

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÍVEL MESTRADO**

MARILIA RIBEIRO SALES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO
E DA XILANASE POR *Aspergillus* spp. DA COLEÇÃO DE
CULTURAS – MICOTECA URM, UFPE, UTILIZANDO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

**RECIFE
2010**

MARILIA RIBEIRO SALES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO E DA
XILANASE POR *Aspergillus* spp. DA COLEÇÃO DE CULTURAS –
MICOTECA URM, UFPE, UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Recife, 2010

Sales, Marília Ribeiro

Produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus* spp. da coleção de culturas – Micoteca URM, UFPE, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato / Marília Ribeiro Sales. – Recife: O Autor, 2010.

90 folhas : ll., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Enzimas – Aplicações industriais 2. Enzimas de fungos 3. Biotecnologia – Indústria I. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

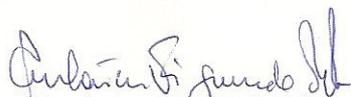
UFPE/ CCB – 2010- 077

MARILIA RIBEIRO SALES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO E DA
XILANASE POR *Aspergillus* spp. DA COLEÇÃO DE CULTURAS URM-UFPE
UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração - Biotecnologia.

Aprovado por



Prof.ª. Dra.ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE



Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica – UFPE



Prof.ª. Dr.ª. Cristina Maria de Souza Motta
Departamento de Micologia - UFPE

Em 24 de fevereiro de 2010

Aos meus queridos pais, Rubens e Marluce Sales

AGRADECIMENTOS

A Deus-Parens, pela concessão diária de suas providências, só com sua proteção diária foi possível a conclusão desta dissertação de mestrado. À Oyassama, eternamente viva, pelo calor maternal. Aos meus pais, Rubens e Marluce, pela dedicação incondicional desde a descoberta da minha vinda ao mundo e pelo apoio durante os anos de estudo. Aos meus irmãos, Rubens Jr., Márcia, Mônica, Mércia e Angélica. Ao meu namorado e amigo, Pabyton Cadena por existir em minha vida, também aos seus pais Severino e Luciene e a seu irmão Thiago. Aos meus cunhados Sandro, Arthur, Hélivio e Gabriel. Aos meus antepassados, pela sua semente plantada.

À minha estimada orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela supervisão, apoio e atenção no desenvolver das atividades desde a iniciação científica. Aos professores que ministraram disciplinas no mestrado que contribuíram tanto para minha formação. À Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Pimentel pela amizade e orientação no estágio de docência. À Prof^ª. Dr^ª. Maria da Paz Carvalho pela disponibilidade e atenção. Aos Professores que compõem a banca de avaliação pelas contribuições neste trabalho.

Aqueles que compõem a Universidade Federal de Pernambuco, principalmente do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas em especial à Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Correia e a secretária Adenilda Lima pelos aprendizados pessoais e profissionais. Aos que compõem o Laboratório de Tecnologia de Bioativos e o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em especial a Flávio, Germana, Rosemary, Milena e Dr^ª. Tatiana Porto.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES, imprescindíveis para o desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, a todos que estão e estiveram presentes no transcurso de minha vida, incluindo os sorrisos anônimos, a todos que, de uma forma ou outra, me fortalecem para cada dia que ainda está a acontecer.

Os meus sinceros agradecimentos, muito obrigada!

*Se transporem ladeiras e montanhas, e sarças
espinhosas, e trilhas em precipícios, e espadas...
Verão ainda no meio de chamas e abismos profundos.
Se os ultrapassarem, terão um caminho estreito.
Se passarem pelo caminho estreito passo a passo,
terão um amplo, que é certamente o real.*

Escritura Divina, I:47-49

ÍNDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1	13
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
Celuloses e hemiceluloses: componentes da parede celular vegetal	16
Complexo celulolítico	20
Xilanases	22
Aplicações das enzimas do complexo celulolítico e da xilanase	22
Bagaço de cana-de-açúcar	23
<i>Aspergillus</i> Link	25
OBJETIVOS	28
Objetivo Geral	28
Objetivos Específicos	28
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2: Produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por <i>Aspergillus</i> spp. utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato	32
CAPÍTULO 3: Seleção de variáveis que influenciam a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por <i>Aspergillus aculeatus</i> URM 4953 e <i>A. phoenicis</i> URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato	51
CONCLUSÃO	72
ANEXOS.....	74
Anexo 1: Trabalhos apresentados e publicados em congresso e eventos.....	75
Anexo 2: Instruções para autores (Pesquisa Agropecuária Brasileira)	76
Anexo 2: Instruções para autores (Applied Biochemistry and Biotechnology) ...	88

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Composição da parede celular vegetal. Fonte: Sánchez (2009)..... 16
- Figura 2. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose, produzindo celobiose. Fonte: Solomons (1996)..... 17
- Figura 3. Representação da fibrila elementar de celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose. Fonte: Timar-Balazsy *et al.* (1998)..... 17
- Figura 4. Representação de regiões cristalina e amorfa de celulose. Fonte: Said e Pietro (2004)..... 18
- Figura 5. Alguns dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. 1: D-glicose. 2: D-galactose. 3: L-arabinose. 4: D-xilose. 5: D-manose. 6: 4- θ -metil-glucurônico. Fonte: Sjostrom (1992)..... 18
- Figura 6. Apresentação esquemática da xilana. Fonte: De Vries e Visser (2001)..... 19
- Figura 7. Ação das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da celulose. Fonte: Said e Pietro (2004)..... 21
- Figura 8. O histórico do processamento de cana-de-açúcar (●) e geração de bagaço residual no Brasil (○) em milhões de toneladas, *estimativa da produção. Fonte: UNICA (2009)..... 24
- Figura 9. Conidióforos característicos de espécies de *Aspergillus*: (a) uniseriado de *A. equitus*; (b) biseriado de *A. ochraceus*. Fonte: Klich e Pitt (1988) 26
- Figura 10. Foto de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de reprodução assexuada de *Aspergillus niger*. Fonte: Read (1991)..... 27

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Projeção plana multivariada das variáveis para a atividade relativa (%) de celulasas totais (L), exoglucanase (E), endoglucanase (N), celobiase (B) e xilanase (X). *Loadings* dos primeiro e segundo componentes principais. O plano formado por estes componentes reproduzem 69,18% da informação original..... 69
- Figura 2. Projeção plana multivariada dos ensaios para a atividade relativa de celulasas totais, exoglucanase, endoglucanase, celobiase e xilanase. *Scores* dos ensaios no plano formado pelos dois principais componentes..... 70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Atividade específica de enzimas do complexo celulolítico e de xilanase produzidas por linhagens de *Aspergillus* crescidas em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono46

Tabela 2 – Produção enzimática de linhagens crescidas em diferentes fontes de carbono para produzir enzimas do complexo celulolítico e xilanase47

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Matriz estatística do planejamento fatorial dos níveis das variáveis experimentais para produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 66

Tabela 2 – Distribuição dos níveis das variáveis experimentais para produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase com as respostas da atividade relativa das enzimas após cultivo de *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar cru (BCC) e residual (BCR) como substrato..... 67

Tabela 3 – Efeitos das variáveis na produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase..... 68

LISTA DE ABREVIÇÕES

%	Por cento
(C)	Ponto central
<	Menor que
B	Celobiase
BCC	Bagaço de cana-de-açúcar cru
BCR	Bagaço de cana-de-açúcar residual
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
E	Exoglucanase
g	Grama
<i>g</i>	Gravidade
g/L	Grama por litro
ITI	Iniciação tecnológica industrial
L	Celulases totais
LABTECBIO	Laboratório de Tecnologia de Bioativos - UFRPE
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Endoglucanase
n.	Número
°C	Graus Celsius
p	probabilidade
p/v	Peso por volume
PC1	Primeiro componente principal
PC2	Segundo componente principal
PCA	Análise dos componentes principais
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAB	<i>Raw sugarcane bagasse</i> - Bagaço de cana-de-açúcar cru
REB	<i>Residual sugarcane bagasse</i> - Bagaço de cana-de-açúcar residual
rpm	Rotações por minuto
S/A	Sociedade Anônima
U/mg	Unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína
U/mL	Unidade de atividade enzimática por mililitro de extrato enzimático
UI/mg	Unidade internacional de atividade enzimática por miligrama de proteína
UI/mL	Unidade internacional de atividade enzimática por mililitro de extrato enzimático
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
URM	University Recife Mycology
X	Xilanase

RESUMO

O bagaço da cana-de-açúcar é um subproduto da indústria sucroalcooleira que é constituído, entre outros açúcares, de celulose, um carboidrato cuja unidade monomérica é a glicose e de hemicelulose, que possui como principal constituinte a xilana cuja unidade monomérica é a xilose. Estes polissacarídeos possuem aplicabilidade na indústria biotecnológica, podendo ser utilizados como substrato para produção de enzimas do complexo celulolítico e a xilanase, enzimas essas que possuem ampla aplicabilidade na indústria biotecnológica, como em processos na indústria têxtil, na extração de componentes do chá verde e de proteínas da soja. A seleção de um fungo filamentososo capaz de produzir quantidade significativa de enzimas do complexo celulolítico da xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar tornará o uso deste substrato viável para produção das citadas enzimas. O objetivo deste trabalho foi selecionar uma espécie de *Aspergillus* procedente da Coleção de Culturas – Micoteca URM, UFPE, para produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar e selecionar variáveis que influenciam a produção enzimática. Nove linhagens de *Aspergillus* foram cultivadas em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar residual (BCR) e cru (BCC) como fonte de carbono. Após o período de cultivo de cinco dias (30°C, 90 rpm) o extrato enzimático foi obtido através da centrifugação (5000.g) da cultura. A produção do complexo celulolítico foi avaliada através da atividade de celulasas totais, endoglucanase, exoglucanase e celobiase, como também da xilanase. Após a seleção das linhagens foi realizada a seleção de variáveis que influenciam na produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanase através de planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} . As linhagens que produziram enzimas do complexo celulolítico e xilanase nos maiores níveis utilizando bagaço de cana-de-açúcar foram *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 e essas linhagens foram escolhidas para estudo da seleção de variáveis que influenciam a produção das enzimas que degradam celulose e hemicelulose. Todas as oito variáveis (pH, concentração do substrato e inóculo, linhagem de *Aspergillus*, tipo de bagaço de cana-de-açúcar, tempo de cultivo, agitação e temperatura) apresentaram efeito estatisticamente significativo para a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanase. Os níveis em que foram produzidas todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase simultaneamente foram:

pH 6,0, 168 horas de tempo de cultivo, BCR como substrato para produção das enzimas por *A. aculeatus* URM 4953. As variáveis que foram determinadas como as que mais influenciam a produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanase por *Aspergillus* foram: pH, tempo de cultivo, tipo de bagaço de cana-de-açúcar e linhagem de *Aspergillus*. A linhagem *A. aculeatus* URM 4953 demonstrou ser uma alternativa para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar, um substrato de baixo custo que propiciou o crescimento fúngico e a produção enzimática.

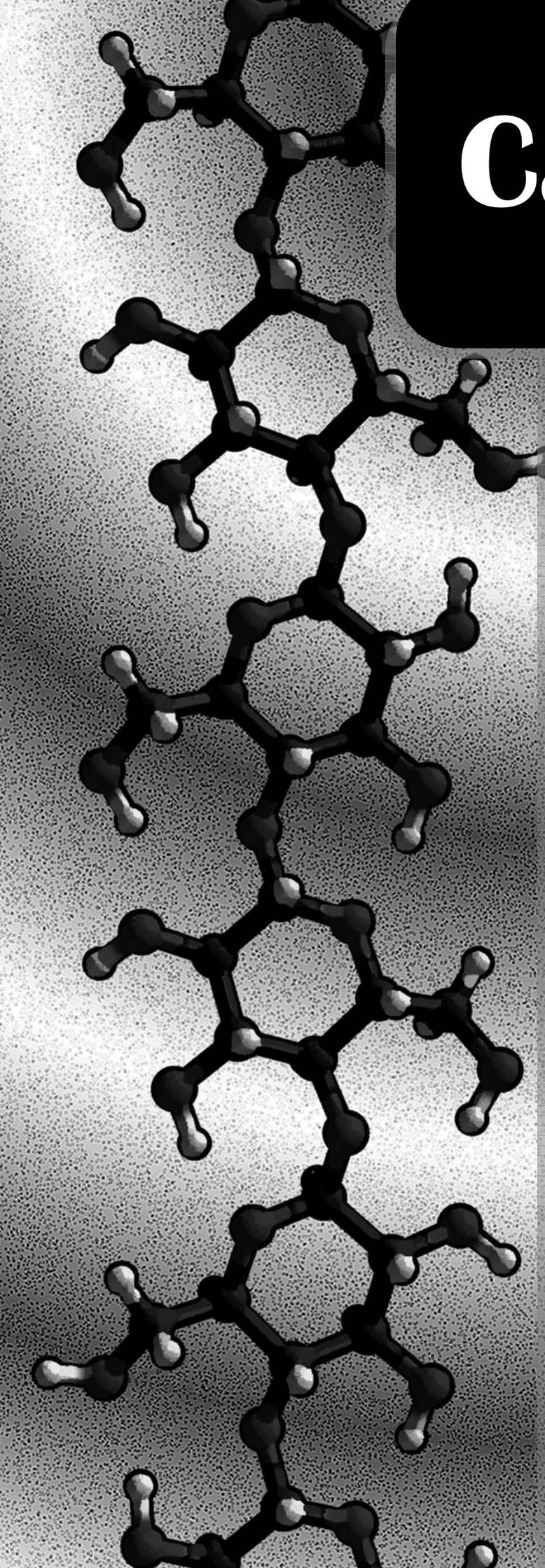
Palavras-chave: *Aspergillus*, complexo celulolítico, xilanase, bagaço de cana-de-açúcar, planejamento fatorial.

