources [4, 12 and 20% of treated and non treated sugarcane bagasse (w/v)], pH 4.5, previously sterilized in autoclave at 121 °C for 20 min. The cultures were then incubated in orbital agitator at 150 rpm at different temperatures of 28, 35 and 42 °C for 240 h. Samples were collected each 48 h, filtered and centrifuged at 10,000 g for 5 min. The supernatant (enzymatic extracts) obtained were used for determination of enzymatic activity and protein concentration. The experimental design showed that the better condition for the production of the enzymes of cellulolytic systems occurred with not treated sugarcane bagasse in the concentration of 20% and temperature of 28 °C with 192 h of culture. Which showed activities for cellulase total of 2.37 ± 0.005 U 7.12×10^{-3} to exocellobiohidrolase, 2.15 ± 0.005 U for endoglucanase and 5.9 ± 0.005 U to β -glucosidase. The present study demonstrates that among the evaluated fungi, the *Fusarium moniliforme* URM2463 showed to be a viable source for cellulases production, with potential application of biotechnological interest.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBHs – Celobiohidrolases

CMC – Carboximetilcelulose

DLS – Domínio de Ligação ao Substrato

DNSA – Ácido Dinitrossalicílico

FPA - Atividade de Papel de Filtro

GP – Grau de Polimerização

HEC - Hidrometilcelulose

Ie – Índice Enzimático

U – Unidade de Atividade enzimática

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- FIGURA 1: Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glucose, produzindo a celobiose (Solomons, 1996) 7
- FIGURA 2: Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (Tímár-Balázs e Eastop, 1998) 7
- FIGURA 3: Associação dos componentes da parede celular. (1) esqueleto da cadeia de celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar; (3) cristalito de celulose; (4) secção transversal da microfibrila da celulose, mostrando cristalitos de celulose embebidos na matriz de hemicelulose e protolignina (Ramos, 2003) 8
- FIGURA 4: Modo de ação do complexo celulásico de *Trichoderma reesei* 10

ARTIGO

- FIGURA 1: Cinética de produção da Celulase total (■), Endoglucanase (◆), β -Glucosidase (▲) e Exocelobiohidrolase (×) pelo *F. moniliforme* URM2463 em cultura submersa utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar não tratado, na concentração de 20 % à 28 °C 40
- FIGURA 2: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de planejamento 2^3 , tendo como variável resposta a produção de Celulase Total para análise do efeito do tipo de substrato em relação a temperatura 41
- FIGURA 3: Gráfico cúbico do efeito das variáveis independentes (tipo de substrato, concentração do substrato e temperatura) na variável resposta produção de β -glucosidase 42

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são importantes na cadeia alimentar devido a sua alta capacidade de decompor a matéria orgânica vegetal morta e por isso reciclam elementos vitais. Pelo uso de enzimas extracelulares como as celulasas, os fungos são os principais decompositores das substâncias que fazem o papel estrutural do organismo a ser decomposto, como a lignina e a celulose, demonstrando assim a sua importância ecológica na ciclagem do carbono, que, por sua vez, se dá início com o processo de fotossíntese (Tortora, 2005). Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pelas indústrias na produção de enzimas, entre elas as celulasas (Menezes, 1997).

A celulose é sintetizada por todas as plantas superiores, por certas bactérias e por alguns protozoários. Estima-se que somente as plantas superiores produzam anualmente cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose, tornando-se o maior reservatório de carbono orgânico na Terra (Festucci-Buselli, 2007). A celulose é um polissacarídeo natural constituído de unidades de glicose encontrada na parede celular de plantas superiores em forte associação com a hemicelulose e a lignina (Voet et al., 2002). Esta forte associação limita a aplicação de materiais lignocelulósicos como para a produção de biomoléculas e combustíveis líquidos. Por esta razão, é de vital importância o desenvolvimento de métodos que possam melhorar sua susceptibilidade aos processos biológicos, tais como a hidrólise enzimática e a fermentação (Ramos, 2001).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante na natureza (Lynd, 2002) e pode ser hidrolisada quimicamente ou por celulasas à glicose. As celulasas porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas as fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (Ramos, 2001).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, porém apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão, papel de filtro, dentre outros, têm sido utilizados como substratos indutores para a produção de exoglucanases permitindo avaliar a atividade do complexo celulolítico total (Ramos, 2003).

Sabe-se que o sistema completo da celulase produzido por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos principais, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases, as quais possuem um importante papel na hidrólise da celulose (Foreman, 2003). Conforme o modelo de sinergismo “endo-exo”, estas enzimas cooperam da seguinte maneira: a) Celobiohidrolase (CBH) atua como exo-enzima, isto é, na extremidade da cadeia, liberando celobiose como seu principal produto; b) A endoglucanase (EG) atua aleatoriamente ao longo da cadeia, produzindo novos locais de ataque para a celobiohidrolase; c) As β -glucosidases completam o processo durante a hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos curtos à glicose (Li et al., 2006).

O processo fermentativo vem sendo aplicado industrialmente para a produção de enzimas aplicadas no processamento de sucos como pectinases (Martins et al., 2002), além de celulases, amilases, lípases e inulinases (Pandey et al., 2000).

O Brasil produz uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais, tais como bagaço de laranja (indústria cítrica) e farelo de trigo, de arroz e de mandioca, além de bagaço de cana. Estes resíduos apresentam baixo custo e boa disponibilidade, fazendo com que o processo fermentativo venha crescendo rapidamente no interesse dos pesquisadores, buscando produtos de alto valor comercial e baixo custo (Ramos, 2003).

Muitos grupos de pesquisa estão selecionando novas celulases com atividade específica elevada e estabilidade nas condições dos processos industriais, onde as celulases, enzimas termoestáveis têm significativas aplicações biotecnológicas (Vieille & Zeikus, 2001).

Tendo em vista a habilidade dos microrganismos em hidrolisar a hemicelulose, o presente projeto visou à obtenção de celulasas por fungos filamentosos, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, uma vez que a cana-de-açúcar utilizada na indústria do álcool e açúcar no Brasil gera excedente de bagaço, mesmo após o seu uso como combustível na geração de energia, o qual poderá ser utilizado como substrato na produção de várias enzimas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microorganismos celulolíticos

Os microorganismos celulolíticos são encontrados em grupos taxonômicos extremamente variados sendo a maioria pertencente às eubactérias e fungos. Os organismos celulolíticos ocorrem em todas as biotas onde há acúmulo de resíduos de celulose. Usualmente, ocorrem em populações mistas, compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas, que interagem sinergicamente. Estas interações levam à completa hidrólise da celulose que é convertida em glucose, e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbias, e em dióxido de carbono, metano e água em condições anaeróbias (Béguin e Aubert, 1994).

2.1.1 Fungos

Embora microorganismos que são capazes de degradar a celulose sejam distribuídos em diferentes grupos, os sistemas de celulasas em bactérias e fungos têm sido estudados mais detalhadamente. (Schwarz, 2001). Assim como bactérias, fungos também hidrolisam polímeros de celulose. *Trichoderma reesei*, um fungo aeróbio altamente celulolítico, é provavelmente o microorganismo cujo sistema de celulasas tem sido mais amplamente estudado. Este microorganismo produz pelo menos seis endoglucanases e duas celobiohidrolases ativas em diferentes fontes de celulose, solúveis ou não, amorfas e cristalinas (Karlsson et al., 2002). Muitas das enzimas produzidas por este fungo foram clonadas e expressas (Gama e Mota, 1998). *Aspergillus terreus* e *Neurospora crassa* são também fungos celulolíticos, onde a produção de celulasas por *A. terreus* na presença de palha de trigo foi de 250 UI/mL, e *N. crassa* produziu cerca de 350 UI/mL de endoglucanase (Carboximetil celulase) com celulose microcristalina como substrato (Entiazi et al., 2001).

Outros fungos de ocorrência natural apresentam complexos enzimáticos capazes de degradar eficientemente a celulose, quer nativa ou pré-tratada. Dentre eles podem ser citados o *Humicola insolens*, *T. viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium brasilianum* e *P. echinulatum* (Camassola et al, 2004). Outros fungos celulolíticos incluem as espécies *Arthographis cellulolyticum*, *Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium funiculosum*, *Sinortizobium freddi* (simbionte), *Sporotrichium pruinosum* (Saha, 2004).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque. Até setembro/2012, a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 300 usinas, processou 311 milhões de toneladas de cana para produzir 12 milhões m³ de álcool. A quantidade de cana processada gerou cerca de 10⁸ toneladas de bagaço e 9 x 10⁷ toneladas de palha (base úmida). Em geral, o processamento de uma tonelada de cana de açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço. Embora boa parte deste bagaço seja utilizada para fins energéticos, essa quantidade representa uma grande oportunidade para a agroindústria nacional (UDOP, 2012).

Há, portanto, um amplo reconhecimento de que a produção anual de bagaço de cana atinge cifras vultuosas e que o aproveitamento destes resíduos é uma necessidade nacional, com amplo espaço para o desenvolvimento de atividades mais nobres do que a geração direta de energia por combustão ou gaseificação. Portanto, muito se tem investido no desenvolvimento de novas tecnologias para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar, particularmente no que tange à produção de etanol e de outros produtos de valor agregados.

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar vem sendo relatada na literatura como matéria-prima para vários processos e produtos. Como exemplos, citam-se a produção direta de energia por combustão ou gaseificação, a produção de polpa celulósica para a produção de

papel e papelão, a obtenção de produtos baseados em processos fermentativos, como etanol, polióis (xilitol) e ácidos orgânicos, a produção de furfural por hidrólise ácida mineral e o preparo de outros produtos de interesse econômico, como ração animal e compósitos (Lobo et al., 2007).

2.3 Organização estrutural de materiais lignocelulósicos

A dificuldade de converter o bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuídas às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular de plantas superiores. As estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina, cuja função é de agir como barreira estrutural à degradação enzimática e/ou microbiana. A compreensão da complexidade estrutural desses materiais requer o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes (Fan et al., 1987).

2.4 Celulose

A celulose tem função estritamente estrutural e é o principal componente da parede primária das plantas. A forma cristalina é também produzida por algas (*Valonia* spp.) e algumas bactérias como *Acetobacter* spp. e *Agrobacterium* spp. As plantas representam o maior reservatório de carbono, sendo a celulose o polímero mais abundante e sua degradação representa uma parte importante no ciclo do carbono. A celulose é biossintetizada a partir da união de unidades de D-glucose. A hidroxila glicosídica do carbono 1 de uma unidade sofre reação de condensação com a hidroxila do carbono 4 de outra unidade, formando a ligação glicosídica do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (Mansfiels e Meder, 2003) (Figura 1).

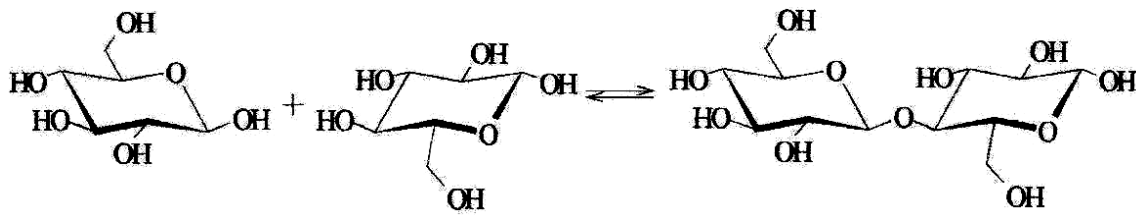


Figura 1: Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glucose, produzindo a celobiose. (Fonte: Solomons, 1996).