ABSTRACT

The sugarcane bagasse is a byproduct of the sugarcane industry which consists, among other sugars, cellulose, a carbohydrate whose monomer unit is glucose and hemicellulose, which has as its main constituent xylan whose monomer unit is xylose. These polysaccharides have potential applications in the biotechnology industry and may be used as a substrate for production of cellulolytic complex and xylanase. These enzymes have large applicability in the biotechnology industry, as in processes in the textile industry, components of green tea and soy proteins extraction. The selection of a filamentous fungus capable of produce significant amounts of cellulolytic complex enzymes and xylanase using sugarcane bagasse will make the use of this substrate viable for enzyme production. The objective of this work was to select a specie of *Aspergillus* from the Coleção de Culturas – Micoteca URM, UFPE, to produce cellulolytic complex enzymes and xylanase using sugarcane bagasse as substrate and to select variables that influence the enzyme production. Nine strains of *Aspergillus* were grown in medium containing residual (REB) and raw sugarcane bagasse (RAB) as a carbon source. After the growing period of five days (30°C, 90 rpm) the enzymatic extract was obtained by culture centrifugation (5000.g). The production of cellulolytic complex enzymes was assayed by total cellulase, endoglucanase, exoglucanase and cellobiase activities, xylanase activity was determinate also. After the strains selection was performed variables selection that influence the production of cellulolytic complex and xylanase by fractional factorial design 2^{8-4} . The strains that produced cellulolytic complex enzymes and xylanase at the highest levels using sugarcane bagasse were *A. phoenicis* URM 4924 and *A. aculeatus* URM 4953 and these strains were selected to the study of variable selection that influence the production of enzymes that degrade cellulose and hemicellulose. All eight variables (initial pH, cultivation time, substrate concentration, agitation, inoculum concentration, temperature, sugarcane bagasse type and *Aspergillus* strain) were statistically significant in the production of enzymes. The best conditions for enzyme production were pH 6.0, cultivation time of 168 hours, using REB as substrate for enzymes production by *A. aculeatus* URM 4953. The variables that were determined as influences to the production of cellulolytic complex and xylanase by *Aspergillus* were pH, cultivation time, sugarcane bagasse type and strain of *Aspergillus*. The strain *A. aculeatus* URM 4953 demonstrate to be an alternative for the

production of all cellulolytic complex enzymes and xylanase using sugarcane bagasse, a low cost substrate that provided fungal growth and enzyme production.

Keywords: *Aspergillus*, cellulolytic complex, xylanase, sugarcane bagasse, factorial design

A vertical ball-and-stick model of a polymer chain, likely polyethylene, running down the left side of the page. The atoms are represented by black spheres (carbon) and white spheres (hydrogen), connected by black rods. The chain is shown in a zig-zag conformation.

Capítulo 1

Introdução

Revisão de literatura

Objetivos

INTRODUÇÃO

A celulose estruturalmente é um polímero linear de glicose ligado por ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$. Este carboidrato é dentre os materiais naturais o biopolímero mais abundante da natureza (ZHANG *et al.*, 2006). Esse homopolissacarídeo está imerso em uma matriz de hemicelulose e lignina, e juntos formam os principais componentes da parede celular das plantas (DE-PAULA *et al.*, 1999). Muitos microrganismos celulolíticos produzem um complexo multienzimático denominado complexo celulolítico ou celulosoma, capaz de hidrolisar a celulose (ARAI *et al.*, 2006).

Já a hemicelulose é um heteropolissacarídeo com peso molecular menor que o da celulose. É formada por pentoses, hexoses e ácidos urônicos. As subunidades são unidas por ligações glicosídicas dos tipos $\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow3)$ (SÁNCHEZ, 2009). A xilana é o composto mais abundante da hemicelulose e que contém um esqueleto constituído de resíduos de D-xilanopirranose ligados por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, que dependendo da origem, pode conter ramificações que possui primariamente acetil, arabinosil e resíduos gliconosil (HECK *et al.*, 2002; DUMITRIU, 2005). A completa hidrólise da xilana requer a ação de muitas enzimas hidrolíticas com diferentes especificidades e mecanismos de hidrólise. Dentre essas enzimas as xilanases ou endoxilanases são as principais envolvidas na hidrólise da xilana (BOCCHINI *et al.*, 2005).

Diversas são as aplicações do complexo celulolítico e da xilanase, destacando-se as celulases que são usadas em vários processos na indústria têxtil, na extração de componentes do chá verde, proteínas da soja, óleos essenciais, na indústria de sucos industrializados e ainda no processo de produção de vinagre e do ágar (SAID e PIETRO, 2004). Ainda, essas enzimas possuem potencial aplicabilidade na indústria sucroalcooleira mundial, principalmente do Brasil, que possui a tecnologia de formação do álcool combustível (SCHARLEMANN e LAURANCE, 2008).

No Brasil, quase todo etanol combustível é produzido por fermentação da glicose da cana-de-açúcar (UNICA, 2010), que gera o bagaço como subproduto. Esse resíduo é constituído basicamente por celulose e hemicelulose e pode ser convertido em glicose e xilose livres, entre outros açúcares, fazendo-se uso de ácidos ou enzimas, como as celulases e xilanases. As enzimas celulolíticas podem ser produzidas por microrganismos, como os fungos filamentosos, que decompõem as substâncias

celulósicas, após a colonização dos resíduos, como folhas, colmos e raízes, liberando a glicose livre. Posteriormente, esse açúcar pode ser fermentado por leveduras a etanol, o chamado etanol de segunda geração (MARTINS *et al.*, 2008).

O etanol de segunda geração, produzido a partir da celulose, presente nos resíduos da cana-de-açúcar e em outras matérias-primas vegetais, é uma alternativa fundamental aos cerca de cem países capazes de produzir o combustível renovável e que desejam fazê-lo sem prejudicar a produção de alimentos (ROMERO, 2008).

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por via microbiana se dá pelo uso de enzimas hidrolíticas. Dentre as enzimas que as espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* podem produzir estão as do complexo celulolítico e a xilanase, os quais produzem níveis significativos dessas moléculas de interesse para aplicação na indústria biotecnológica (SCHUSTER *et al.*, 2002; LUBERTOZZI e KEASLING, 2009; SÁNCHEZ, 2009).

REVISÃO DE LITERATURA

Os complexos celulolíticos e as xilanases agem em substratos celulósicos e hemicelulósicos. Assim, como uma forma de obter uma melhor compreensão sobre o mecanismo de ação dessas enzimas é necessário conhecer a origem e composição química desses substratos. Esta revisão bibliográfica pretende apresentar as características da celulose e hemicelulose. Posteriormente, será descrito o modo de ação de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase para obtenção do produto da hidrólise, como também a aplicação industrial dessas enzimas e o uso de substratos de baixo custo para a produção industrial das enzimas supracitadas.

Celuloses e hemiceluloses: Componentes da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é composta primariamente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), esta última é ligada à celulose e à hemicelulose, formando uma selagem física. É uma barreira protetora na parede celular vegetal e provê um suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo (SÁNCHEZ, 2009).

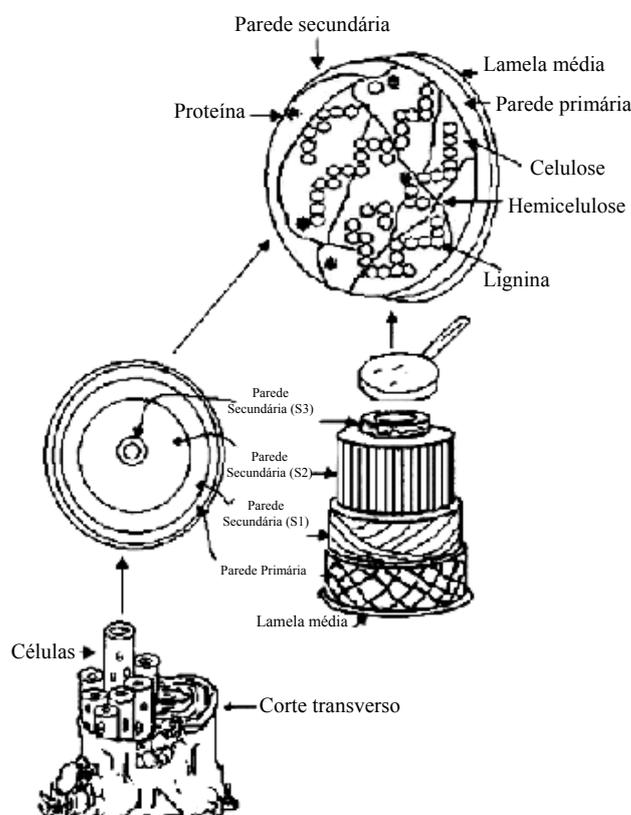


Figura 1. Composição da parede celular vegetal. Fonte: Sánchez (2009).

A celulose é produto primário da fotossíntese, componente majoritário da parede celular dos vegetais e a mais abundante fonte de energia renovável produzida na biosfera (cerca de 100 bilhões de toneladas/ano em matéria seca) (ZHANG *et al.*, 2006). É um polímero linear composto por subunidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ formando o dímero celobiose (Figura 2), os dímeros se unem formando longas cadeias de celulose ou fibrilas elementares (Figura 3). Essas são ligadas usualmente entre si através de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals. A presença ou ausência dessas interações determina regiões cristalinas ou amorfas na celulose. Predominantemente o polímero é encontrado na forma cristalina e há uma quantidade não organizada de cadeias de celulose que forma a região amorfa. Nesta última conformação a celulose é mais suscetível à degradação enzimática (Figura 4) (SÁNCHEZ, 2009).

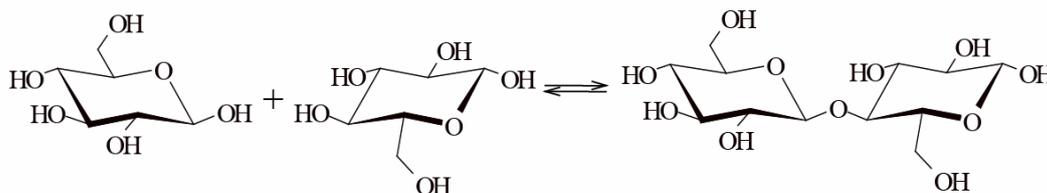


Figura 2. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose, produzindo celobiose. Fonte: Solomons (1996).

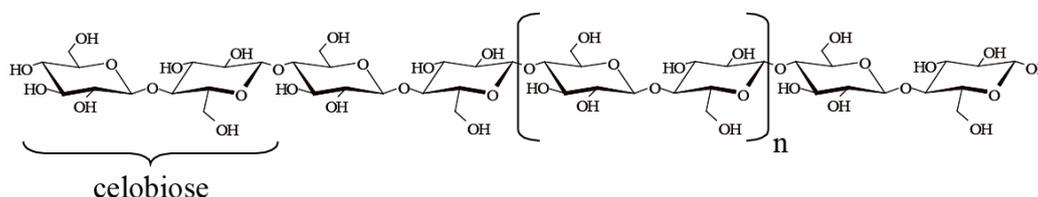


Figura 3 – Representação da fibrila elementar de celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose. Fonte: Timar-Balazsy *et al.* (1998).