Durante a biossíntese de celulose as cadeias individuais de glicose são unidas por ponte de hidrogênio intra e intermoleculares e forças de Walls, que lhes confere uma forma rígida com microfibrilas insolúveis e geralmente resistentes a hidrólise enzimática. Este arranjo depende de uma rede de ligações de hidrogênio cuja otimização provoca uma rotação de 180° da segunda unidade de glucose em relação à primeira, e assim por diante. Portanto, a celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glucose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (Mansfiels e Meder, 2003) (Figura 2).

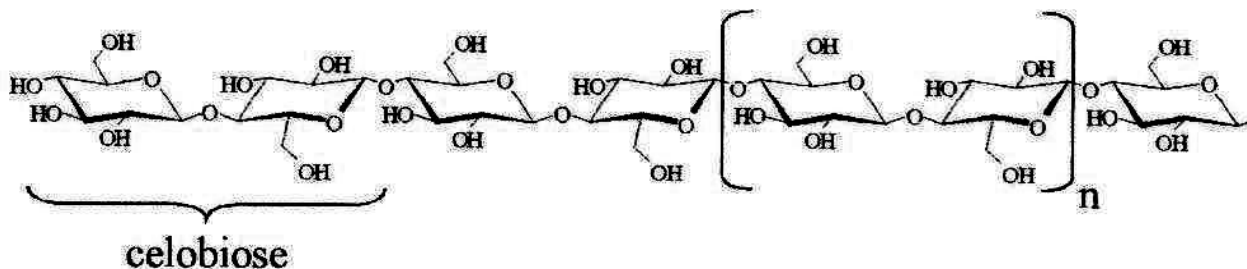


Figura 2: Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (Reproduzido de Tímár-Balázszy e Eastop, 1998).

A cadeia macromolecular da celulose assume uma disposição linear devido a dois fatores: a hidroxila no carbono anomérico possui orientação equatorial porque a conformação em cadeira do anel piranosídico assume a disposição 4C_1 e as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares estabilizam a orientação da cadeia (Fengel e Wegener, 1989). O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de glucose que formam cada cadeia polimérica. O GP da celulose varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento

a que as fibras foram submetidas e o seu envelhecimento. O GP da celulose nativa na madeira é de cerca de 2500 unidades de anidroglicose, enquanto que o GP do algodão é de aproximadamente 11000 unidades. Para o uso têxtil, sugere-se que a celulose deva ter um GP maior do que 2000 unidades (Tímar-Balázsy e Eastop, 2004).

Vários modelos têm sido propostos para explicar a estrutura interna da celulose na parede celular. Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água de vários comprimentos e larguras, denominadas fibrilas elementares (D'Almeida, 1988). As forças latentes, responsáveis pela estabilidade das regiões cristalinas, são basicamente o resultado de um a grande número de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. De acordo com Fengel e Wegner (1989), diversas fibrilas elementares, com uma espessura média de 3,5 nm, se associam uma com as outras formando cristalitos de celulose cujas dimensões dependem da origem e do tratamento da amostra. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemiceluloses, gerando estruturas de 25 nm que são envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e protolignina. O composto natural que resulta dessa associação é chamado de microfibrila de celulose (Figura 3).

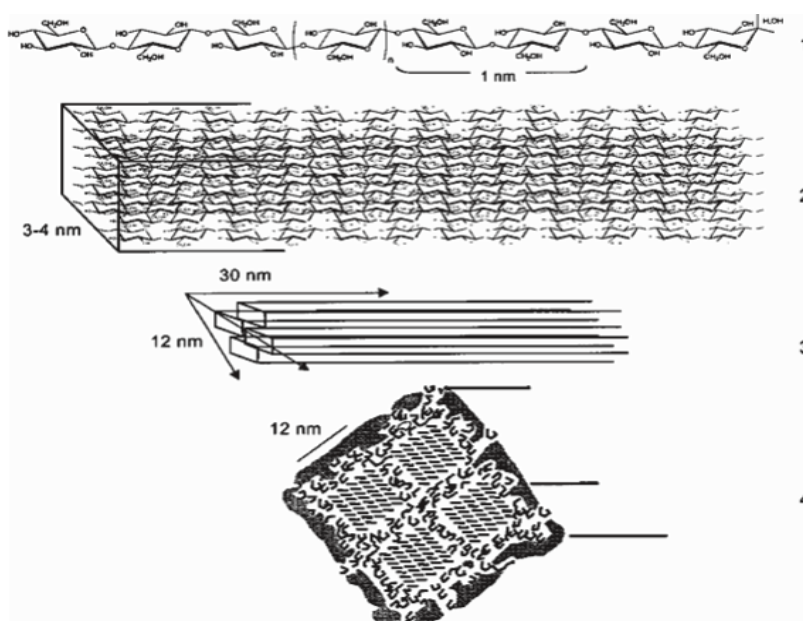


Figura 3: Associação dos componentes da parede celular. (1) esqueleto da cadeia e celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar; (3) cristalito de celulose; (4) secção transversal da microfibrila da celulose, mostrando cristais de celulose embebidos na matriz de hemicelulose e protolignina. (Reproduzida de Ramos, 2003).

2.5 Hidrólise Enzimática

A sacarificação da celulose representa uma alternativa interessante para a destinação de fitobiomassas residuais como o bagaço de cana e resíduos de atividades florestais. No entanto, apesar de muitos estudos, não estão totalmente compreendidos quais as características do substrato que atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (Palomen et al., 2004). Além disso, bioprocessos baseados na hidrólise enzimática requerem substratos produzidos com qualidade adequada a partir de fitobiomassa residual. Diferentes tipos de pré-tratamento podem ser aplicados para promover a conversão destes materiais em substratos susceptíveis à hidrólise enzimática e, dentre estes, o pré-tratamento à vapor tem sido descrito como um dos mais eficientes (Mosier et al., 2005). Paralelamente, estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (Jorgensen et al., 2005).

1

2.6 Celulases

Atualmente, sabe-se que o complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. De acordo com o modelo de sinergismo “endo-exo” (Figura 4), essas enzimas cooperam da seguinte maneira: as celobiohidrolases (CBH) agem como exo-enzimas (e.g., no fim das cadeias) e liberam celobiose como produto principal; as endoglucanase (EG) agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases; as β -glucosidases

completam o processo através da hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos à glucose (Zandoná Filho, 2001; Li et al., 2006).

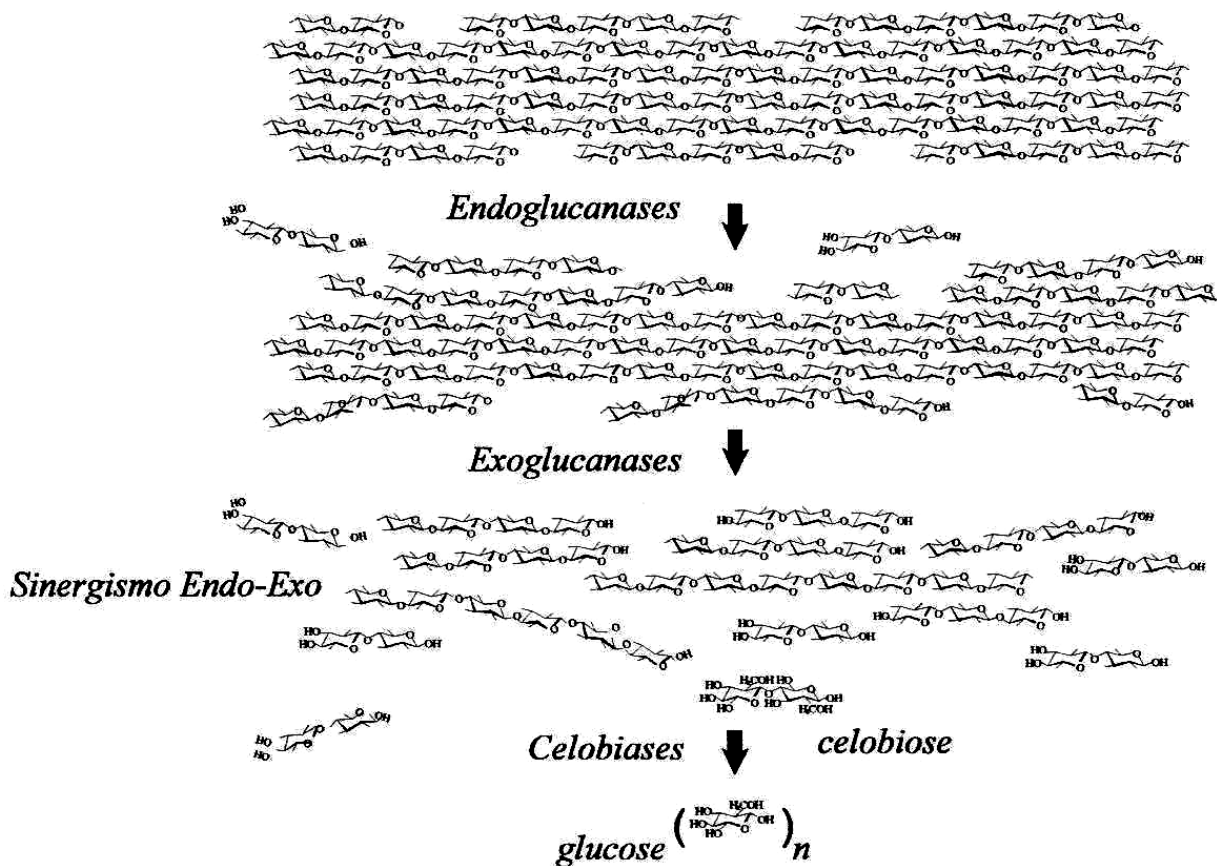


Figura 4: Modo de ação do complexo celulásico de *Trichoderma reesei* (Reproduzido de Tímár-Balázs e Eastop, 1998).

Muitas celulasas são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS), ou “celulose binding domain (CBD)”, e o domínio catalítico, que abriga o sítio ativo. Estes domínios estão ligados um ao outro através de uma cadeia polipeptídica flexível. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato (e.g., ligações internas e ligações terminais, localizadas nas extremidades das cadeias). A função do domínio de ligação ao substrato está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulasas através de interações não-covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, forças

eletroestáticas e interações hidrofóbicas (Ramos, 2003). Palonen (2004) demonstrou que sítios ativos separados dos domínios de ligação ao substrato são capazes de hidrolisar substratos até mesmo insolúveis, embora com menor eficiência. No entanto, em concentrações enzimáticas muito altas, o domínio de ligação ao substrato promove a adsorção não produtiva da enzima ao substrato.

2.6.1 Endoglucanases

As endo-1,4- β -glucanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório. Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e a celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). A celulose cristalina e o algodão, ambos substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam. O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o seu grau de polimerização de maneira considerável. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (Palonen, 2004).