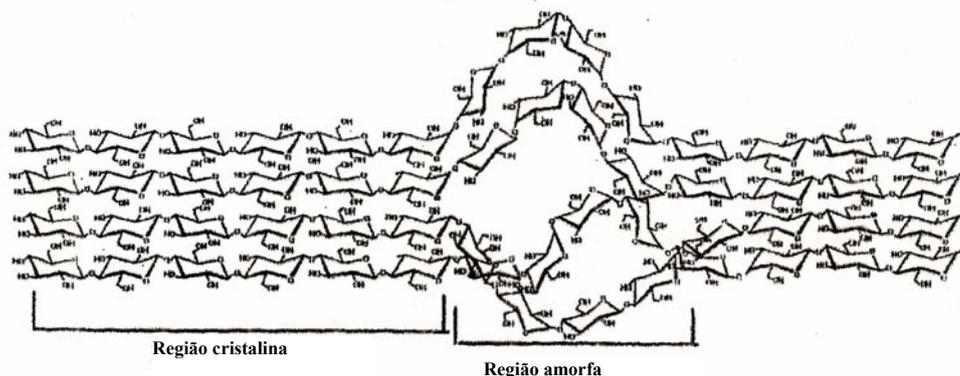


Figura 4 – Representação de regiões cristalina e amorfa de celulose. Fonte: Said e Pietro (2004).

A celulose na natureza é encontrada associada com outros componentes da parede celular dos vegetais e esta associação pode afetar a biodegradação do polímero. A celulose está ligada à lignina e à hemicelulose, entre outros compostos. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo com peso molecular menor que o da celulose. São exemplos de componentes da hemicelulose: (L-arabinose e D-xilose), hexoses (D-manose, D-galactose e D-glicose) e ácidos urônicos (4- θ -metil-glucurônico e D-galacturônico) (Figura 5) (SÁNCHEZ, 2009).

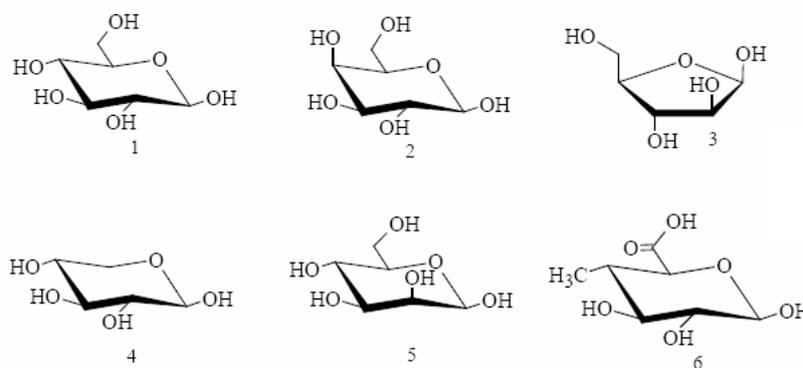


Figura 5 – Alguns dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. 1: D-glicose. 2: D-galactose. 3: L-arabinose. 4: D-xilose. 5: D-manose. 6: 4- θ -metil-glucurônico. Fonte: Sjostrom (1992).

Nas hemiceluloses, os açúcares estão ligados por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e em alguns casos por $\beta(1\rightarrow3)$. A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose é que a hemicelulose contém ramificações de curtas cadeias laterais que contém diversos tipos de carboidratos. As ramificações e cadeias laterais da hemicelulose promovem uma interação com a cadeia de celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (SÁNCHEZ, 2009).

A hemicelulose é o segundo componente vegetal mais disponível na natureza. É um polímero de armazenagem em sementes e também um componente estrutural da parede celular de vegetais. Os monômeros de hemiceluloses são úteis para a produção de diferentes antibióticos, alcoóis, ração animal, reagentes químicos e combustíveis. A xilana (Figura 6) é o composto mais abundante da hemicelulose e contém um esqueleto composto de resíduos de D-xilanopiranosose ligados por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, que, dependendo da origem, pode possuir ramificações contendo primariamente acetil, arabinosil e resíduos gliconosil (HECK *et al.*, 2002; DUMITRIU, 2005).

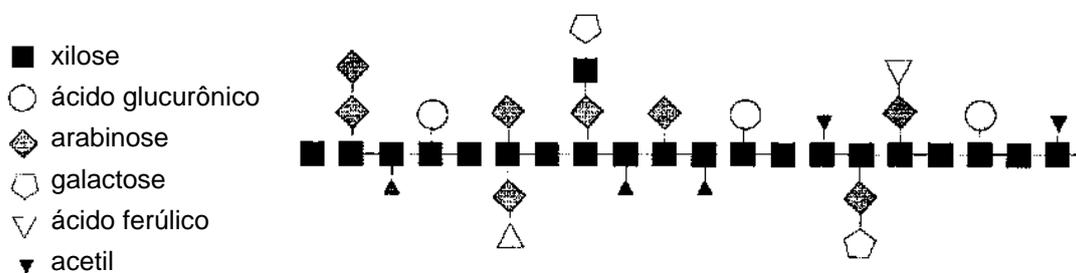


Figura 6. Apresentação esquemática da xilana. Fonte: De Vries e Visser (2001).

Há um grande interesse na hidrólise da xilana, como também da celulose para possível aplicação na indústria química, de combustíveis e de ração animal, como também manufatura de papéis. Uma das vias em que esses polímeros podem ser hidrolisados é pela via enzimática através de enzimas xilanolíticas e do complexo celulolítico (HECK *et al.*, 2002; SAID e PIETRO, 2004).

Complexo Celulolítico

Muitos microrganismos celulolíticos produzem um complexo multienzimático denominado complexo celulolítico ou celulosoma, capaz de hidrolisar a celulose. Ainda que todas as β -glucanases do complexo hidrolisem a mesma ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ da celulose, o modo de ação dessas enzimas é diferente, pois podem atacar internamente a molécula de celulose (endoglucanase, E.C.3.2.1.4), degradando-a a partir de uma das terminações redutoras ou não (exoglucanase, E.C.3.2.1.91) ou agir em oligossacarídeos curtos e dissacarídeos liberados pela ação das outras enzimas do complexo (β -glicosidasas) (ARAI *et al.*, 2006).

Uma dessas β -glicosidasas é a celobiase (E.C.3.2.1.21) que, apesar de não ser considerada uma celulase legítima, possui um importante papel na hidrólise da celulose uma vez que, após a ação de exo e endoglucanases, a celobiose (glicosil $\beta 1\rightarrow4$ glicose) é liberada como principal produto e a celobiase completa o processo de hidrólise da celulose através da hidrólise da celobiose em glicose livre (MARTINS *et al.*, 2008).

Celulases de origem fúngica são produzidas em grandes quantidades, que incluem os componentes do complexo multienzimático com diferentes especificidades e modos de ação, como as endoglucanases, exoglucanases (ou celobiohidrolases) e β -glicosidasas, agindo em sinergismo para a completa hidrólise da celulose. A produção dessas enzimas tem sido estudada em muitas espécies de fungos filamentos, particularmente as espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MAWADZA *et al.*, 2000; CHELLAPANDI e JANI, 2008).

As enzimas do complexo celulolítico agem da seguinte maneira, de acordo com o modelo de sinergismo endo-exoglucanases: as celobiohidrolases, ou exoglucanases, agem no fim das cadeias sejam essas redutoras ou não, agindo assim como exo-enzimas e liberam celobiose como produto principal; as endoglucanases agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as exoglucanases; as β -glicosidasas completam o processo de hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos à glicose (Figura 7) (MARTINS *et al.*, 2008).

A celulose contém regiões amorfas que são conhecidas por serem regiões de fácil acesso com pouca quantidade de relações laterais, *e. g.* pontes de hidrogênio, entre cadeias de celulose, bem como, os domínios cristalinos são conhecidos como muito mais difícil de hidrolisar (BOMMARIUS *et al.*, 2008).

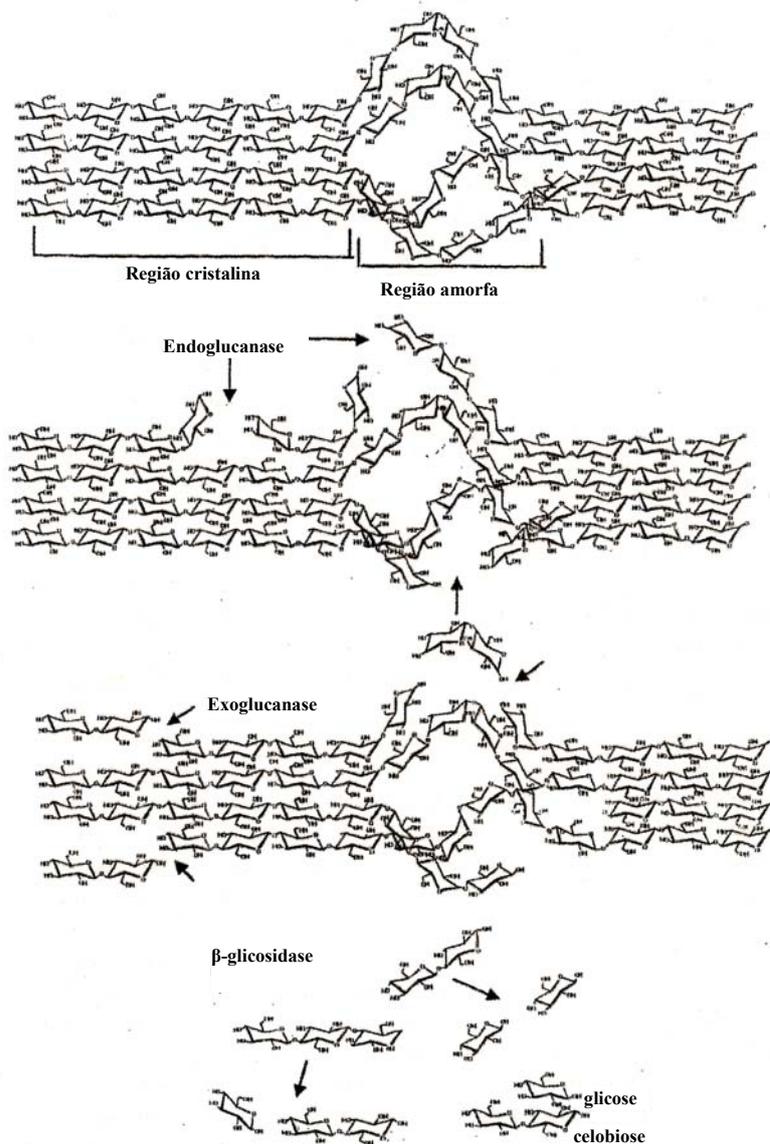


Figura 7. Ação das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas na degradação da celulose. Fonte: Said e Pietro (2004).

O sistema de celulases totais hidrolisa sinergicamente a celulose microcristalina e consiste de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas, (ZHANG *et al.*, 2006). As celulases totais também são conhecidas ‘enzimas do papel de filtro’ (FPase – *Filter Paper Enzyme*). A União Internacional de Química Pura e Aplicada

(IUPAC) recomenda que seja utilizado como substrato Papel de Filtro Whatmann® n. 1 para a determinação de FPase (GHOSE, 1987).

Para endoglucanases a IUPAC recomenda o uso de carboximetilcelulose de viscosidade média, uma forma derivada de celulose que é solúvel e o uso de celobiose para a determinação da celobiase (GHOSE, 1987). Usualmente a celulose microcristalina ou Avicel® é utilizada como substrato para exoglucanases por ser um polímero que predominantemente possui uma maior quantidade de regiões cristalinas que o papel de filtro, mas apresenta porções de regiões amorfas (ARIFOGLU e ÖGEL, 2000).

Xilanases

A completa hidrólise da xilana requer a ação de muitas enzimas hidrolíticas com diferentes especificidades e mecanismos de hidrólise. Dentre essas enzimas as xilanases (ou endoxilanases, E.C. 3.2.1.8) são as principais envolvidas na hidrólise da xilana (BOCCHINI *et al.*, 2005).

As xilanases hidrolisam de forma randômica as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ da xilana, o maior componente polissacarídico da hemicelulose da parede celular vegetal, para produzir xilooligossacarídeos (xilooligômeros) de diferentes tamanhos (LI *et al.*, 2006).

Muitos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos produzem xilanase. No entanto, fungos filamentosos como espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* são de interesse particular, pois podem excretar níveis mais altos de xilanase que leveduras e bactérias para posterior aplicação na indústria biotecnológica (FANG *et al.*, 2007).

Aplicações das enzimas do complexo celulolítico e da xilanase

Diversas são as aplicações industriais das enzimas do complexo celulolítico e das xilanases. Na indústria de detergentes as celulases podem ser aplicadas para clarificação da cor e anti-redeposição de algodão. Na indústria têxtil essas enzimas podem ser utilizadas para a finalização de sarja e para amaciar algodão. Na indústria de polpas e papel para descoloração, melhoramento da drenagem e modificação de fibras (KIRK *et al.*, 2002).