2.6.2 Exoglucanases

As exo-1,4- β -glucanases (celobiohidrolases, CBHs) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia da celulose, produzindo majoritariamente celobiose, além de glucose e celotriose (Zandoná Filho, 2001). Estas enzimas não atuam sobre celulosas solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes seja carboximetílico da CMC ou hidroxietílico do HEC. As exoglucanases atuam sobre celulose

cristalina (Avicel[®]), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre a CMC são característicos para as endoglucanases, enquanto que a atividade contra Avicel[®] caracteriza as CBHs, tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (Divne et al., 1994).

O sítio ativo das celobiohidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celobiose. O DLS é constituído por aproximadamente 40 aminoácidos e possui a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo. A adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina presentes no DLS com as unidades de glucopirranose presentes na superfície da celulose. Devido as suas propriedades e especificidade ao substrato, as celobiohidrolases podem ser facilmente isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade, razão pela qual seus domínios catalíticos e de ligação ao substrato já foram cristalizados e parcialmente caracterizados em relação a sua estrutura tridimensional (Divne et al., 1994).

2.6.3 β -glucosidases

As β -glucosidases, também denominadas celobiasas, têm a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glucose. Estritamente falando, β -glucosidases não são celulasas legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (Medve, 1997).

2.7 Potenciais aplicações das celulases

Nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada a processos de bioconversão, especialmente isolamento, purificação, caracterização e clonagem de enzimas capazes de degradar compostos constituídos por celulose, hemicelulose e lignina. Um futuro promissor, com aplicação destas enzimas nas indústrias têxteis, no tratamento de papeis e de polpas para a remoção ou parcial hidrólise de resíduos de xilana para o seu branqueamento, tem despertado o interesse dos mais diversos grupos de pesquisa (Bhat e Bhat, 1997).

Da mesma maneira, a bioconversão de celulose em glucose abre caminhos para aplicações de processos enzimáticos microbianos para obtenção de etanol (Rabinovich et al., 2002b). Preparações de celulases têm sido empregadas para clarificação de sucos de frutas, onde partículas de polpa permanecem. São também empregadas para auxiliar a extração de sucos, óleos de sementes e no processamento de ração animal para melhorar a digestibilidade de animais monogástricos (Malek et al., 1988).

Na indústria têxtil as celulases podem ser adicionadas a amaciantes de roupas para aparar microfibrilas, que após várias lavagens tendem a se desprender. São ainda empregadas para remover o excesso de cor, para lavagem de jeans e para o amaciamento das fibras (Lynd et al., 2002).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, de proteína de soja, de óleos essenciais, de aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg, 1995).

Outra importante área é o tratamento de resíduos de celulose municipais ou agrícolas. A biomassa destes resíduos acumula-se em grandes quantidades e a cada ano, resultando na deterioração do ambiente e uma perda de recursos potencialmente valiosos. A bioconverção

destes poderia ser uma solução prática para estes problemas. Apesar das inúmeras aplicações, parece que a maior utilização destas enzimas é para conversão à glucose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis (Howard et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a produção de celulase por fungos, tendo como substrato o bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar dentre 8 espécies de fungos oriundos da Micoteca – URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, aquele que possui o maior potencial de produção de celulase.
- Determinar as melhores condições de produção da enzima por planejamento estatístico 2^3 , onde serão avaliados os seguintes parâmetros: temperatura, tipo e concentração do substrato (bagaço de cana).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BHAT, M. K.; BHAT, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583-620.

CAMASSOLA, M., BITTENCOURT, L. R., SHENEM, N. T., ANDREAUS, J., DILLON, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 22, 391–396.

D'ALMEIDA. Celulose e Papel. **INSTITUTO DE PESQUISA TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**, São Paulo: Escola SENAI 2ª Ed. v. 1,1998.

DIVNE, C.; STÅHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J.K.C.; TEERI, T.T.; JONES, A. (1994). The tree-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v.265, p. 524-528.

ENTIAZI, G.; NAGHAVI, N.; BORDBAR, A. (2001). Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. **Biodegradation**, Amsterdam, Netherlands, v. 12, p. 259 – 263.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. (1987). **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 400p.

FENGEL, D.; WEGENER, G. (1989). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter. 613p.

FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N.S. et al. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal Biological Chemistry**, 278:31988–97.

GAMA, F.M. AND MOTA (1998). **Preliminary studies on oligosaccharide synthesis using cellulases**. Carbohydrate Polymers, 38, 279-281.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88.

HOWARD, R.L. et al. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Toronto, v. 2, p. 602-619.

JØRGENSEN, H., MØRKEBERG, A., KROGH, K.B.R., OLSSON, L., (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.36, p.42–48

KARLSSON, J., D. MOMCILOVIC, B. WITTGREN, M. SCHULTEIN, F. TJERNELD, G. BRINKMALM. (2002). **Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Hemicella insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei***. *Biopolymers*. 63: 32-40.

LI, Y.H.; DING, M.; WANG, J.; XU, G.J.; ZHAO, F.A. (2006). Novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, p.430-436.

LYND, R.; WEIME, P.J.; VAN, R.W.H.; ZYLAND I.S. (2002). Pretorius, Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n.66, pp. 506-577

LOBO, P. C.; JAGUARIBE, E. F.; RODRIGUES, J.; ROCHA, F. A. A. (2007). Economics of alternative sugar cane milling options. **Applied Thermal Engineering**, v. 27, p. 1405-1413.

MALEK, M. A. et al. (1998). Bacterial cellulases and saccharification on lignocellulosic materials. **Enzyme of Microbial Technology**, New York, v. 10, p. 750-753

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. (2003). Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**. Dordrecht, Netherlands, v.10, p. 159-169.

MEDVE, J., (1997). **Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II**. PhD Thesis, Department of Biochemistry, Lund University, Lund, Sweden, 49p.

MENEZES, T. J. B. (1997). Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v.31, n. 2, p. 116-120,

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. (2005). **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass**. *Bioresource Technology*, v.96, p.673-686.

ORBERG, P.K. (1995). **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. (2004). Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v.107, p. 65-72.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35, 1153-1169.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. (2002b). Microbial cellulases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 38, n. 4, p. 304-321.

RAMOS, L.P., (2001). Determination of cellulose degree of polymerization using universal calibration and gel permeation chromatography. In: **Seventh Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Proceedings of Poster Presentations. Federal University of Viçosa, Belo Horizonte, pp. 17–24.

RAMOS, L. P., (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, n. 26, 863–871.

SAHA, B. C. (2004). Production, purification and properties of endoglucanase from newly isolated strains of *Mucor circenelloides*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1871 -1876.

SCHWARZ, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 634 – 649.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. (2004). Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann. **Elsevier Science & Technology**, 400p.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. (2005). **Microbiologia**. ed. 8ª, Ed. Artmed, São Paulo - SP, p. 35, 765.

UDOP – **Usinas e Destilarias do Oeste Paulista**. Disponível em <http://www.udop.com.br>, consultado em março de 2009.

VIEILLE, C. & ZEIKUS, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65, 1–43.

VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W. (2002) **Fundamentos de Bioquímica**. Ed. Artmed, São Paulo - SP, p. 204 - 206.

WOOD, T.M.; BHAT, K.M. Methods for measuring cellulase activities. In: Wood, W. A. and Kellog, S. T. (ed.). **Methods in Enzymology**. San Diego : Academic Press, 160, ch 9. 1988.

ZANDONÁ FILHO, A. (2001). **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001. 193 f.

**Artigo a ser submetido para publicação no periódico
Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)**

Produção de celulases por *Fusarium moniliforme* utilizando bagaço de cana como substrato

Eduardo Henrique da Silva Ramos^(1,2), Tatiana Souza Porto^(2,3), Nelson Lima^(1,4), Ana Lúcia Figueiredo Porto^(2,3) e Maria das Graças Carneiro da Cunha^(1,3)

⁽¹⁾ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE. E-mail: ehsr8@hotmail.com, mgcc@ufpe.br.

⁽²⁾ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-170 Recife, PE. E-mail: portots@yahoo.com.br, analuporto@yahoo.com.br.

⁽³⁾ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE.

⁽⁴⁾ IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. E-mail: nelson@ie.uminho.pt.

Resumo - A busca por microrganismos capazes de produzirem celulases para hidrolizar a celulose de resíduos industriais, como o bagaço da cana-de-açúcar, visando a produção de álcool carburante, tem crescido nos últimos anos. O presente trabalho objetivou selecionar espécies de fungos, produtoras de celulases e determinar as melhores condições de fermentação submersa, utilizando como substrato o bagaço da cana-de-açúcar, sem tratamento (*in natura*) e com tratamento alcalino. Uma seleção preliminar identificou que das 8 espécies estudadas, o *Fusarium moniliforme* URM2463 apresentou o maior índice enzimático (5,42 mm), usando como substrato a celulose. Foram realizados experimentos de fermentação, com

o auxílio de um planejamento fatorial completo (2^3), tendo como variáveis independentes o tipo e a concentração do substrato e a temperatura. A produção máxima das enzimas, celulase total (2,37 U), exocellobiohidrolase ($7,12 \times 10^{-3}$ U), endoglucanase (2,15 U) e β -glucosidase (5,9 U) foi obtida com a cultura crescida durante 192 h, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar não tratado na concentração de 20% e à temperatura de 28 °C. Os resultados mostram que entre os fungos avaliados, o *F. moniliforme* URM2463 apresentou ser uma fonte viável para a produção de celulases, com potencial aplicação biotecnológica.

Termo de indexação: celulases, *Fusarium moniliforme*, bagaço de cana-de-açúcar

Abstract- The search of microorganisms able to produce cellulases for hydrolysis of cellulose from industrial residues, such as sugarcane bagasse, looking for the production of fuel alcohol, has grown up in the last few years. The present work addressed to the selection of fungi species, producers of cellulases, and the determination of the best culture condition for the cellulases production through a submerged fermentative process, using sugarcane bagasse, without and with treatment alkaline, as substrate. From a preliminary selection it was found that among 8 studied species, the *Fusarium moniliforme* URM2463 specie presented the higher enzymatic index (5.42mm), using the cellulose as substrate. Fermentation experiments were performed with the assistance of a complete 2^3 factorial design, with the type and concentration of substrate and the temperature as independent variables. The maximum production of enzymes total cellulase (2.37 U), exocellobiohydrolase (7.12×10^{-3} U), endoglucanase (2.15 U) e β -glucosidase (5.9 U) was gotten with culture grown over 192 h, using sugarcane bagasse not treated in the concentration of 20% and at the temperature of 28°C. The results show that among the evaluated fungi, the *F. moniliforme* URM2463 was found to be a viable source for cellulase production, with potential application or biotechnological interest.

Term index: cellulases, *Fusarium moniliforme*, sugarcane bagasse

Introdução

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a celulose e a hidrólise da celulose cristalina pode ser realizada por um sistema de celulasas fúngicas, quando três principais enzimas desempenham um papel essencial. Estas celulasas são: (a) celobiohidrolases, que funcionam como uma exoglucanase liberando celobiose como principal produto; (b) endoglucanases, que agem aleatoriamente ao longo da cadeia de celulose para a produção de novos sítios de ataque para as celobiohidrolases e (c) β -glucosidase, que hidrolisa a celobiose, um potencial inibidor das celobiohidrolases, liberando glicose. Este sistema de cooperação envolve o chamado "efeito de sinergismo", ou seja, um reforço da atividade individualmente acrescentado pelas enzimas (Li et al., 2006).