As xilanases causaram um impacto no mundo da biotecnologia pela sua aplicação nas indústrias de polpas e papel, rações, alimentação e fermentação. A aplicação mais promissora da xilanase é no pré-branqueamento de polpa Kraft. Outras aplicações incluem o refinamento do café, a extração de óleos vegetais e fécula, como também melhoramento de propriedades nutricionais de silagem de grãos agrícolas, aumentando a digestibilidade de rações para animais, degomagem de fibras vegetais como juta, rami e cânhamo e em combinação com pectinase e celulase na clarificação de sucos e na recuperação de açúcares fermentáveis de hemiceluloses (BOCCHINI *et al.*, 2005; LATIF *et al.*, 2006).

Ainda, as enzimas do complexo celulolítico e a xilanase possuem potencial aplicabilidade na indústria sucroalcooleira mundial, principalmente do Brasil, que possui a tecnologia de formação do álcool combustível (SCHARLEMANN e LAURANCE, 2008)

Uma das grandes preocupações é o uso de fontes renováveis de energia. Dessa forma, foi desenvolvida tecnologia para o uso de álcool como combustível automobilístico. Tem se buscado desenvolver tecnologia para uso de subprodutos da indústria agrícola, como da sucroalcooleira para desenvolvimento do chamado etanol de segunda geração, no entanto a tecnologia ainda não está totalmente desenvolvida e para a produção de etanol a partir de resíduos é necessário que ocorra a hidrólise primeiramente, o que requer uma grande quantidade de celulasas para a sacarificação (PANDEY *et al.*, 2000).

Para satisfazer a necessidade industrial de xilanase e celulase é imperativo explorar novas cepas microbianas para produção dessas enzimas de forma ativa e efetiva (LATIF *et al.*, 2006).

Bagaço de cana-de-açúcar

No Brasil, 5,8 milhões de hectares de cana-de-açúcar foram plantados para a safra 2008/09. Desse total, estimou-se que 55% da safra foi destinada para a produção de etanol e 45% para a produção de açúcar. A expectativa para a produção da safra de 2008/2009 foi de 569 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que correspondeu a 27 mil litros de etanol e 31 mil toneladas de açúcar. Essa produção gerou cerca de 227 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar residual da indústria. Parte foi

incinerada para uso da energia em forma de calor pela própria indústria. A Figura 7 apresenta o histórico do processamento de cana-de-açúcar e geração de bagaço no Brasil desde a safra 2000/2001 (UNICA, 2010).

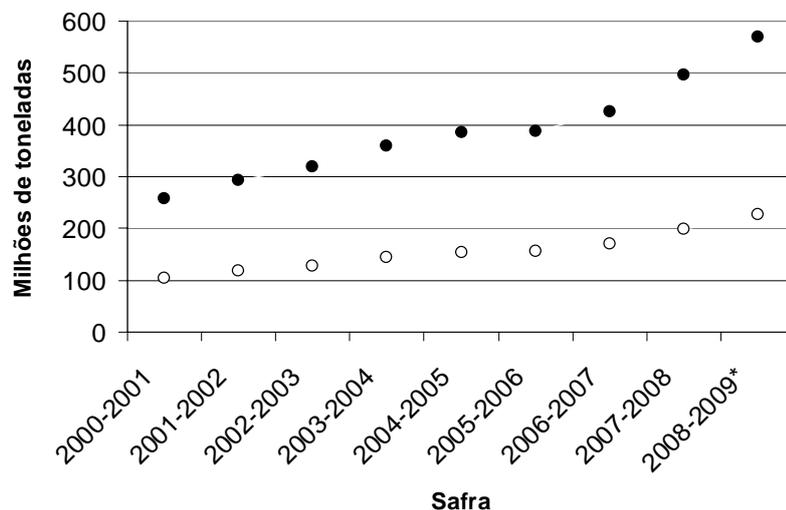


Figura 8 - O histórico do processamento de cana-de-açúcar (●) e geração de bagaço residual no Brasil (○) em milhões de toneladas, * estimativa da produção, Fonte: UNICA (2009).

O bagaço possui diversas aplicações podendo ser utilizado para a alimentação animal, embora seja desprovido de quantidade ideal de nutrientes e com fibra de baixa digestibilidade; para fabricação de papel; alimentação de usinas termoeletricas (ALBERTON, 2004).

O bagaço de cana-de-açúcar consiste aproximadamente de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Quimicamente, o bagaço contém por volta de 50% de hexoses, 30% de pentoses e 2,4% de resíduos não utilizáveis, as cinzas. Pela baixa quantidade de cinzas oferece numerosas vantagens em comparação a outros resíduos de outras culturas como a de arroz e trigo que apresenta 17,5 e 11% de cinzas, respectivamente, para uso em bioconversão usando culturas microbianas, gerando o etanol de segunda geração. Em comparação com outros subprodutos agrícolas o bagaço pode ser considerado como um rico reservatório de energia solar, devido a seus rendimentos elevados e capacidade de regeneração anual (PANDEY *et al.*, 2000).

O etanol de segunda geração produzido a partir da celulose presente nos resíduos da cana-de-açúcar e em outras matérias-primas vegetais é uma alternativa

fundamental aos cerca de cem países capazes de produzir o combustível renovável e que desejam fazê-lo sem prejudicar a produção de alimentos (ROMERO, 2008). Uma vez que o desenvolvimento de bicomcombustíveis a partir de culturas consome numerosos hectares das regiões cultiváveis e desvia a rota da produção de alimentos, fazendo com que o preço final desses aumente (SCHARLEMANN e LAURANCE, 2008).

Linhagens microbianas de diversos microrganismos tem sido utilizadas dentre bactérias, leveduras e fungos filamentosos para a bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar. Fungos filamentosos podem excretar níveis mais elevados de enzimas para a hidrólise desse substrato comparado a leveduras e bactérias, por tanto, espécies como as do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* são de maior interesse para posterior aplicação na indústria biotecnológica (PARK *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2009).

***Aspergillus* Link**

O gênero *Aspergillus* é um grupo formado por fungos filamentosos, primeiramente descrito por Michelli em 1729. Entretanto, sua descrição detalhada só foi realizada em meados do Século XIX, sendo a primeira classificação do gênero por Thom e Church, em 1926. Thom e Raper (1945) identificaram 14 grupos distintos neste gênero. Porém, ainda são feitos estudos bioquímicos e moleculares para reclassificação desses organismos, tendo em vista o grande número de espécies (RAPER e FENNEL, 1965; DE VRIES e VISSER, 2001).

As espécies de *Aspergillus* são cosmopolitas e considerados fungos filamentosos anemófilos. Este gênero na forma anamorfa pertence à divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e apresenta mais que cem espécies, as quais são identificadas conforme características morfológicas, sendo divididas em seis subgêneros, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati*, com uma ou mais seções (KLICH, 2002).

Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 mm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fíalide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios (também chamados de conídios) (Figura 1). Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada, outeleomorfa, caracterizada pela

presença de cleistotécios, ascos e ascosporos. Nestes casos, o fungo é classificado como teleomorfo e pertencente a um dos oito gêneros *Emericella*, *Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Sclerocleista* ou *Fennellia* (KLICH, 2002).

A importância médica do gênero se dá por toxinas produzidas e a patogenicidade. As aflatoxinas são os mais importantes grupos de micotoxinas. Essas são conhecidas como os cancerígenos mais tóxicos e mais potentes produzidos naturalmente por fungos, principalmente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Espécies de *Aspergillus* são excepcionais patógenos, podendo também provocar repostas alérgicas. Nas últimas décadas, aspergiloses surgiram como uma grande ameaça para pessoas, principalmente pacientes imunocomprometidos, assim, *Aspergillus fumigatus* representa a ameaça predominante. Uma variedade de atributos celulares acompanhado por fatores ambientais contribuem para o potencial de virulência deste fungo filamentoso e tem-se começado a elucidar o que torna *Aspergillus* patogênicos ou alergênicos em determinadas circunstâncias. (GOLDMAN e OSMANI, 2008).

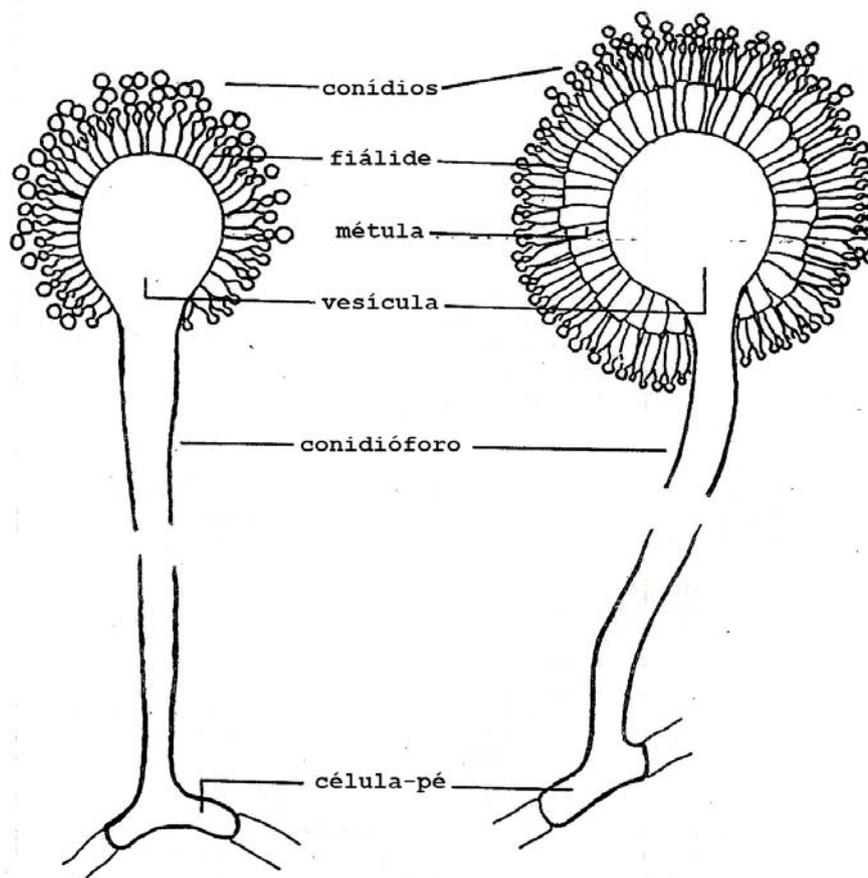


Figura 9. Conidióforos característicos de espécies de *Aspergillus*: (a) uniseriado de *A. equitus*; (b) biseriado de *A. ochraceus*. Fonte: Klich e Pitt (1988).

Aspergillus também são importantes na produção de diversos alimentos. Diversos produtos comercializados são obtidos após fermentação por espécies desse gênero, como é o caso do molho de soja (*shoyu*), pasta de soja (*missô*), aguardente de arroz (*sake*) que são obtidos após a fermentação por *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* ou *A. kawachii*. No Oriente, os temperos para peixes, aves, carnes, leguminosas e cereais foram melhorados através da fermentação com enzimas proteolíticas e amilolíticas produzidas por espécies de *Aspergillus* (GOLDMAN e OSMANI, 2008).

Espécies de *Aspergillus*, tem sido estudadas para a produção de produtos de interesse biotecnológico, como *A. niger* (Figura 10) e *A. tubingensis* que possuem características que os tornam ideais para a aplicação na indústria biotecnológica, como boa capacidade de fermentação e graus elevados de produção enzimática (YOKOYAMA, 2001).

Dentre as enzimas que as espécies do gênero *Aspergillus* podem sintetizar com níveis de produção significativos estão as enzimas do complexo celulolítico e a xilanase o que as tornam aplicáveis na indústria biotecnológica (SCHUSTER *et al.*, 2002; LUBERTOZZI e KEASLING, 2009; SÁNCHEZ, 2009). Estudos tem buscado o uso de substratos de baixo custo para produção de enzimas por *Aspergillus*, como o uso de resíduo de uva para produção de enzimas celulolíticas e farelo de trigo, sabugo de milho e palha de arroz para produção de xilanase (DEDAVID E SILVA *et al.*, 2009; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009).

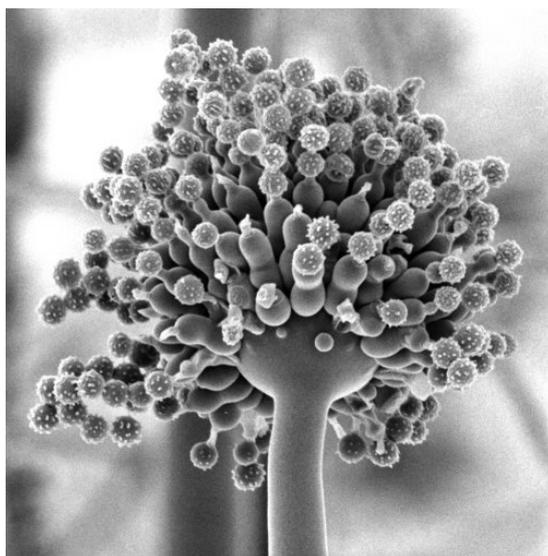


Figura 10. Foto de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de reprodução assexuada de *Aspergillus niger*. Fonte: Read (1991).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Produzir enzimas do complexo celulolítico e xilanase por linhagens de *Aspergillus* da Coleção de Culturas Micoteca URM-UFPE utilizando bagaço cana-de-açúcar como substrato.