As celulasas podem ser utilizadas em várias aplicações industriais, tais como na indústria de detergentes (limpeza, clarificação da cor, anti-deposição), têxtil (acabamento de jeans, amolecimento de algodão), de polpa de celulose e papel (extração de polpa de celulose e de papel), de alimentícia (transformação de amido, produção de ração animal, fermentação alcoólica de grãos, de malte e de cervejas, extração de sucos de frutas e vegetais) (Kirk et al., 2002).

No entanto, o grande entrave da aplicação da celulase na indústria é o alto custo de produção da enzima. Substancialmente, a redução de custos pode ser possível, explorando formas de conversão da celulose usando microorganismos que produzam enzimas celulolíticas. É de fundamental importância a procura de microrganismos que tenham uma alta taxa de produção de celulasas (Kotchoni & Shonukan, 2002).

Outra abordagem para reduzir o custo de produção das celulasas é o uso de substrato barato e facilmente disponível. Vários estudos na literatura indicam que a fonte de carbono utilizada nos cultivos é um dos mais importantes fatores que afetam o custo e o rendimento de

78 produção das celulases. Por conseguinte, para a redução do custo da enzima, a seleção de um
79 substrato barato e facilmente disponível parece ser essencial (Senthilkumar et al., 2005). A
80 biomassa lignocelulolítica, especialmente resíduos agrícolas, tais como palha de milho e
81 farelo de trigo, reúnem estes requisitos e são conhecidos por serem uma excelente fonte de
82 carbono para a produção das enzimas microbianas (Yang et al., 2006).

83 Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-
84 de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque. Até setembro/2012, a
85 agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 300 usinas,
86 processou 311 milhões de toneladas de cana para produzir 12 milhões m³ de álcool. A
87 quantidade de cana processada gerou cerca de 10⁸ toneladas de bagaço e 9 x 10⁷ toneladas de
88 palha (base úmida) (UDOP, 2007).

89 Apesar da utilização do bagaço como combustível, na geração de energia, pelas usinas
90 de açúcar e álcool, existem ainda enormes excedentes, que poderão ser utilizados como
91 substrato por microrganismos capazes de produzirem enzimas celulolíticas de modo a
92 viabilizar o aumento na produção de álcool carburante. Deste modo o presente trabalho
93 objetivou selecionar espécies de fungos, produtores de celulases e determinar as melhores
94 condições para a produção do sistema enzimático através de fermentação submersa, utilizando
95 bagaço de cana como substrato.

97 **Materiais e Métodos**

99 **Reagentes**

100 Avicel®, corante Remazol “Brilliant Blue”, Carboximetilcelulose, corante Vermelho
101 Congo e a Albumina de Soro Bovino, foram adquiridos da Sigma; Ácido Dinitrossalicílico
102 foi obtido da Merck; Kit de glicose enzimática líquida foi obtido da Doles; Meio de cultura

103 Batata-Dextrose-Ágar foi obtido da Acumedia. Todos os demais reagentes foram de grau
104 analítico.

105 **Microorganismos**

106 Foram utilizadas 8 espécies de fungos (*Aspergillus niger* URM2813, *A. flavus*
107 URM2814, *A. fumigatus* URM2815, *Rhizopus arrhizus* URM2816, *Paecilomyces variotti*
108 URM2818, *Fusarium moniliforme* URM2463, *Thielavia terricola* URM1767, *Thielaviopsis*
109 *paradoxa* URM2386), provenientes da Micoteca - URM, do Departamento de Micologia do
110 Centro de Ciências Biológicas da UFPE, as quais foram isoladas do bagaço de cana-de-
111 açúcar. As culturas foram mantidas em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), sendo as mesmas
112 repicadas a cada 30 dias.

113

114 **Seleção dos fungos com potencial celulolítico**

115 Os fungos foram cultivados em meio sintético descrito por Nogueira e Cavalcanti
116 (1996) modificado pelo uso da celulose tratada, como única fonte de carbono, com a seguinte
117 constituição: NaNO₃ 0,3 % (p/v), K₂HPO₄ 0,1 % (p/v), MgSO₄ 0,05 % (p/v), KCl 0,05 %
118 (p/v), FeSO₄.7H₂O : 0,001 % (p/v), Celulose: 1,0 % (p/v), Agar 2,0 % (p/v), H₂O 1000 mL. O
119 tratamento da celulose ocorreu com a suspensão de 30 g de celulose suspendida em 400 mL
120 de ácido ortofosfórico a 85 % segundo a metodologia descrita por Tansey (1971).

121 Os fungos foram inoculados com auxílio de agulha no centro das placas de Petri, as
122 quais foram incubadas por 4 dias a 28 °C. Em seguida os fungos foram submetidos a choque
123 térmico por 16 h a 50 °C, em estufa bacteriológica. Após este período, foram adicionados 10
124 mL da solução corante de vermelho Congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0 que
125 foi mantida por 30 min sendo em seguida descartada e as culturas foram lavadas com 5,0 mL
126 de solução de NaCl 0,5 M no mesmo tampão. Os diâmetros das colônias e dos halos
127 produzidos foram medidos com paquímetro e estabelecido o índice enzimático (Ie), o qual é o

128 resultado da divisão do diâmetro do halo de degradação (θ_h) pelo diâmetro do halo da colônia
129 (θ_c) (Nogueira e Cavalcanti, 1996). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

131 **Produção de Celulases**

132 O fungo que apresentou maior índice enzimático foi cultivado em meio BDA a 28 °C
133 durante 192 h. Discos de 1,0 cm de diâmetro da parte periférica da colônia foram cortados e
134 transferidos para Erlenmeyers (125 mL), contendo 50 mL de meio de crescimento descrito
135 por Jurasek e Paice (1988) modificado, conforme segue: 0,75 % (p/v) peptona; 1,55 % (p/v)
136 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,13 % (p/v) K_2HPO_4 ; 0,05 % (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 mL da solução de
137 micronutrientes*, suplementado com diferentes concentrações de fontes de carbono [4, 12, ou
138 20 % de bagaço de cana tratado e não tratado (p/v)] e o pH foi ajustado para 4,5 antes da
139 esterilização a 121 °C por 20 min. *A composição da solução de micronutrientes, por 100 mL
140 de água destilada, foi: 1,0 mL HCl concentrado; 0,5 % (p/v) FeSO_4 ; 0,2 % (p/v) MnSO_4 ; 0,17
141 % (p/v) ZnCl_2 ; 0,2 % (p/v) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O bagaço de cana foi inicialmente cortado e seco a
142 65 °C em estufa por 168 h, sendo em seguida triturado até formar um pó fino. Posteriormente
143 foi lavado exaustivamente com água, até a água sair incolor, sendo novamente seco a 65 °C
144 até peso constante e denominado de bagaço não tratado. O bagaço de cana tratado foi obtido
145 pela hidrólise de 100 g de bagaço em 2L de solução de hidróxido de sódio a 4 % (p/v) em
146 Erlenmeyer de 6 L a 121 °C por 30 min em autoclave. O material recuperado por filtração foi
147 então lavado com água corrente até a neutralidade e seco a 65 °C em estufa até peso constante
148 (Aguiar & Menezes, 2000).

149 As culturas foram incubadas sob agitação orbital a 150 rpm a diferentes temperaturas
150 de 28, 35 e 42 °C por 240 h. As amostras de 50 mL foram coletadas a cada 48 h, filtradas e
151 centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes (extratos enzimáticos) obtidos foram
152 utilizados para determinação da atividade enzimática e concentração protéica.

153

154 Planejamento experimental e análise estatística da produção de celulasas

155 Um planejamento fatorial 2^3 (Barros Neto et al., 1996) foi usado para avaliar os efeitos
156 das variáveis independentes: tipo de substrato (bagaço de cana tratado e não tratado),
157 concentração de substrato [4, 12 e 20 % (p/v)] e temperatura (28, 35 e 42 °C) sobre as
158 variáveis resposta: celulase total, exocelobiohidrolase, endoglucanase e da β -glucosidase. Um
159 conjunto de 8 experimentos foi realizado, mais 4 repetições do nível central, permitindo
160 estimar o erro puro. As variáveis e respectivos níveis estão exibidos na Tabela 1. Os
161 resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com nível de
162 significância de $p \leq 0,05$. Toda a análise estatística e gráfica foi executada pelo programa
163 Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. 2008, E.U.A.).

164

165 Determinação Protéica

166 A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976) usando
167 albumina de soro de bovino como padrão.

168

169 Determinação da atividade celulolítica

170 As atividades da celulase total, exocelobiohidrolase, endoglucanase e β -glucosidase
171 foram realizadas segundo a metodologia descrita por Wood e Bhat (1988) como segue: Para a
172 determinação da atividade de Celulase Total (atividade em papel de filtro), alíquotas de 1,0
173 mL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 foram adicionadas a tubos de ensaios contendo 0,5 mL
174 do extrato enzimático e um disco de 2 cm de diâmetro de papel de filtro Whatman N° 1 foi
175 introduzido e em seguida agitado com auxílio de bastão de vidro. A mistura foi incubada a 50
176 °C por 60 min em estufa e posteriormente 3 mL do reagente DNSA foi adicionado para parar
177 a reação e os tubos levados para o banho de água fervente, durante 5 min e em seguida

resfriados em água fria. Alíquota de 20 mL de água destilada foi adicionada ao conteúdo dos tubos, homogeneizados, mantidos em repouso durante 20 min e realizada a leitura da absorbância a 540 nm (espectrofotômetro marca Smart.Spec modelo 3000) e a atividade expressa em U. Uma unidade (U) de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de glicose/mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade de Exocelobiohidrolase

Amostras de 1,0 mL do extrato enzimático foram adicionadas em tubos de ensaio com 1,5 mL de suspensão de 1 % de Avicel® colorida com Remazol Brilliant Blue R (RBBR) e agitados em vórtex, vagarosamente. A mistura da reação foi incubada a 100 rpm por 1 h a 50 °C e em seguida, os tubos foram colocados em banho em ebulição por 5 min para inativação da enzima. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min e a absorbância das soluções límpidas, após serem resfriadas, foram medidas a 595 nm. Para transformar a absorbância em μmoles de RBBR, utilizou-se a absortividade molar do RBBR, que é 5901,1 $\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Ng e Zeikus, 1980). Uma unidade (U) de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de RBBR/mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade de Endoglucanase

Amostras de 0,5 mL do extrato enzimático diluído com tampão citrato 0,05M, pH 4,8, foram transferidas para tubos de ensaio e aquecidas a 50 °C por 5 min. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de carboximetilcelulose a 2 % (p/v), homogeneizados e incubados por 30 min a 48 °C. Ao final da incubação, foram adicionados 3 mL de reagente DNSA e levado a banho em ebulição por 5 min, em seguida resfriados e realizada a leitura da absorbância a 540

nm em espectrofotômetro. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose/mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade de β -Glucosidase

Amostras de 0,5 mL de extrato enzimático foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de celobiose (15mM) em tampão de sódio citrato (50 mM, pH 4,8). A reação foi incubada a 50 °C por 30 min. A quantidade de açúcares redutores foi determinada usando um Kit de reagente glicose oxidase (Merk). Uma unidade (U) de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de glicose/mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

.

Resultados e Discussão

Dos oito fungos estudados, sete (87,5%) foram capazes de degradar o meio sintético contendo apenas celulose como substrato, evidenciado pela presença de uma zona clara ao redor das colônias, indicadora de degradação (Tabela 2). O *Rhizopus arrhizus* URM2816 foi o único que não apresentou halo de degradação enquanto que os demais fungos demonstraram índices enzimáticos (Ie) compreendidos entre 3,0 (*Aspergillus niger* URM2813) e 5,42 (*Fusarium moniliforme* URM2463). Rugger & Tauk-Tornisielo (2004) estudando 80 linhagens fúngicas crescidas em meio sintético contendo carboximetilcelulose como fonte de carbono, relataram que apenas 36 linhagens (45 %) apresentaram halo indicador de degradação, apresentando índices enzimáticos que variaram de 1,1 para *Trichoderma harzianum* II e 6,0 para *Penicillium herquei* e *Trichoderma hamatum* I.

Por ter sido o *Fusarium moniliforme* URM2463 o que apresentou maior Ie (5,42) foi então selecionado para o estudo da produção das enzimas do complexo celulásico (celulase total, exocelobiohidrolase, endoglucanase e β -glucosidase) com auxílio de um planejamento experimental 2^3 , tendo como variáveis independentes: tipo de substrato, concentração de substrato e temperatura. Os resultados obtidos com o fatorial 2^3 (dados não mostrados) revelaram que a melhor condição para a produção das enzimas ocorreu com os parâmetros: substrato não tratado, concentração de 20% e temperatura de 28°C.

A Figura 1 apresenta a cinética de produção das enzimas celulolíticas em meio sintético contendo 20 % de bagaço sem tratamento, a 150 rpm e a 28 °C ao longo de 240 h, onde se verificam comportamentos semelhantes para a celulase total e endoglucanase, as quais apresentam picos máximos com 192 h, enquanto que a exocelobiohidrolase e a β -glucosidase apresentaram picos máximos mais cedo (144 h), e mantiveram-se estáveis até 192 h. Estes foram os tempos necessários para atingir naturalmente os níveis máximos de atividade de 2,37 U para a celulase total, de 2,15 U para a endoglucanase, de $7,12 \times 10^{-3}$ U para a exocelobiohidrolase e de 5,9 U para β -glucosidase.

Este mesmo tempo de 192h foi relatado como sendo o melhor tempo para as atividades máximas da endoglucanase, exocelobiohidrolase, β -glucosidase e celulase total utilizando bagaço de cana sem e com seis diferentes tratamentos por cocultivação de *A. ellipticus* e *A. fumigatus* (Gupte & Madamwar, 1997). Segundo Chahal et al. (1992) o tempo necessário para serem naturalmente atingidos os níveis máximos de atividade pode ser afetado por vários fatores, incluindo a presença de diferentes proporções e tipos de substratos celulolíticos.

A cinética de produção da endoglucanase e β -glucosidase pelo fungo *A. niger* MS82 realizada em meio basal contendo CMC, pH 4 a 180 rpm e a 35 °C foi relatada por Sohail et al. (2009). Estes autores reportaram que a endoglucanase iniciou a sua produção mais cedo,

ainda na fase lag, atingindo o pico máximo ($\sim 0,31$ U) com 120 h, enquanto que para a β -glucosidase teve início na fase log (72 h) e continuou em crescimento até o final do experimento ($\sim 0,24$ U) 225 h. Embora o tempo para atingir a produção máxima destas enzimas tenha sido menor ao que foi obtido pelo *Fusarium moniliforme* URM2463, os valores das atividades foram muito inferiores aos obtidos neste trabalho.

A concentração e o tipo de celulose influenciaram a atividade da exocelobiohidrolase produzida por *Lentinula edodes* CC17, no meio de cultura descrito por Jurasek & Paice (1988) contendo apenas Avicel® na concentração de 1,7 % (p/v) onde não foi detectada atividade porém, para 0,5 % (p/v) de Avicel® e peptona a 2 % (p/v) dois picos foram obtidos com 48 e 144 h de incubação, apresentando 74×10^{-3} U/mg e 50×10^{-3} U/mg, respectivamente. Quando o Avicel® foi substituído pelo CMC, os picos se apresentaram após 96 e 192 h, e a atividade decresceu para menos da metade (Pereira Júnior et al., 2003). No nosso trabalho, utilizando o mesmo meio com 20 % de bagaço não tratado o *Fusarium moniliforme* URM2463 apresentou o pico de atividade para exocelobiohidrolase de $63,10 \times 10^{-3}$ U/mg, com 144 h de cultivo e manteve-se constante até o final do experimento (240 h).

Convém destacar que a celulase total (FPase) apresentou o seu valor máximo de 2,37 U após 192 h e permaneceu estável até o final do estudo (240 h) demonstrando estabilidade na produção das enzimas do sistema celulolítico. Rugger & Tauk-Tornisielo (2004) relataram que a atividade da celulase total (FPase) foi observada em 64 linhagens fúngicas (80 %), das 80 estudadas, após 336 h a 28 °C crescidas em caldo sintético contendo como fonte de carbono papel de filtro Whatman nº 1 de 10 cm^2 , apresentando atividade FPase que variou entre $1,4 \times 10^{-2}$ e $2,3 \times 10^{-2}$ U. Porém, quatro linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* cultivadas em diferentes meios de cultura apresentaram atividade FPase que variaram de 3,9 a 16,3 U (Cochet, 1991).

Tem sido estabelecido que a secreção de celulasas extracelulares por microorganismos é substancialmente influenciada não apenas pelos componentes do meio, mas também pelas condições da cultura, incluindo o tipo de substrato, a concentração do substrato e a temperatura (Sohail et al., 2009, Aguiar & Menezes, 2000). A análise estatística do planejamento realizado para produção de celulasas (192 h) pelo *Fusarium moniliforme* URM2463, demonstrou que as variáveis possuíam efeitos significativos para a produção do complexo celulolítico. O efeito estimado das variáveis independentes, e as suas interações com atividade das enzimas celulolíticas, com um nível de confiança de 95% estão representados na Tabela 3.

Observa-se que para a produção de celulase total, a interação (1x3) entre o tipo de substrato (1) e a temperatura (3) apresenta um efeito positivo significativo (Tabela 3). A interpretação geométrica da interação (1x3) está ilustrada na Figura 2 por um sistema cartesiano, com um eixo para cada variável. Verifica-se que a condição do tipo de substrato “não tratado” e a temperatura de 28 °C exibe o valor mais favorável (2,29), indicando que esta condição favorece a produção de celulase total. Isto significa que o nível inferior do substrato com a simultânea diminuição da temperatura favorece a produção de celulasas. O aumento da concentração do substrato também foi significativo e positivo, indicando que o aumento da concentração do substrato favorece a produção de celulasas. O efeito estimado destas variáveis independentes sugere a importância do tipo de substrato e do comportamento da temperatura. Sobre estes fatores, Immanuel et al. (2007) relataram que temperaturas de 40 e 50°C e diferentes tipos de substrato fibra de coco e pó de serra influenciaram a produção da celulase total pelos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fulmigatus*. Também, Sohail et al. (2009) relataram que a produção das enzimas endoglucanase e β -glucosidase pelo *A. niger* MS82 foi drasticamente reduzida quando a temperatura da incubação foi aumentada de 30 ° C para 40 ° C.

Na Tabela 3 observa-se ainda que a variável temperatura (3) apresenta um efeito negativo significativo para a produção de celulase total, ou seja, quanto menor for a temperatura maior será a produção das enzimas. A variável concentração de substrato (2) apresenta um efeito positivo significativo, significando que o aumento da concentração do substrato aumenta a produção enzimática aliás, de acordo com a discussão atrás comentada.

Para a enzima exocelobiohidrolase, após a análise dos efeitos das variáveis verifica-se que a concentração de substrato (2) apresenta um efeito positivo (Tabela 3). Isto significa que o aumento da concentração do substrato favorece a produção da enzima. Também, foi encontrado que a interação entre o tipo de substrato (1) e a temperatura (3), apresenta um efeito positivo significativo, semelhantemente ao apresentado pela celulase total.

Observando o efeito das variáveis e suas interações na produção da endoglucanase, verificamos que a interação entre o tipo de substrato (1) e a temperatura (3) apresenta novamente um efeito positivo significativo com nível de confiança de 95 %. Os efeitos encontrados para endoglucanase apresentam um comportamento semelhante ao da celulase total e exocelobiohidrolase, no qual observamos que a interação entre o tipo de substrato (bagaço de cana não tratado) e a temperatura de 28 °C, viabiliza a produção destas enzimas pelo fungo. Outro efeito significativo que se detecta é da variável temperatura (3) que apresenta um efeito negativo.

Em relação à produção de β -glucosidase verifica-se que todas as variáveis e suas interações apresentam efeitos significativos (Tabela 3). As variáveis tipo de substrato (1) e temperatura (3) apresentam efeito negativo significativo com nível de confiança de 95 %. Isto significa que uma redução das variáveis (1) e (3) favorece o aumento da produção da enzima. Observa-se ainda, que a interação entre as três variáveis (1x2x3), apresenta ainda um efeito positivo significativo com os efeitos estimados anteriormente encontrados.

A interação das três variáveis independentes na produção da β -glucosidase está ilustrada na Figura 4. Dentro dos níveis estudados para as três variáveis independentes, os valores estimados para a produção da enzima mostram que seja qual for o tipo de substrato (a produção da enzima aumenta com a concentração do substrato), seja qual for o tipo de substrato (a produção da enzima aumenta com a diminuição da temperatura) e é melhor com o substrato não tratado. O valor real (13,658) para a produção da enzima β -glucosidase é encontrado com o substrato não tratado na concentração de 20 % a 28 °C. Sohail et al. (2009) avaliaram a produção de endoglucanase e β -glucosidase pelo *Aspergillus niger* usando como substrato grama e palha de milho, em temperaturas entre 25 °C e 40 °C e observaram que o tipo de substrato e a temperatura influenciaram a produção destas celulasas.

Conclusão

Dos diferentes fungos avaliados, o *Fusarium moniliforme* URM2463 mostrou ser o maior produtor de celulasas apresentando um Ie de 5,42 mm. A melhor condição para a produção das enzimas do complexo celulolítico pelo *Fusarium moniliforme* URM2463 em cultivo submerso foi obtido com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, na concentração de 20 % a temperatura de 28 °C após 192h. Nestas condições foi possível obter os níveis máximos de atividade de 2,37 U para a celulase total, de 2,15 U para a endoglucanase, de $7,12 \times 10^{-3}$ U para a exocelobiohidrolase e de 5,9 U para β -glucosidase. O *Fusarium moniliforme* URM2463 demontou ser uma potencial fonte para a produção de celulasas de interesse biotecnológico.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT RENEBRA/nº 552410/2005-5 e CNPq/MCT /CTBiotecnologia/nº 31/2006) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa em Ensino Superior – CAPES, Brasil.