Objetivos Específicos

- Selecionar dentre nove linhagens de *Aspergillus* as mais promissoras para a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase;
- Produzir enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por linhagens de *Aspergillus* da Coleção de Culturas Micoteca URM-UFPE em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato;
- Avaliar a influência das variáveis pH, concentração de substrato, concentração de inóculo, tipo de bagaço, tempo de cultivo, agitação e temperatura de cultivo na produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por linhagens de *Aspergillus* em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato utilizando como ferramenta planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} .

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, L. R. **Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por *Streptomyces viridosporus* T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária.** (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004. 133 p.
- ARAI, T., KOSUGI, A., CHAN, H., *et al.* Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n.5, p.654-660, 2006.
- ARIFOGLU, N. e ÖGEL, Z. B. Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture Torula thermophila. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n.8, p.560-569, 2000.
- BOCCHINI, D. A., OLIVEIRA, O. M. M. F., GOMES, E., *et al.* Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n.12, p.3653-3659, 2005.
- BOMMARIUS, A. S., KATONA, A., CHEBEN, S. E., *et al.* Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n.6, p.370-381, 2008.
- CHELLAPANDI, P. e JANI, H. M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.122-127, 2008.
- DEDAVID E SILVA, L., CORTEZ LOPES, F., TERRA SILVEIRA, S., *et al.* Production of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus phoenicis* in Grape Waste using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n.2, p.295-305, 2009.
- DE-PAULA, E. H., RAMOS, L. P. e DE OLIVEIRA AZEVEDO, M. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n.1, p.35-41, 1999.
- DE VRIES, R. P. e VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 65, p.497-522, 2001.
- DUMITRIU, S. **Polisaccharides: structure, diversity and functional versatility.** New York: Marcel Dekker, 2005.
- FANG, H. Y., CHANG, S. M., HSIEH, M. C., *et al.* Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n.1-4, p.36-42, 2007.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure applied chemistry**, v. 59, p.257-268, 1987.

GOLDMAN, G. H. e OSMANI, S. **The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008.

HECK, J. X., HERTZ, P. F. e AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.213-218, 2002.

KIRK, O., BORCHERT, T. V. e FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.345-351, 2002.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KLICH, M. A. e PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing, 1988.

LATIF, F., ASGHER, M., SALEEM, R., *et al.* Purification and Characterization of a Xylanase Produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.45-50, 2006.

LI, L., TIAN, H., CHENG, Y., *et al.* Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n.6, p.780-787, 2006.

LUBERTOZZI, D. e KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n.1, p.53-75, 2009.

MARTINS, L. F., KOLLING, D., CAMASSOLA, M., *et al.* Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n.5, p.1417-1424, 2008.

MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA, R., *et al.* Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n.3, p.177-187, 2000.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p.69-80, 2000.

PARK, PARK, Y., KANG, *et al.* Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n.6, p.761-766, 2002.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C., MICHELIN, M., BETINI, J., *et al.* Production of xylanase by Aspergilli using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p.149-155, 2009.

RAPER, K. B. e FENNELL, D. L. **The genus *Aspergillus***. Flórida: Robert E. Krieger Publishing Company, INC., 1965.

READ, N. D. Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions. In: K. Mendgen e D. E. Lesemann (Ed.). Electron Microscopy of Plant Pathogens. Berlin: Springer-Verlag, 1991. Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions., p.17-29

ROMERO, T., **Etanol de segunda geração é essencial à sustentabilidade dos biocombustíveis**. 2008. Disponível em:<<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=etanol-de-segunda-geracao-e-essencial-a-sustentabilidade-dos-biocombustiveis&id=>> Acesso em: 24 set 2009.

SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n.2, p.185-194, 2009.

SCHARLEMANN, J. P. W. e LAURANCE, W. F. ENVIRONMENTAL SCIENCE: How Green Are Biofuels? **Science**, v. 319, n.5859, p.43-44, 2008.

SCHUSTER, SCHUSTER, E., DUNN, C., *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n.4, p.426-435, 2002.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry Fundametal and Applications** California: Academic Press, 1992.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**: John Wiley & Sons, 1996.

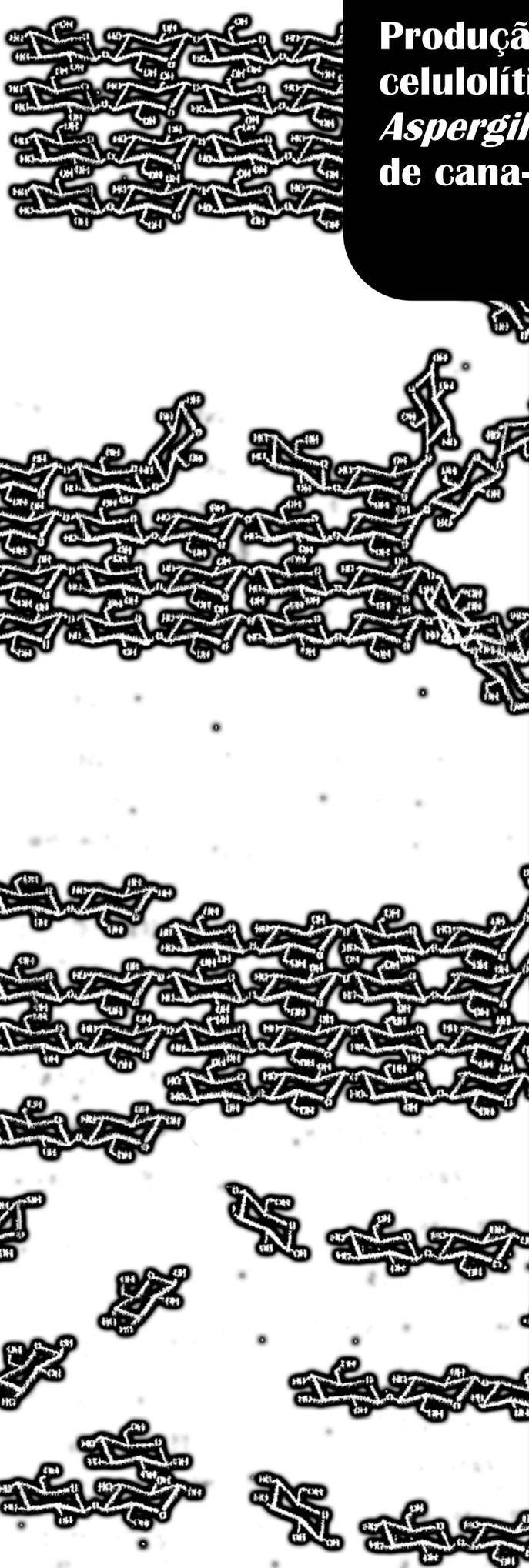
THOM, C. e RAPER, K. B. **A manual of the Aspergilli**. Baltimore: The Williams e Wilkins Co, 1945.

TIMAR-BALAZSY, A. e EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation**. Oxford Butterworth-Heinemann, 1998.

UNICA, **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. São Paulo: 2010. Disponível em:<www.unica.com.br> Acesso em: 07 fev 2010.

YOKOYAMA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p.241-246, 2001.

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

The image features a large, detailed chemical structure of cellulose, a polysaccharide composed of glucose units linked by beta-1,4-glycosidic bonds. The structure is shown as a long, zigzag chain of glucose rings, with various hydroxyl and hydroxymethyl groups attached to the rings. The structure is rendered in a black and white, wireframe style, highlighting the complex three-dimensional arrangement of the polymer chain. It occupies the left and bottom portions of the page, partially overlapping a dark grey rounded rectangle at the top left.

**Produção de enzimas do complexo
celulolítico e da xilanase por
Aspergillus spp. utilizando bagaço
de cana-de-açúcar como substrato**

Capítulo 2

**Submetido à revista Pesquisa
Agropecuária Brasileira
ISSN 1678-3921
Qualis B3 – Ciências Biológicas I**

**Marilia Ribeiro Sales^{a*}
Rosemary Batista de Moura^a
Milena Fernandes da Silva^a
Gorete Ribeiro de Macedo^b
Ana Lúcia Figueiredo Porto^a**

^a **LABTECBIO - Laboratório de
Tecnologia de Bioativos,
Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal, Universidade
Federal Rural de Pernambuco –
52171-900 Recife – PE – Brasil**

^b **Universidade Federal do Rio Grande
do Norte – Natal – RN – Brasil**

***Autor para correspondência.
Tel.: +55 81 33206345;
E-mail: mariliarsales@gmail.com
(Marilia R. Sales)**

Resumo - O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus* spp. em cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Nove linhagens do gênero *Aspergillus* foram obtidas da Coleção de Culturas Micoteca URM-UFPE e foram cultivadas em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar residual (BCR) e cru (BCC). Após o período de cultivo de cinco dias (30°C, 90 rpm) o extrato enzimático foi obtido através da centrifugação (5000 .g) da cultura. A produção do complexo celulolítico foi estudada através da atividade de celulases totais, endoglucanase, exoglucanase e celobiase obtida no extrato enzimático, como também da xilanase. As linhagens que produziram o complexo celulolítico nos maiores níveis utilizando bagaço de cana-de-açúcar cru e residual foram *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953. O BCC foi melhor indutor para produção de celulases totais e xilanase, enquanto que o BCR induziu melhor a produção de exoglucanase. Já a produção de endoglucanase e celobiase nos níveis mais elevados foi independente do tipo de bagaço de cana-de-açúcar utilizado. As linhagens *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 produziram todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase utilizando o bagaço de cana-de-açúcar em nível superior ao produzidos pelas demais linhagens de *Aspergillus* investigadas.

Termos para indexação: *Aspergillus*, celulose, complexo celulolítico, xilanase, bagaço de cana-de-açúcar

Production of cellulolytic complex enzymes and xylanase by *Aspergillus* spp. using bagasse from sugar as substrate.

Abstract - The objective of this study was to investigate the production of cellulolytic enzymes and xylanase by *Aspergillus* spp. in submerged cultivation using sugarcane bagasse as substrate. Nine strains of *Aspergillus* were obtained from Culture Collection URM-UFPE and were cultivated in medium containing residual (REB) and raw sugarcane bagasse (RAB), after the growing period of five days (30°C, 90 rpm) the enzymatic extract was obtained by centrifugation (5000.g) of culture. The production of cellulolytic complex was studied by the activity of total cellulase, endoglucanase, exoglucanase and cellobiase, and also xylanase. The strains that produced the complex cellulolytic and xylanase at the highest levels using RAB and REB were *A. phoenicis* URM 4924 and *A. aculeatus* URM 4953. The RAB was the best inducer for total cellulases and xylanase, while the REB was the best inducer for exoglucanase. The production of endoglucanase and cellobiase at higher levels was independent of the type of sugarcane bagasse. The strains *A. phoenicis* URM 4924 and *A. aculeatus* URM 4953 produced all the enzymes of complex cellulolytic and xylanase using sugarcane bagasse as substrate at levels higher than produced by other *Aspergillus* strains investigated.

Index terms: *Aspergillus*, cellulose, cellulolytic complex, xylanase, sugarcane bagasse

Introdução

A indústria agrária produz diversos resíduos compostos primariamente de celuloses e hemiceluloses. Dentre esses, um dos subprodutos mais abundantes é o da indústria sucroalcooleira: o bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo fibroso do colmo desse vegetal que se torna resíduo após a obtenção do caldo de cana. É um subproduto lignocelulósico que é usado primariamente como combustível para as caldeiras das usinas (PANDEY *et al.*, 2000).

A sacarificação de subprodutos lignocelulósicos é uma alternativa interessante para o manejo de biomassa residual vegetal, como o bagaço de cana-de-açúcar. Dessa forma, o resíduo pode ser utilizado como substrato para a produção de enzimas que hidrolisam a celulose e a hemicelulose, como as do complexo celulolítico e as xilanases (DE-PAULA *et al.*, 1999).

Comumente é sabido que o complexo celulolítico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes principais: as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), as celobiohidrolases ou exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) e as celobiasas ou β -glicosidases (E.C.3.2.1.21), essas últimas usualmente não são descritas como celulases legítimas, mas tem um importante papel na hidrólise da celulose (MARTINS *et al.*, 2008). As xilanases (E.C. 3.2.1.8) são significantes na degradação do bagaço de cana-de-açúcar por contribuir na hidrólise de hemiceluloses visto que essas são compostas abundantemente de xilanas (HECK *et al.*, 2002; SÁNCHEZ, 2009).