Referências

- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.B.J. Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B CEPPA**, Curitiba, v.18, n.1, p. 57-70, 2000.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. **Planejamento e otimização de experimentos**. UNICAMP, Campinas, 1996. p.66.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Orlando, v.72, p.248-254, 1976.
- CHAHAL, P.S.; CHARAL, D.S.; ANDRE, G. Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels, **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.74, pp. 126-128, 1992
- COCHET, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. **Enzyme and Microbial Technology**. v.13, p.104-109, 1991.
- GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Production of Cellulolytic Enzymes by Co-culturing of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus* Grown on Bagasse under Solid State Fermentation. **Applied Biochemical and Biotechnology**. v.62, p. 267-274, 1997.
- IMMANUEL, G.; BHAGAVATH, C.M.A.; RAJ, P.I.; ESAKKIRAJ, P.; PALAVESAM, A. Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* Fermented in Coir waste and Sawdust. **The Internet Journal of Microbiology**. v. 3, n.1. p. 1-12, 2007.
- JURASEK, L.; PAICE, M.G. Xylanase A of *Schizophyllum comune*. In: Wood, W. A. and Kellog, S. T. (eds.). **Methods in Enzimology**. San Diego : Academic Press, 160, ch 83. 1988.

- 381 KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. Current
382 Opinion in Biotechnology, v.13, p.345–351, 2002.
- 383 KOTCHONI, S.O.; SHONUKAN, O.O.; Regulatory mutations affecting the synthesis of
384 cellulase in *Bacillus pumilus* . **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.18,
385 p.487-491, 2002.
- 386 LI, Y.H.; DING, M.; WANG, J.; XU, G.J.; ZHAO, F.A. Novel thermoacidophilic
387 endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1.
388 **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.70, p.430-436, 2006.
- 389 NG, T.K.; ZEIKUS, J.G. A continuous spectrophotometric assay for the determination of
390 cellulase solubilizing activity. **Analytic Biochemistry**. v.103, n.1, p.42-50, 1980.
- 391 NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed
392 oats. **Revista de Microbiologia**. v.27, p.7-9, 1996.
- 393 PEREIRA JUNIOR, J.A.S.P.; CORREIA, M.J.; OLIVEIRA, N.T. Cellulase activity of a
394 *Lentinula edodes* (Berk) Pegl. strain grown in media containing carboximetilcellulose or
395 microcrystalline cellulose, **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.4, p.333-337,
396 2003.
- 397 RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados da
398 Estação de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.** v.27, n.2, p. 205-211, 2004.
- 399 SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S.A. Cellulase production from
400 *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**. In press,
401 [doi:10.1016/j.nbt.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002), 2009.
- 402 SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P.
403 Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus*
404 *fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource**
405 **Technology**. v.96, p. 1380-1386, 2005.
- 406 TANSEY, M.R. Agar-diffusions assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. **Archives**
407 **of Microbiology**. .77, p.1-11, 1971
- 408 UDOP. Usinas e Destilarias do Oeste Paulista. Disponível em: <http://www.udop.com.br>.
409 Acesso em: 8 out. 2012.
- 410 WOOD, T.M.; BHAT, K.M. Methods for measuring cellulase activities. In: Wood, W. A. and
411 Kellogg, S. T. (ed.). **Methods in Enzymology**. San Diego : Academic Press, 160, ch 9. 1988.

412 YANG, S.Q.; YAN, Q.J.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; TIAN, H.M.; WANG, Y.Z.; High-level of
413 xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces themophila* J18 on wheat straw in
414 solid-state fermentation. **Bioresourcve Technology**. v.97, p.1794-1800, 2006.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento estatístico fatorial 2³ para o estudo da produção de celulasas pelo *Fusarium moniliforme* URM2463.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-)	Central (0)	Superior (+)
Tipo de Substrato (Bagaço de cana de açúcar)	NT	50 % NT + 50 %T	T
Concentração do Substrato (%)	4	12	20
Temperatura (°C)	28	35	42

(NT) Não tratado, (T) Tratado.

Tabela 2. Atividade celulolítica dos diferentes fungos filamentosos.

Fungos	URM	θ_c (mm)	θ_h (mm)	Ie
<i>Aspergillus flavus</i>	2814	5,0	26,7	5,34
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2815	4,3	20,3	4,72
<i>Aspergillus niger</i>	2813	7,0	21,0	3,00
<i>Fusarium moniliforme</i>	2463	8,3	45,0	5,42
<i>Paecilomyces variotti</i>	2818	4,7	21,7	4,61
<i>Rhizopus arrhizus</i>	2816	-	-	-
<i>Thielavia terricola</i>	2767	11,7	45,3	3,87
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	2386	8,3	33,0	3,92

θ_c = diâmetro da colônia; θ_h = diâmetro do halo; Ie = índice enzimático, (-) = não detectado.

Tabela 3. Estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações na produção das enzimas celulolíticas pelo *Fusarium moniliforme* URM2463 após 192 h de cultivo submerso.

Variáveis	Celulase Total	Exocelobiohidrolase	Endoglucanase	β -Glucosidase
(1)	1.443	1.563	- 0.737	- 43.582*
(2)	13.568*	9.228*	2.170	17.626*
(3)	- 14.145*	- 2.284	- 4.301*	- 42.789*
1x2	- 12.124*	2.510	- 3.031	- 9.011*
1x3	31.754*	6.537*	8.111*	38.709*
2x3	- 1.155	- 2.270	- 2.007	- 11.618*
1x2x3	0.289	1.563	0.819	13.658*

(1) Tipo de substrato, (2) Concentração do Substrato, (3) Temperatura, (*) Efeito Significativo.

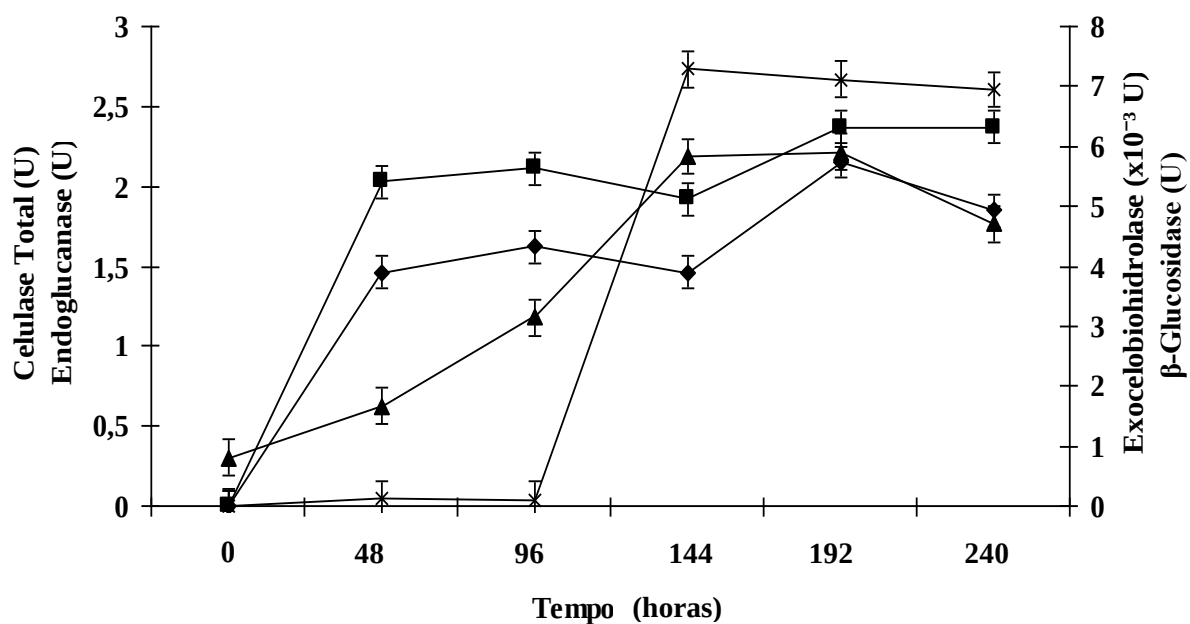


Figura 1. Cinética de produção da Celulase total (■), Endoglucanase (◆), β-Glucosidase (▲) e Exocelobiohidrolase (×) pelo *F. moniliforme* URM2463 em cultura submersa utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar não tratado, na concentração de 20 % à 28 °C.

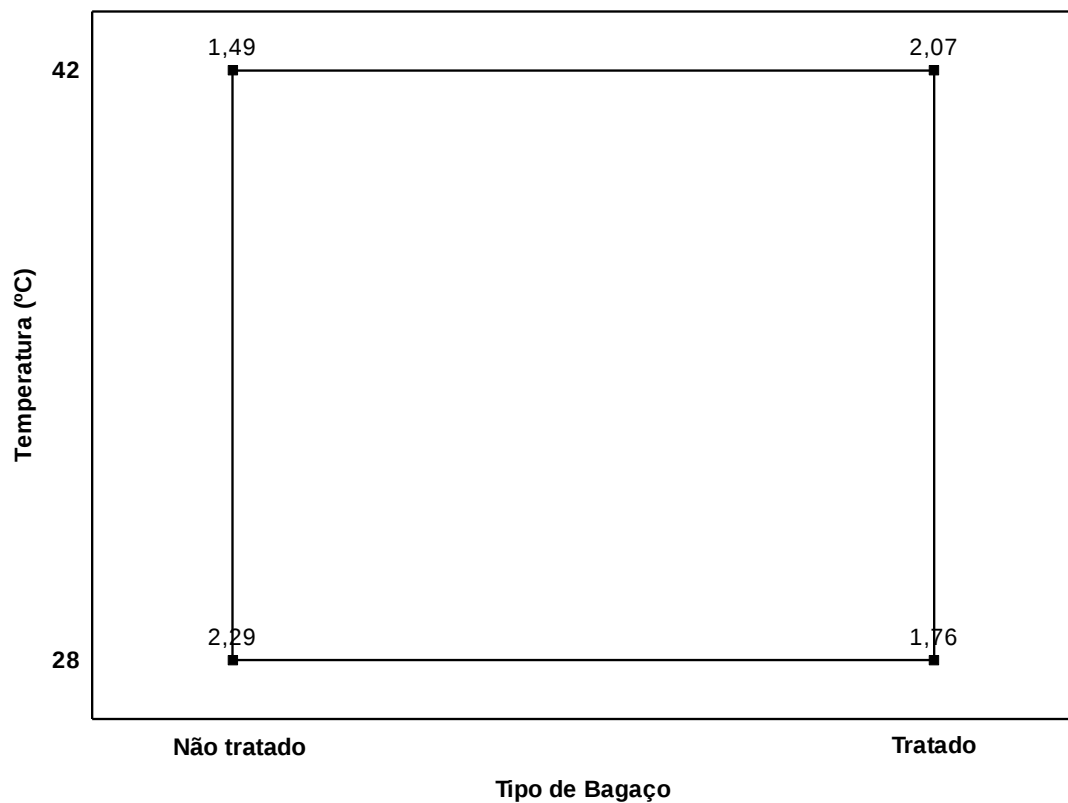


Figura 2. Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de planejamento 2^3 , tendo como variável resposta a produção de Celulase Total para análise do efeito do tipo de substrato em relação a temperatura.

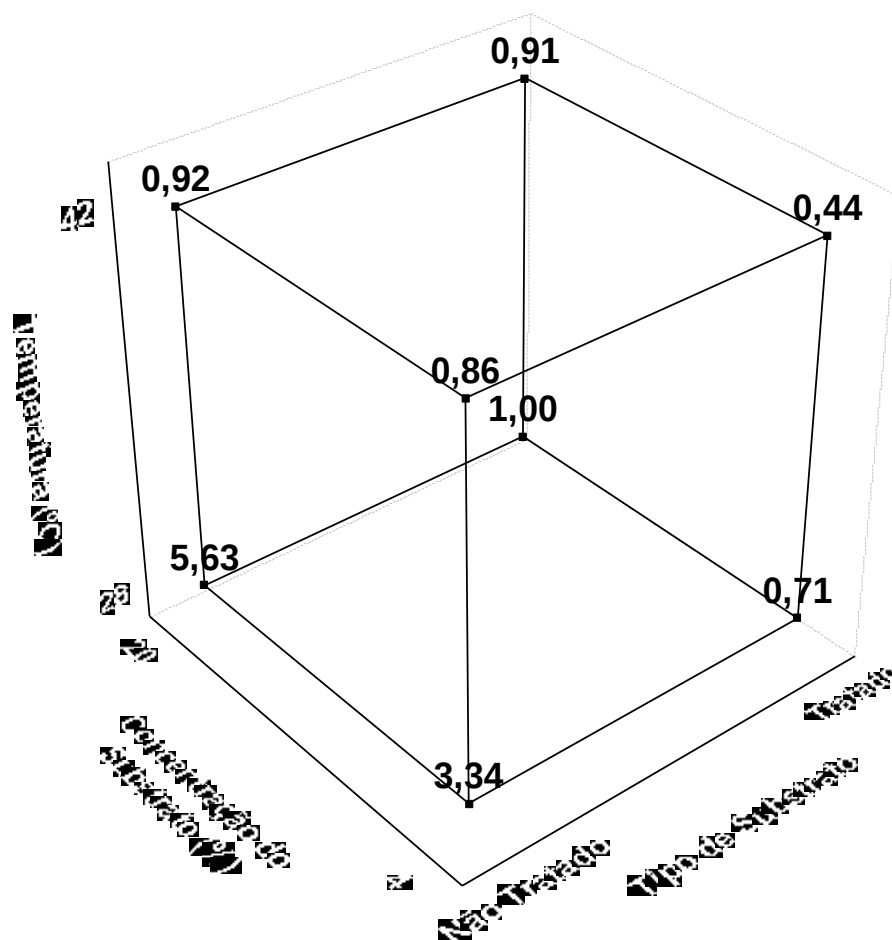


Figura 3. Gráfico cúbico do efeito das variáveis independentes (tipo de substrato, concentração do substrato e temperatura) na variável resposta produção de β -glucosidase.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Dos diferentes fungos avaliados, o *Fusarium moniliforme* URM2463 mostrou ser o maior produtor de celulasas apresentando um Ie de 5,42.
- A melhor condição para a produção das enzimas do complexo celulolítico em cultivo submerso foi obtido com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, na concentração de 20 % a temperatura de 28 °C. Nestas condições foi possível obter os níveis máximos de atividade de 2,37 U para a celulase total, de 2,15 U para a endoglucanase, de $7,12 \times 10^{-3}$ U para a exocelobiohidrolase e de 5,9 U para β -glucosidase.
- O *Fusarium moniliforme* URM2463 demonstrou ser uma potencial fonte para a produção de celulasas de interesse biotecnológico.

ANEXOS

ANEXO A

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

Acesso aos ítems:

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Título

Autores

Resumo

Termos para indexação

Introdução

Material e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusões

Agradecimentos

Referências

Citações

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

Tabelas

Figuras

NOTAS CIENTÍFICAS

NOVAS CULTIVARES

OUTRAS INFORMAÇÕES

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título ▲

- * Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- * Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- * Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- * Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- * Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- * As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores ▲

- * Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- * O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- * São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- * Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- * Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo ▲

- * O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- * Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- * Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.
- * O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.
- * Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- * O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação ▲

- * A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- * Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- * Não devem conter palavras que componham o título.
- * Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução ▲

- * A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- * Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- * Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- * O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos ▲

- * A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- * Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- * Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- * Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- * Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- * Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- * Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- * Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- * Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.
- * Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão ▲

- * A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
- * Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

- * As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- * Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.
- * Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- * Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- * As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- * Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- * As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões ▲

- * O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- * Não podem consistir no resumo dos resultados.
- * Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- * Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos ▲

- * A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- * Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências ▲

- * A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- * Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
- * Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- * Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- * Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- * Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- * Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- * Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, p.67-75, 2006

Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

Teses e dissertações

HAMADA, E. Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em:

'<http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações ▲

* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

* A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses

* Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

* Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

* Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

* Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

* Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

* Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

* Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas ▲

* Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

* No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas ▲

* As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.

* Devem ser auto-explicativas.

* Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

* Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

* O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

* No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

* Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

* Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.

* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

* Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.

* Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

* Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

* Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns} (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras ▲

- * São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- * Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- * O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- * Devem ser auto-explicativas.
- * A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- * Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- * Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- * O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- * As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- * Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- * Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- * As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- * Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- * Devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição em possíveis correções.
- * Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- * No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- * Não usar negrito nas figuras.
- * As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- * Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

NOTAS CIENTÍFICAS ▲

* Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

APRESENTAÇÃO DE NOTAS CIENTÍFICAS ▲

* A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos,

resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- * Resumo com 100 palavras, no máximo
- * Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- * deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

NOVAS CULTIVARES ▲

* Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

APRESENTAÇÃO DE NOVAS CULTIVARES

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- * Resumo com 100 palavras, no máximo
- * Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- * deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).
- * A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.
- * A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.
- * Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

OUTRAS INFORMAÇÕES ▲

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.
- Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica, Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB, Caixa Postal 040315, CEP 70770-901 Brasília, DF.

XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

16 a 19 de Maio de 2009 Águas de Lindóia – SP

**CELLULASE ACTIVITY OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM
LIGNOCELULOLITIC SUBSTRATE**

Ramos, E. H. S.¹; PORTO, A. L. F.²; DUARTE, H. S.²; CUNHA, M. G. C.¹

¹ Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Morfology and Animal Physiology, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Pernambuco, Brasil
ehsr8@hotmail.com

By use of extracellular enzymes such as cellulases, the fungi are the main decompositor of substances that make the structural role of the body being broken, such as cellulose and lignin. The hydrolysis of cellulose by cellulases results in the final production of glucose. The scientific community has shown strong interest in cellulases because of its applications in industry such as starch processing, production of food, alcoholic fermentation from grain and malt, extraction of juice from fruits and vegetables, in the industry of fruit pulp and paper and textile industry. Therefore this study aimed to evaluate the potential of cellulase production by fungi from the Cultures Collection “Micoteca” (URM) of Department of Mycology of the Universidade Federal de Pernambuco. They were used 8 fungi species. The cultures were maintained in PDA medium. The strains were grown in synthetic medium with cellulose (treated) as the only carbon source. The fungi were inoculated with needle in the center of Petri dishes. These were incubated for 4 days at 28 °C and then were subjected to thermal shock for 16 h at 50 °C. After that period, were added to 10 mL solution of red dye congo (2.5 g/L) in 0.1 M Tris HCl buffer, pH 8.0. After 30 minutes the solution was discarded and the cultures were washed with 5 mL of 0.5 M NaCl solution in the same buffer. The diameters of the colonies and halos produced were measured with pachymeter. An enzymatic index was established for the selection which was the ratio between the diameters of the halo and the colony, and through this it was noted that the index ranged between 3.00 for *Aspergillus niger* and 5.42 for *Fusarium moniliforme*, while the indicator halo of degradation was not observed in the fungus *Rhizopus arrhizus*. The *Fusarium moniliforme* presents itself as a promising fungus for production researches of cellulase in lignocelulolitic substrates, because it presented a high rate of degradation in relation to other species.

Supported by: Mestrado em Bioquímica e Fisiologia

Key words: fungi, cellulase, *Fusarium*

ATIVIDADE DA CELULASE DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SUBSTRATO LIGNO-CELULOLÍTICO

Ramos, E. H. S.¹; PORTO, A. L. F.²; DUARTE, H. S.²; CUNHA, M. G. C.¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

ehsr8@hotmail.com

Pelo uso de enzimas extracelulares como as celulases, os fungos são os principais decompositores das substâncias que fazem o papel estrutural do organismo a ser decomposto, como a lignina e a celulose. A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. A comunidade científica tem mostrado forte interesse pelas celulases por causa de suas aplicações na indústria tais como: processamento do amido, produção de ração, fermentação alcoólica a partir de grãos e malte, extração de suco de frutas e vegetais, na indústria de polpa de fruta e papel e na indústria têxtil. Assim este trabalho objetivou avaliar o potencial de produção de celulase por fungos oriundos da Micoteca – URM do Departamento de Micologia do CCB oriundo de bagaço de cana. Foram utilizados 8 espécies de fungos. As culturas foram mantidas em meio BDA, sendo as mesmas repicadas a cada 30 dias. As linhagens foram cultivadas em meio sintético com celulose (tratada) como única fonte de carbono. Os fungos foram inoculados com agulha no centro de placas de Petri. Estas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida foram submetidas a choque térmico por 16 h a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro. Para a seleção foi estabelecido um índice enzimático o qual é o resultado da divisão do diâmetro do halo pelo da colônia, e por meio deste observou-se que o índice variou entre 3,00 para *Aspergillus niger* e 5,42 para o *Fusarium moniliforme*, enquanto que o halo indicador de degradação não foi observado no fungo *Rhizopus arrhizus*. O fungo *Fusarium moniliforme* apresenta-se promissor à pesquisas de produção de celulase em substratos lignocelulolítico, já que apresentou um índice de degradação elevado em relação as outras espécies.

Supported by: Mestrado em Bioquímica e Fisiologia

Key words: fungi, cellulose, *Fusarium*

Cellulase production by *Fusarium moniliforme* URM2463

Eduardo Henrique da Silva Ramos¹, Helena Simões Duarte², Ana Lúcia Figueiredo Porto^{2,3}, Maria das Graças Carneiro da Cunha^{1,3}

¹Federal University of Pernambuco – Department of Biochemistry
50671-910, Pernambuco – PE - E-mail: ehsr8@hotmail.com

²Rural Federal University of Pernambuco – Department of Morphology and Animal Physiology
52171-900, Pernambuco – PE

³Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) – Laboratory of Biotechnology
50670-901, Pernambuco – PE

ABSTRACT

*The production of extracellular cellulases by a newly isolated fungus, *Fusarium moniliforme* URM2463, on the lignocellulosic materials was studied in solid-state fermentation (SSF). A 2³ full factorial design was used to study the effects and interactions of substrates types, substrate concentration and temperature on the endoglucanase production. The best culture condition for the production was found to be with not treated sugarcane bagasse substrate, 20 % substrate concentration, and temperature of 42 °C and showed an endoglucanase activity of 3.6 U/mL. The present study suggest that *Fusarium moniliforme* URM2463 strain it is able to produce cellulases using sugarcane bagasse and may be used for possible biotechnological applications.*

Keywords: endoglucanase, cellulase production, *Fusarium moniliforme*

INTRODUCTION

Cellulose is a linear polymer of anhydroglucose units linked together by β -1,4-glycosidic bonds and found as a major component of plant biomass.