As xilanases podem ser utilizadas no pré-tratamento de polpas para produção de papéis, para clarificar sucos e como aditivo em rações para aumentar a absorção intestinal de nutrientes. Já as enzimas celulásicas podem ser utilizadas em detergentes

para descoramento e amaciamento de tecidos, bioestonagem e aumentar o rendimento de extração de óleos vegetais (SAID e PIETRO, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* têm se destacado na produção de diversas enzimas de interesse biotecnológico em substratos lignocelulósicos dentre essas, as do complexo celulolítico e xilanase (SÁNCHEZ, 2009). Principalmente no que se diz em relação à β -glicosidases uma vez que índices elevados dessa enzima são descritos como produzidos por linhagens do gênero *Aspergillus* superiores ao produzidos por *Trichoderma* (ABDEL-FATTAH *et al.*, 1997; FLACHNER e RECZEY, 2004).

Apesar dos *Trichoderma* serem citados na literatura como bons produtores de exo e endoglucanases, são deficientes na produção celobiase, o que restringe a conversão de celobiose à glicose (SHEN e XIA, 2004; CHANDRA *et al.*, 2009). Por esta razão, celulases oriundas desta fonte não são consideradas para uso tecnológico para a hidrólise da celulose (CASTELLANOS *et al.*, 1995).

Por outro lado, os *Aspergillus* tem sido amplamente estudados para produção de celulases e celobiasas. Apesar das respostas para endo e exoglucanase serem relativamente menores que as encontradas para *T. reesei*, a produção de β -glucosidases por *Aspergillus* é superior, resultando na síntese de todas as enzimas do complexo celulolítico de forma eficiente (FLACHNER e RECZEY, 2004).

No presente artigo, foi investigado a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanases a partir de *Aspergillus* spp. em cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Materiais e Métodos

Microrganismo e condições de cultivo

Todas as linhagens de *Aspergillus* foram obtidas da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil: *A. aculeatus* URM 4953, *A. carbonarius* URM 1546, *A. heteromorphus* URM 0269, *A. japonicus* URM 4599, *A. niger* URM 5218, *A. niveus* URM 2803, *A. phoenicis* URM 4924, *A. sydowii* URM 3066, e *A. terreus* URM 1876. As linhagens foram mantidas em tubos contendo ágar Malte esterilizado a 30°C por 30 dias.

O bagaço de cana-de-açúcar residual (BCR) procedente do processo industrial para obtenção do caldo de cana-de-açúcar e o bagaço de cana-de-açúcar cru (BCC) foram cedidos pela Usina Ipojuca, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. A principal diferença entre o BCR e o BCC é que o primeiro foi processado industrialmente e é resíduo da indústria sucroalcooleira enquanto que o BCC foi obtido pelo método da compressão em uma moenda elétrica doméstica.

Ambos os bagaços (BCC e BCR) foram lavados com água potável e posteriormente com água destilada, seco e moído em processador de alimentos doméstico (Walita Master Plus). O meio de cultivo utilizado para a produção do complexo celulolítico apresentou a seguinte composição: 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 0,13 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,03 g/L $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; 0,03 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/L CaCl_2 ; 0,5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,156 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,14 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,14 mg/L CoCl_2 (MARTINS *et al.*, 2008) e 1%(p/v) de BCR ou BCC.

O inóculo foi obtido de uma cultura crescida em Ágar Malte por 7 dias para as diferentes linhagens de *Aspergillus*. Os esporos foram suspensos em solução de Tween 80 (0,01%) e inoculados em 50mL do meio de cultivo contido em Erlenmeyers com capacidade para 250mL de modo a obter concentração final de 10^4 esporos/mL. O

cultivo foi mantido em agitador orbital (90 rpm) a 30°C por 5 dias. Após esse período, o cultivo foi centrifugado (5000 . g) e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático.

Amostras do meio de cultivo após a esterilização foram utilizadas para a determinação da quantidade inicial de açúcares redutores dosados pelo método descrito por Miller (1959).

Atividades enzimáticas, determinação de açúcares redutores e conteúdo protéico

O extrato enzimático foi usado para determinar as atividades das celulases totais, endoglucanases, exoglucanase, celobiase e de xilanase.

A atividade de celulases totais foi determinada utilizando papel de filtro Whatmann n.1 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) como substrato, a atividade de endoglucanase foi determinada usando carboximetilcelulose (CMC) e a atividade de celobiase foi ensaiada utilizando kit comercial de glicose oxidase (Labtest, Minas Gerais, Brasil) (GHOSE, 1987). A atividade de exoglucanase foi mensurada pela modificação do método de Mawadza *et al.* (2000), incubando 250 µL do extrato enzimático com 500 µL de solução 1% (p/v) de celulose microcristalina (Sigmacell type 50, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) em solução tampão citrato (50 mM, pH 5,0) a 50°C durante 2 horas. A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com o método descrito por Bailey *et al* (1992), usando xilana de endoderma de aveia como substrato. Por o meio de cultivo conter açúcares redutores que interfeririam no resultado das atividades enzimáticas, o controle foi realizado pela inativação da enzima após ser mantida a 100°C durante 15 min antes da incubação com seu respectivo substrato.

Para todas as atividades enzimáticas uma unidade foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose ou xilose por minuto de reação, conforme enzima ensaiada.

A quantidade de açúcares redutores produzida após a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi mensurada seguindo a metodologia do ácido dinitrossalicílico (DNS) descrita por Miller (1959). O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando Soro Albumina Bovina como padrão. As atividades enzimáticas foram expressas em U/mg de proteína.

Análises estatísticas

Todos os resultados da detecção enzimática apresentados representam a média de três experimentos independentes. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA - Análise de variância (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Todas as linhagens de *Aspergillus* produziram enzimas do complexo celulolítico (Tabela 1). Independente dos substratos utilizados, BCR e BCC, a produção enzimática foi estatisticamente similar em quatro linhagens para a produção de celulases totais (*A. aculeatus* URM 4953, *A. niger* URM 5218, *A. phoenicis* URM 4924, e *A. terreus* URM 1876) e endoglucanase (*A. aculeatus* URM 4953, *A. carbonarius* URM 1546, *A. japonicus* URM 4599, e *A. terreus* URM 1876), três para a produção de xilanase (*A. aculeatus* URM 4953, *A. carbonarius* URM 1546, e *A. terreus* URM 1876) e cinco na produção de celobiase (*A. japonicus* URM 4599, *A. niger* URM 5218, *A. niveus* URM 2803, *A. phoenicis* URM 4924, e *A. sydowii* URM 3066), entretanto, nenhuma linhagem apresentou resultado estatisticamente igual para a produção de exoglucanase. Nas linhagens que apresentaram diferenças significativas o BCR foi melhor indutor para a produção de celulases totais em 33% das linhagens e 78% das linhagens produziram mais exoglucanase nesse substrato. O BCC foi melhor indutor em 33% das linhagens para produção de endoglucanase e celobiase.

A concentração de açúcares redutores no tempo zero do BCC apresentou uma média de 0,9 mg/mL e do BCR 0,006mg/mL, isto pode ser justificado pelo diferente tratamento realizado no bagaço de cana-de-açúcar. No BCC a primeira etapa para obtenção do bagaço é a passagem do colmo por uma moenda elétrica onde é comprimido, não é submetido a processos de aquecimento, moagem e recompressão industriais. Já o BCR é o resíduo da usina de cana-de-açúcar para obtenção do caldo utilizado na produção de álcool ou açúcar. O processo para obtenção desse caldo industrialmente consiste na extração do caldo primário e secundário, o bagaço é moído e recomprimido para extração de quase todo o açúcar solúvel para um melhor

aproveitamento do processo a nível industrial. Sendo assim, utilizando o BCC, os fungos filamentosos tiveram uma quantidade inicial de açúcar no meio de cultivo.

Glicose como um suplemento no meio de cultivo de um resíduo agroindustrial aumenta cerca de 6% a produção de xilanase, entretanto, a 8% (p/v) a atividade decresce, a adição de glicose a certas concentrações produz um efeito positivo na síntese enzimática, mas quando adicionada em excesso proporciona um efeito repressivo (BOTELLA *et al.*, 2007). Provavelmente, esse fenômeno ocorreu neste trabalho para *A. sydowii* URM 3066 e *A. heteromorphus* URM 0269, nos quais não foram detectadas atividades de celulases totais e xilanases no extrato enzimático que foi obtido em meio que continha BCC como substrato, mas apresentaram atividade em meio que continha BCR, onde existia 0,006 mg/mL de açúcar inicial no meio de cultivo (Tabela 1).

No meio que continha BCC como substrato a linhagem *A. phoenicis* URM 4924 produziu quantidade superior de xilanase (3 vezes) e endoglucanase (9 vezes) em relação ao meio que continha BCR. Provavelmente por que a quantidade de 0,9mg/mL de açúcares redutores no meio de cultivo para esta linhagem tenha exercido um efeito positivo, indutor, conforme descrito por Botella *et al.* (2007).

A concentração final de açúcares redutores (AR) decresceu no extrato enzimático que conteve BCC, e aumentou no extrato enzimático que conteve BCR na composição em 6 das 9 linhagens (*A. aculatus* URM 4923, *A. heteromorphus* URM 0269, *A. japonicus* URM 4599, *A. niger* URM 5218, *A. sydowii* URM 3066, e *A. terreus* URM 1876).

A análise de AR finais, no extrato enzimático, não demonstrou ser um parâmetro determinante para a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar pelas enzimas do complexo celulolítico produzidas pelos *Aspergillus*, uma vez que quantidade maiores de AR no extrato enzimático não representaram, necessariamente, aumento da atividade

enzimática, nos parâmetros estudados. Uma vez que as linhagens *A. aculeatus* URM 4953, *A. japonicus* URM 4599, e *A. terreus* URM 1876 apresentaram maior quantidade de açúcares redutores no extrato enzimático obtido em meio de cultivo que continha BCC, mas para determinação de endoglucanase e xilanase o extrato que conteve BCR apresentou resultados superiores ou iguais ao que conteve BCC.

Apesar de nos extratos enzimáticos obtidos por cultivo de *A. niger* URM 5218, *A. niveus* URM 2803, *A. phoenicis* URM 4924 e *A. sydowii* URM 3066 não terem sido detectados AR, apresentaram atividade para as enzimas estudadas no extrato que continha BCC, para a maioria das enzimas, a produção do complexo celulolítico e xilanase foi suficiente para produzir açúcares e para manter a absorção de nutrientes durante os cinco dias de cultivo.

No meio que conteve BCR como substrato, os melhores produtores das enzimas foram *A. carbonarius* URM 1546, *A. aculeatus* URM 4953, *A. phoenicis* URM 4924, *A. sydowii* URM 4924 e *A. terreus* URM 1876 para celulases totais, endoglucanase, celobiase, exoglucanase e xilanase, respectivamente. Os maiores níveis de produção enzimática no meio que conteve BCC como substrato foram apresentados por *A. japonicus* URM 4599 e *A. aculeatus* URM 4953 para celulases totais, *A. terreus* URM 1876 e *A. aculeatus* URM 4953 para exoglucanase, *A. phoenicis* URM 4924 para endoglucanase, celobiase e xilanase (Tabela 1).

Para a atividade de celulases totais as atividades enzimáticas foram superiores no extrato que conteve BCC como substrato, os maiores níveis foram apresentados pelas linhagens *A. japonicus* URM 4599 (4,96 UI/mg) e *A. aculeatus* URM 4953 (4,80 UI/mg). Para a atividade de celulases totais produzida no meio que conteve BCR o maior resultado obtido foi por *A. carbonarius* (3,49 UI/mg). A linhagem de *A. phoenicis*

URM 4924 apresentou os maiores níveis de atividade de celobiase e esses foram semelhantes para ambos os substratos estudados.

Castellanos *et al.* (1995) encontrou valores de atividade específica de 0,41 e 0,0155 UI/mg utilizando papel de filtro Whatmann n. 1 como substrato para celulases totais e 0,037 e 9,35 UI/mg utilizando celobiose como substrato, produzida por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, respectivamente, no extrato obtido após o cultivo das linhagens em meio contendo celulose microcristalina como substrato. Martins *et al.* (2008) obteve atividade de 1,81 e 1,83 UI/mg utilizando papel de filtro e 1,28 e 0,29 UI/mg utilizando celobiase produzida por *Penicillium echinulatum* e *T. reesei*, respectivamente, nas mesmas condições de cultivo e métodos de determinações enzimáticas. A linhagem *A. niger* URM 5218 produziu 4 vezes mais celobiase que *A. niger* usado por Castellanos *et al.* (1995) e *A. aculeatus* URM 4923 produziu cerca de 2 vezes mais celulase que *T. reesei* usado por Martins *et al.* (2008). Estes resultados comprovam que o bagaço de cana-de-açúcar é um melhor indutor que a celulose microcristalina para promover a produção de celulase e celobiase.