Cellulases are enzymes able to hydrolyse cellulose and the hydrolysis of crystalline cellulose can be performed by a fungal cellulase system, where three main enzymes play a pivotal role. These are (a) cellobiohydrolases, which act as an exoglucanase releasing cellobiose as the main product, (b) endoglucanases, which act randomly along cellulose chains producing new sites for the cellobiohydrolases, and (c) β -glucosidase, which hydrolyses cellobiose, a potential inhibitor of cellobiohydrolases, releasing glucose. This co-operative system involves the so-called “synergism effect,” i.e. an enhancement of the activity over the added activities of the individual enzymes (Li et al., 2006).

Scientific community has strong interests in cellulases because of their applications in industries as follows: starch processing, animal food production, grain alcohol fermentation, malting and brewing, extraction of fruit and vegetable juices, pulp and paper industry, and textile industry (Kaur et al., 2007).

However, the major bottleneck of comprehensive application of cellulase in the industry it is the high cost of the enzyme production. Substantial cost reduction may be possible by exploring

ways of cellulose conversion using microorganisms that produce cellulolytic enzymes. It is therefore imperative to look for microorganisms that have a high rate of cellulase production (Kotchoni and Shonukan, 2002). Besides, it has been reported that solid-state fermentation (SSF) it is an attractive process to produce economically cellulose due to its lower capital investment and lower operating costs (Xia and Cen, 1999). Another approach to reduce the cost of cellulase production it is use of the cheap and easily available substrates. The lignocellulosic biomass, especially agricultural wastes, is known to be an excellent carbon source for cellulase production.

In view of the ability of microorganisms to hydrolyze hemicellulose thought to the possibility of obtaining cellulases using sugarcane bagasse as carbon source, since the sugar cane is grown on a large scale in several regions of Brazil, producing high quantities of sugar cane bagasse, which, despite its use as fuel in power generation, power plants in the sugar and alcohol, still generate huge surpluses, they could be used as substrate for the production of various enzymes.

The aim of this work was to determine the best condition for endoglucanase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 using an experimental design.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and medium growth

The *Fusarium moniliforme* URM2463 was obtained from the Culture Collection “Micoteca” of Mycology Department of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). The strain was maintained at 4 °C in Potato-Dextrose-Agar.

Fusarium moniliforme URM2463 was grown in basal medium, which contained: 0.75 % (w/v) peptone; 1.55 % (w/v) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.13 % (w/v) K_2HPO_4 ; 0.05 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mL of micronutrient solution*, supplemented with 4 or 20% (w/v) concentration of carbon source (sugarcane bagasse treated and or not treated). The pH was adjusted to 4.5. *The composition of the mineral solution, per 100 mL of distilled water, was: 10 mL HCl; 0.5 % (w/v) FeSO_4 ; 0.2 % (w/v) MnSO_4 ; 0.17 % (w/v) ZnCl_2 ; 0.2 % (w/v) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The fermentation medium was sterilized in autoclave at 121 °C, for 20 min.

Sugarcane bagasse

Sugarcane bagasse, without and with treatment, was used as carbon source.

Sugarcane bagasse without treatment was obtained as follows: The sugarcane bagasse was dried at 65 °C for 7 days. Afterwards, it was powdered until fine powder. This powder was exhaustively and continuously washed with tap water for 3 days, until washing-water be clear, being again dried at 65°C until constant weight.

Sugarcane bagasse with treatment was obtained according to Aguiar & Menezes (2000) as follows: In a 6L Erlenmeyer, 100 g of powdered bagasse previously washed and dried was added to 2L of 4 % (w/v) sodium hydroxide solution and autoclaved at 121 °C, for 30 min. Subsequently, the bagasse was recovery by filtration through cotton and washed with tap water until the neutrality and dried at 65 °C until constant weight.

Cellulolytic enzymes production

Fungi were grown at 28 °C on Potato Dextrose Agar (PDA) plates for a period of eight days until the surface of plates were completely covered by them. Afterwards, fungal mycelium disks with 1.0 cm diameter were removed from peripheral part of the colonies and added into 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL medium growth and incubated in an orbital shaker at 150 rpm at different temperatures of 28, 35 and 42 °C for six days. After 144h, they were collected, filtrated and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the clear cell-free culture supernatant thus obtained was used for cellulolytic activity assay.

Experimental design and statistical analysis for cellulase production by *F. Moniliforme* URM2463

A 2^3 full factorial design was used to study the effects of variables: substrate type (treated and not treated sugarcane bagasse), substrate concentration and temperature on the production of endoglucanase. A set of 8 experiments plus four replicates at the central point were performed. The range and levels of the variables are given in the Table 1. The results were statistically analyzed by variance analysis (ANOVA) at a significance level of $p \leq 0.05$. All statistical and graphical analyses were carried out with the “Statistica 8.0” software (StatSoft, Inc. 2008, USA).

Table 1 – Range and levels of independent variables.

Variables	Levels		
	Lower (-1)	Central (0)	Higher (+1)
Substrate type (sugarcane bagasse)	N	N/T	T
Substrate concentration (%)	4	12	20
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	28	35	42

N = not treated; T = treated; N/T = (50 % N + 50 % T).

Enzyme assay

Endoglucanase activity was determined according to Wood & Bhat (1988), by incubating enzyme preparation (500 μL) in the presence of 500 μL of substrate 2% (w/v) carboxymethyl cellulose in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8). The reaction was carried out at 48 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The amount of reducing sugar was determined by dinitrosalicylic acid (DNS) method. One unit (U) of activity was defined as the amount of endoglucanase that releases one μmol of reducing sugar per minute under standard assay condition. All experiments were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained with the 2^3 full factorial design are shown in Table 2. Analyzing the results, it was verified that the run condition number 7 showed the higher value (3.6 U/ml) of endoglucanase activity, with substrate not treated, 20 % substrate concentration, and temperature of 42 $^{\circ}\text{C}$.

Table 2 – Conditions and results of 2^3 full factorial design for endoglucanase and β -glucosidase production by *P. aurantiogriseum* URM2463.

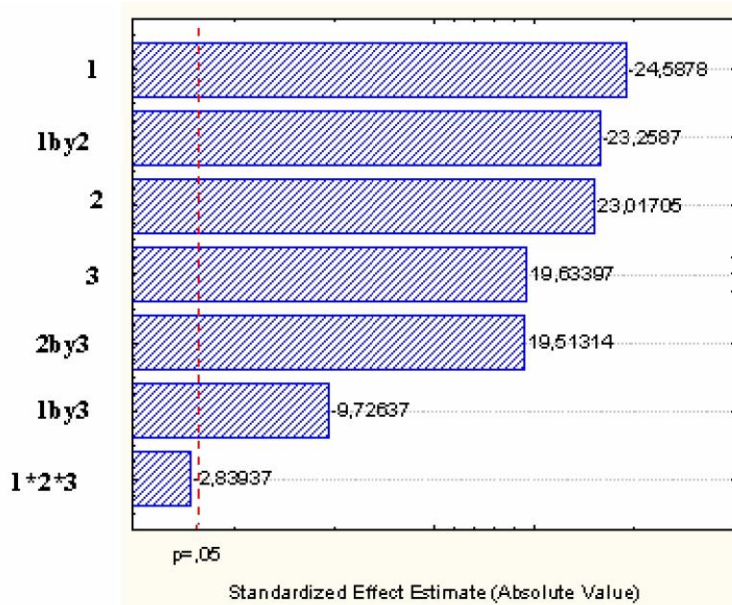
Run	ST	SC	T	EA
1	N	4	28	0.48
2	T	4	28	0.70
3	N	20	28	1.46
4	T	20	28	0.00
5	N	4	42	0.76
6	T	4	42	0.42
7	N	20	42	3.60
8	T	20	42	1.10
9c	N/T	12	35	1.92
10c	N/T	12	35	1.92
11c	N/T	12	35	1.80

12c N/T 12 35 1.85

ST, Substrate type (N = not treated sugarcane bagasse; T = treated sugarcane bagasse; N/T = (50% N + 50%T); SC, Substrate concentration (%); T, Temperature (°C); EA, Endoglucanase activity (U/mL); c, Central point.

The Pareto bar charts exhibit the effects estimate of the variables and their interactions, on the cellulolytic activity in decreasing order of magnitude. The vertical line can be used to judge which effects are statistically significant. Bars extending beyond this line correspond to the effects statistically significant at a confidence level of 95%. It can be seen from Figure 1 that all variables had significant effects.

Figure 1. Pareto bar chart for the effects of variables substrate type (1), substrate concentration (2), Temperature (3) on endoglucanase activity.



The variables substrate concentration (2) and temperature (3) had a significant positive effect, meaning that the increase these parameters, increase the endoglucanase production. However, the variable substrate type (1) has a significant negative effect, meaning that with treated sugarcane bagasse lead to a reduction of enzyme production. The interaction between the variables substrate type (1) and substrate concentration (2) as well as substrate type (1) and temperature (3) showed a significant negative effect, indicating that their individual or simultaneous decrease endoglucanase production. The interaction (2 by 3) between the variables substrate concentration (2) and temperature (3) had a significant positive effect, suggesting that an increase in these parameter values would improve endoglucanase production.

In the present study the best culture condition for the production (run 7) was found to be with not treated sugarcane bagasse substrate, 20 % substrate concentration, and temperature of 42 °C and showed an endoglucanase activity of 3.6 U/mL. This result was higher than 0.31 U/mL for the endoglucanase produced by *A. niger* MS82 using sugarcane bagasse not treated, with 6 days of incubation time, 180 rpm at 40 °C (Sohail et al. 2009).

Aguiar and Menezes (2000) reported that the endoglucanase production by *Aspergillus Niger* IZ-9 was not affected by substrate type (treated and not treated bagasse). In our study and with the *Fusarium moniliforme* URM2463, the sugarcane bagasse without treatment showed to be more efficient for the production of enzyme.

CONCLUSION

The present study suggest that *Fusarium moniliforme* URM2463 strain is capable of producing cellulases using sugarcane bagasse and could provide possible biotechnological applications.

REFERENCES

- Aguiar, C. L.; Menezes, T. J. B. (2000), Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-se-açúcar. B. CEPPA, Curitiba, v. 18, p. 57-70.
- Kaur, J.; Chadha, B. S.; Kumar, B. A.; Saini, H. S. (2007), Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp.MTCC 3922. Bioresource Technology, v. 98, p. 74-81.
- Kotchoni, S. O.; Shonukan, O. O. (2002), Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Bacillus pumilus*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 18, p. 487-491.
- Li, Y. H., Ding, M., Wang, J., Xu, G. J., Zhao, F. (2006), A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 70, p. 430-436.
- Sohail, M.; Siddiqi, R.; Ahmad, A.; Khan S. A. (2009), Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. New Biotechnology, *in press*, doi:10.1016/j.nbt.2009.02.002.
- Xia, L., Cen, P. L. (1999), Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. Process Biochemistry, v. 34, p. 909-912.
- Wood, T. M. and Bhat, K. M. (1988), Methods for measuring cellulase activities. In: Wood, W. A. and Kellog, S. T. (ed.). *Methods in enzymology*, San Diego: Academic Press, 160, ch 9.