Os maiores níveis de produção de exoglucanase foram obtidos nos extratos de culturas conduzidas em meio que conteve BCR como substrato, foram elas: cultura de *A. sydowii* URM 3066 (24,46 U/mg), *A. japonicus* URM 4599 (18,12 U/mg), *A. aculeatus* URM 4953 (16,73 U/mg) e *A. phoenicis* URM 4924 (16,44 U/mg).

Para atividade de endoglucanase os maiores níveis da atividade foram numericamente similares para extrato obtido por *A. aculeatus* URM 4953 em cultura com BCR e por *A. phoenicis* URM 4924 em cultura com BCC de 112,3 UI/mg. A mais elevada atividade xilanolítica foi apresentada por *A. phoenicis* URM 4924 de 50.271 U/mg no extrato enzimático obtido após cultivo utilizando BCC como substrato por 120 horas.

A produção de endoglucanase, exoglucanase e xilanase relatadas neste trabalho são também superiores a outras produzidas por linhagens de outras espécies de microrganismos como *Penicillium echinulatum*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Chaetomium thermophile*, *Lentinula edodes* e *Chrysosporium lucknowense* utilizando diversos substratos para induzir a produção. *A. aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 produziram, respectivamente, 55% e 90% mais endoglucanase que *Chrysosporium lucknowense* crescido em meio contendo carboximetilcelulose como substrato (BUKHTOJAROV *et al.*, 2004). As linhagens *A. aculeatus* URM 4953 e o *A. phoenicis* URM 4924 utilizadas neste trabalho produziram mais exoglucanase que *C. lucknowense* cultivado usando celulose microcristalina como substrato para induzir a produção da enzima, a linhagem de *A. aculeatus* URM 4953 produziu 40 vezes mais e *A. phoenicis* URM 4924 35 vezes mais. A atividade xilanolítica da enzima produzida por *A. phoenicis* URM 4924 em meio contendo BCC como substrato foi cerca de 10 vezes superior que a apresentada por *Penicillium chrysogenum* em meio contendo palha de trigo, casca de arroz e fibra de coco (MEDEIROS, 2007). A Tabela 2 resume dados reportados na literatura da atividade específica de enzimas do complexo celulolítico e xilanase em comparação com os obtidos por este trabalho.

A hidrólise de celulose natural a glicose por enzimas produzidas por microrganismos depende do grau de produção enzimática e sinergismo entre as enzimas produzidas. Celulases fúngicas são produzidas em elevados graus, o que inclui todos os componentes do sistema multi-enzimático com diferentes especialidades e modo de ação que agem em sinergismo para a completa hidrólise da celulose (MAWADZA *et al.*, 2000). As linhagens de *Aspergillus* testadas neste trabalho produziram as enzimas do complexo celulolítico e xilanase, dentre essas as que produziram todas as enzimas

nos maiores níveis utilizando bagaço de cana-de-açúcar cru e residual foram *A. aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 (Tabela 2).

Conclusões

1. Todas linhagens de *Aspergillus* estudadas produziram enzimas do complexo celulolítico e xilanase.
2. O BCC foi melhor indutor para produção de celulases totais e xilanase, enquanto que o BCR induziu melhor a produção de exoglucanase, já a produção de endoglucanase e celobiase nos níveis mais elevados foi independente do tipo de bagaço de cana-de-açúcar utilizado.
3. *Aspergillus phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 são alternativas promissoras para produzir enzimas do complexo celulolítico e a xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar residual e cru como substrato em cultivo submerso.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES por conceder bolsa de estudo de pós-graduação, ao CNPq pelo apoio financeiro através do projeto n.º 554740/2006-0 – Desenvolvimento de bioprocessos para agregação de valor a resíduos indústrias do Nordeste e pela bolsa ITI-1A processo n.º 18100/8/2007-6, à Usina Ipojuca S/A por prover o bagaço de cana-de-açúcar usado na pesquisa e à Sra. Ieda Cabral pela assistência técnica.

Tabela 1 - Atividade específica de enzimas do complexo celulolítico e de xilanase produzidas por linhagens de *Aspergillus* crescidas em bagoço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Linhagem	Celulases totais (UI/mg)		Exoglucanase (U/mg)		Endoglucanase (UI/mg)	
	BCR*	BCC*	BCR*	BCC*	BCR*	BCC*
<i>A. aculeatus</i> URM 4953	2,13 ^{ABa} ± 1,02	4,80 ^{Aa} ± 1,73	16,73 ^{Ba} ± 1,38	8,22 ^{Ab} ± 0,69	112,30 ^{Aa} ± 33,01	92,02 ^{ABa} ± 15,53
<i>A. carbonarius</i> URM 1546	3,49 ^{Aa} ± 0,25	ND**	5,80 ^{Da} ± 0,04	7,73 ^{ABb} ± 0,09	89,76 ^{ABa} ± 17,60	75,04 ^{BCa} ± 12,85
<i>A. heteromorphus</i> URM 0269	1,15 ^{Ba} ± 0,51	ND**	11,62 ^{Ca} ± 0,08	3,02 ^{Eb} ± 0,03	19,35 ^{DEa} ± 5,19	0,63 ^{Eb} ± 0,73
<i>A. japonicus</i> URM 4599	1,25 ^{Bb} ± 0,31	4,96 ^{Aa} ± 1,75	18,12 ^{Ba} ± 0,61	3,84 ^{DEb} ± 0,26	42,22 ^{CDEa} ± 5,17	52,63 ^{CDa} ± 4,04
<i>A. niger</i> URM 5218	1,82 ^{Ba} ± 0,42	1,59 ^{Ba} ± 0,54	7,10 ^{Da} ± 0,39	4,35 ^{CDb} ± 0,43	67,23 ^{ABCa} ± 3,74	35,51 ^{Db} ± 9,41
<i>A. niveus</i> URM 2803	1,06 ^{Bb} ± 0,06	2,82 ^{ABa} ± 0,56	10,66 ^{Ca} ± 0,07	5,28 ^{Cb} ± 0,07	21,56 ^{CDEb} ± 3,61	47,83 ^{CDa} ± 3,99
<i>A. phoenicis</i> URM 4924	1,77 ^{Ba} ± 0,85	2,07 ^{ABa} ± 1,29	16,44 ^{Ba} ± 1,04	6,94 ^{Bb} ± 0,48	13,00 ^{DEb} ± 5,15	112,29 ^{Aa} ± 12,22
<i>A. sydowii</i> URM 3066	0,85 ^{Ba} ± 0,14	ND**	24,46 ^{Aa} ± 0,93	3,36 ^{DEb} ± 0,08	ND**	5,01 ^{Ea} ± 2,01
<i>A. terreus</i> URM 1876	1,78 ^{Ba} ± 0	0,8 ^{Ba} ± 1,43	6,28 ^{Da} ± 0,21	8,46 ^{Ab} ± 0,51	55,47 ^{BCDa} ± 28,06	65,08 ^{BCa} ± 14,68

Linhagem	Celobiase (UI/mg)		Xilanase (U/mg)		Açúcares redutores totais (mg/mL)	
	BCR*	BCC*	BCR*	BCC*	BCR*	BCC*
<i>A. aculeatus</i> URM 4953	8,03 ^{CDb} ± 3,09	19,32 ^{Ca} ± 3,76	11285,14 ^{BCa} ± 1193,80	11186,22 ^{Ca} ± 445,52	0,009 ^{Aa} ± 0,01	0,055 ^{Ab} ± 0,02
<i>A. carbonarius</i> URM 1546	3,12 ^{Db} ± 0,92	6,55 ^{Ca} ± 1,88	13518,51 ^{ABa} ± 2525,04	16090,96 ^{BCa} ± 3369,19	0,005 ^{Aa} ± 0	0,006 ^{CDa} ± 0
<i>A. heteromorphus</i> URM 0269	40,78 ^{Ba} ± 7,57	2,63 ^{Cb} ± 0,79	6367,11 ^{CDa} ± 688,50	0 ^{Db} ± 0	0,012 ^{Aa} ± 0	0,012 ^{BCDa} ± 0
<i>A. japonicus</i> URM 4599	33,61 ^{BCa} ± 17,88	25,87 ^{Ca} ± 8,67	5675,45 ^{Da} ± 1479,34	0 ^{Db} ± 0	0,011 ^{Aa} ± 0,01	0,030 ^{Bb} ± 0
<i>A. niger</i> URM 5218	41,23 ^{ABa} ± 6,05	58,15 ^{Ba} ± 25,43	12321,48 ^{Bb} ± 169,38	23057,09 ^{Ba} ± 4742,22	0,023 ^{Aa} ± 0,03	ND**
<i>A. niveus</i> URM 2803	4,15 ^{Da} ± 3,32	5,39 ^{Ca} ± 0,16	5517,66 ^{Db} ± 1866,47	16299,41 ^{BCa} ± 3049,26	0,005 ^{Aa} ± 0	ND**
<i>A. phoenicis</i> URM 4924	68,23 ^{Aa} ± 18,31	89,18 ^{Aa} ± 12,17	14733,94 ^{ABb} ± 553,87	50271,76 ^{Aa} ± 1894,38	0,006 ^{Aa} ± 0	ND**
<i>A. sydowii</i> URM 3066	12,74 ^{CDa} ± 5,84	6,55 ^{Ca} ± 3,48	3427,88 ^{Da} ± 1293,38	0 ^{Db} ± 0	0,014 ^{Aa} ± 0	ND**
<i>A. terreus</i> URM 1876	0,22 ^{Db} ± 0,19	6,31 ^{Ca} ± 1,86	17766,71 ^{Aa} ± 3771,91	16151,38 ^{BCa} ± 5007,50	0,007 ^{Aa} ± 0	0,024 ^{BCb} ± 0

*BCC- Bagoço de cana-de-açúcar cru, BCR - Bagoço de cana-de-açúcar residual de usina sucroalcooleira

** Não detectado

Letras Maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, dentro de um mesmo teste enzimático, indica atividade enzimática significativamente diferentes entre as amostras (teste de Tukey p < 0.05)

Tabela 2 – Produção enzimática de linhagens crescidas em diferentes fontes de carbono para produzir enzimas do complexo celulolítico e xilanase.

Microrganismo	Fonte de carbono para a produção enzimática	Produção enzimática (U/mg de proteína) ^a					Referências
		A	B	C	D	E	
<i>Aspergillus foetidus</i>	Celulose microcristalina	0,14	-	-	2,55	-	(CASTELLANOS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Meio de cultura Vogel	-	-	-	-	108,7	(PEIXOTO-NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i> , celulase imobilizada A20	Celulose, lactose, farelo de trigo, extrato de levedura, peptona, uréia, e sais	-	-	-	43,00	-	(ABDEL-FATTAH <i>et al.</i> , 1997)
<i>Aspergillus niger</i> , filtrado da cultura concentrado	Celulose microcristalina	0,01	-	-	9,35	-	(CASTELLANOS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Bacillus</i> sp.AC-1 após a purificação da enzima	Caboximetilcelulose (CMC) de viscosidade média	-	-	-	-	35	(LI, Y. H. <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus subtilis</i> BL53	Resíduo fibroso industrial de soja	0,23	-	-	-	5,19	(HECK <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bacillus subtilis</i> BL62	Resíduo fibroso industrial de soja	1,08	-	-	-	4,06	(HECK <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chaetomium thermophile</i> NIBGE após a purificação da enzima	Palha de trigo	-	-	-	-	95,35	(LATIF <i>et al.</i> , 2006)
<i>Chryso sporium lucknowense</i> (Celobiohidrolase de 65kD)	Celulose microcristalina – técnica Somogyi –Nelson	-	0,19	-	-	-	(BUKHTOJAROV <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chryso sporium lucknowense</i> (Endoglucanase de 44kD)	Caboximetilcelulose (CMC) de viscosidade média	-	-	59	-	-	(BUKHTOJAROV <i>et al.</i> , 2004)
<i>Clostridium cellulovorans</i> (gene rEngH) expresso em <i>E. coli</i>	Caldo Luria suplementado com canamicina – Técnica de Dugert <i>et al.</i>	-	-	5,87	-	ND*	(ARAI <i>et al.</i> , 2006)
<i>Humicola insolens</i>	Celulose microcristalina	-	-	2,40	-	-	(ARIFOGLU e ÖGEL, 2000)
<i>Lentinula edodes</i>	Celulose microcristalina	-	0,07	-	-	-	(PEREIRA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2003)
<i>Paecilomyces thermophila</i> após a purificação da enzima	Sabugo de milho	-	-	ND*	-	3025	(LI, L. <i>et al.</i> , 2006)
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO-4626 após a purificação da enzima	Palha de trigo, casca de arroz e fibra de coco	-	-	-	-	4511,75	(MEDEIROS, 2007)
<i>Penicillium echinulatum</i>	Celulose microcristalina	1,81	-	10,20	1,28	22,05	(MARTINS <i>et al.</i> , 2008)
<i>Penicillium</i> sp.	Celulose microcristalina	0,35	-	2,14	0,11	4,53	(CASTELLANOS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulose microcristalina	1,83	-	12,76	0,29	22,76	(MARTINS <i>et al.</i> , 2008)
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulose microcristalina	0,41	-	-	0,037	-	(CASTELLANOS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Aspergillus aculeatus</i> URM 4953	Bagaço de cana-de-açúcar cru	4,80	8,22	92,02	19,32	11186,22	Este trabalho
<i>Aspergillus niger</i> URM 5218	Bagaço de cana-de-açúcar residual de usina sucroalcooleira	1,82	7,10	67,23	41,23	12321,48	Este trabalho
<i>Aspergillus phoenicis</i> URM 4924	Bagaço de cana-de-açúcar residual de usina sucroalcooleira	1,77	16,44	13,00	68,23	14733,94	Este trabalho
<i>Aspergillus phoenicis</i> URM 4924	Bagaço de cana-de-açúcar cru	2,07	6,94	112,29	89,18	50271,29	Este trabalho

^a A: Celulases totais (FPase); B: Exoglucanase; C: Endoglucanase; D: Celobiase; E: Xilanase

* ND – não detectado

Referências

- ABDEL-FATTAH, A. F., OSMAN, M. Y. e ABDEL-NABY, M. A. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. **Chemical Engineering Journal**, v. 68, n.2-3, p.189-196, 1997.
- ARAI, T., KOSUGI, A., CHAN, H., KOUKIEKOLO, R., YUKAWA, H., INUI, M. e DOI, R. Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n.5, p.654-660, 2006.
- ARIFOGLU, N. e ÖGEL, Z. B. Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture *Torula thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n.8, p.560-569, 2000.
- BAILEY, M. J., BIELY, P. e POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p.257-270, 1992.
- BOTELLA, C., DIAZ, A., DE ORY, I., WEBB, C. e BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n.1, p.98-101, 2007.
- BUKHTOJAROV, F. E., USTINOV, B. B., SALANOVICH, T. N., ANTONOV, A. I., GUSAKOV, A. V., OKUNEV, O. N. e SINITSYN, A. P. Cellulase Complex of the Fungus *Chrysosporium lucknowense*: Isolation and Characterization of Endoglucanases and Cellobiohydrolases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n.5, p.542-551, 2004.
- CASTELLANOS, O. F., SINITSYN, A. P. e VLASENKO, E. Y. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma cellulases*. **Bioresource Technology**, v. 52, n.2, p.119-124, 1995.
- CHANDRA, M., KALRA, A., SANGWAN, N. S., GAURAV, S. S., DAROKAR, M. P. e SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 100, n.4, p.1659-1662, 2009.
- DE-PAULA, E. H., RAMOS, L. P. e DE OLIVEIRA AZEVEDO, M. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n.1, p.35-41, 1999.
- FLACHNER, B. e RECZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 18, n.3, p.303-307, 2004.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure applied chemistry**, v. 59, p.257-268, 1987.
- GUIMARÃES, L. H. S., PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C., MICHELIN, M., RIZZATTI, A. C. S., SANDRIM, V. C., ZANOELO, F. F., AQUINO, A. C. M. M., JUNIOR, A. B. e POLIZELI, M. D. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes

of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.474-480, 2006.

HECK, J. X., HERTZ, P. F. e AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.213-218, 2002.

LATIF, F., ASGHER, M., SALEEM, R., AKREM, A. e LEGGE, R. Purification and Characterization of a Xylanase Produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.45-50, 2006.

LI, L., TIAN, H., CHENG, Y., JIANG, Z. e YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n.6, p.780-787, 2006.

LI, Y. H., DING, M., WANG, J., XU, G. J. e ZHAO, F. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba -EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n.4, p.430-436, 2006.

MARTINS, L. F., KOLLING, D., CAMASSOLA, M., DILLON, A. J. P. e RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n.5, p.1417-1424, 2008.

MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA, R. e MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n.3, p.177-187, 2000.

MEDEIROS, L. A. **Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera.** (Tese de doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 124 p.

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

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P. e SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p.69-80, 2000.

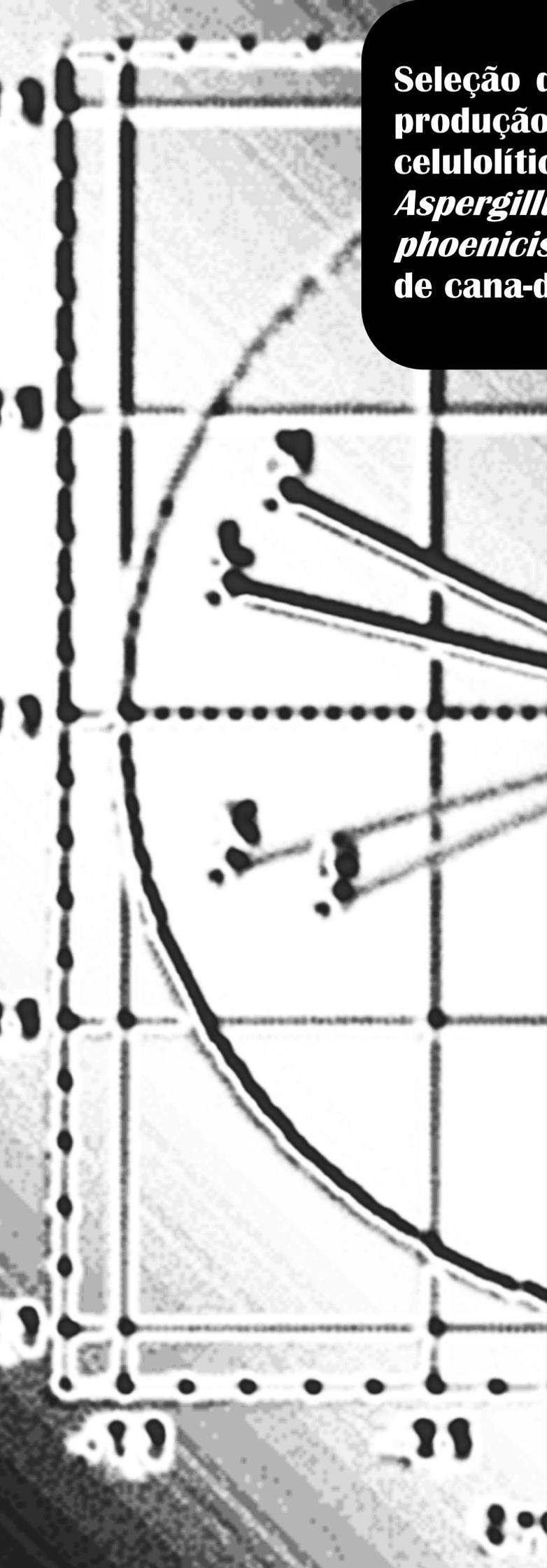
PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C., MICHELIN, M., BETINI, J., JORGE, J., TERENCEZI, H. e POLIZELI, M. D. L. T. D. M. Production of xylanase by Aspergilli using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p.149-155, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, J. A. D. S., CORREIA, M. J. e OLIVEIRA, N. T. D. Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. strain grown in media containing Carboximetilcellulose or microcrystalline cellulose. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.46, p. 333-337, 2003.

SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n.2, p.185-194, 2009.

SHEN, X. e XIA, L. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v. 39, n.11, p.1363-1367, 2004.



Seleção de variáveis que influenciam a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato

Capítulo 3

**A ser submetido à revista Applied Biochemistry and Biotechnology
ISSN 0273-2289
Qualis B1 – Ciências Biológicas I**

**Marilia Ribeiro Sales^{a*}
Rosemary Batista de Moura^a
Tatiana Souza Porto^a
Gorete Ribeiro de Macedo^b
Ana Lúcia Figueiredo Porto^a**

^a LABTECBIO – Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – 52171-900 Recife – PE – Brasil

^b Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal – RN – Brasil

***Autor para correspondência. Tel.: +55 81 33206345;
E-mail: mariliarsales@gmail.com
(Marilia R. Sales)**

Resumo

O uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de enzimas é uma alternativa economicamente vantajosa e estudos para elucidar quais variáveis influenciam a sua produção são requeridos para minimizar custos do processo. O objetivo da presente pesquisa foi selecionar variáveis que influenciam a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato através de planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} . Os resultados indicaram que todas as variáveis analisadas (pH inicial, tempo de cultivo, concentração do substrato, agitação, concentração do inóculo, temperatura, tipo do bagaço de cana-de-açúcar e linhagem de *Aspergillus*) foram estatisticamente significativas na produção de pelo menos uma das enzimas estudadas. As variáveis que foram determinadas como que influenciam a produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanase por *Aspergillus* foram: pH, tempo de cultivo, tipo de bagaço de cana-de-açúcar e linhagem de *Aspergillus*. As melhores condições para produção das enzimas foram: pH 6,0, tempo de cultivo de 168 horas, bagaço de cana-de-açúcar residual como substrato e *A. aculeatus* URM 4953 como linhagem. Foi constatado que *A. aculeatus* URM 4953 produziu todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase simultaneamente utilizando bagaço de cana-de-açúcar residual como substrato.

Palavras-chave: *Aspergillus*, complexo celulolítico, xilanase, bagaço de cana-de-açúcar, planejamento fatorial.

Abstract

The use of sugarcane bagasse as a substrate for enzyme production is economically advantageous and studies to elucidate which variables influence their production are required to minimize process cost. The objective of this research was to select variables that cause influence in the production of cellulolytic complex and xylanase by *Aspergillus aculeatus* URM 4953 and *A. phoenicis* URM 4924 using sugarcane bagasse as substrate through a 2^{8-4} fractional factorial design. The results indicated that all variables (initial pH, cultivation time, substrate concentration, agitation, inoculum concentration, temperature, sugarcane type and *Aspergillus* strain) were statistically significant in the enzymes production. The best conditions for enzymes production were pH 6.0, cultivation time of 168 hours, residual sugarcane bagasse as substrate and *A. aculeatus* URM 4953 as strain. The variables that were determined as influences to the production of cellulolytic complex and xylanase by *Aspergillus* were pH, cultivation time, sugarcane bagasse type and strain of *Aspergillus*. *A. aculeatus* URM 4953 produced all the complex cellulolytic enzymes and xylanase simultaneously using sugarcane bagasse as a substrate.

Keywords: *Aspergillus*, cellulolytic complex, xylanase, sugarcane bagasse, factorial design.

Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo fibroso do colmo remanescente do processo para obtenção do caldo de cana para produção de açúcar e álcool, apresentando-se como um dos mais abundantes subprodutos derivados de celulose, pode ser hidrolisado e o produto contém fase líquida que é constituída principalmente de glicose e xilose, dentre outros açúcares (1).

Ao longo dos anos, um grande número de microrganismos tem sido utilizado para cultivo utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Entretanto, fungos filamentosos tem sido mais utilizados pela quantidade de enzimas e enriquecimento protéico produzidos. Têm-se comprovado que a bioconversão do bagaço pode ser economicamente vantajosa em casos como o da produção de enzimas (2). O bagaço tem sido utilizado como substrato para produção de celulasas e xilanases por várias espécies de *Aspergillus* incluindo *A. niger* e *A. phoenicis* (2,3), no entanto são raros os trabalhos que incluem estudos sobre todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase (E.C. 3.2.1.8).

É sabido que o complexo celulolítico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes principais: as exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) ou celobiohidrolases, as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) ou carboximetilcelulasas e as celobiasas (E.C.3.2.1.21) ou β -glicosidasas, essas últimas não são consideradas como celulasas legítimas, mas desempenham um importante papel na hidrólise da celulose (4).

De acordo com o sinergismo endo-exo, essas enzimas hidrolisam a celulose da seguinte forma: exoglucanases funcionam como exo-enzimas agindo no final das cadeias, liberando celobiose como principal produto; endoglucanases agem de forma aleatória ao longo da cadeia, produzindo novos sítios para ação das exoglucanases e as

β -glicosidases completam o processo através da hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos curtos à glicose (4). Foram descritas também as celulases totais, esse sistema hidroliza sinergicamente a celulose e consiste de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, (5). As celulases totais também são conhecidas como enzimas do papel de filtro (FPase – *Filter Paper Enzyme*) (6).

As xilanases possuem um importante papel na hidrólise do bagaço de cana por hidrolisar xilana, polissacarídeo formado por unidades monoméricas de xilose, que é um dos principais constituintes da hemicelulose (7,8).

A produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanase utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato pode tornar esse substrato viável, reduzindo o custo da produção de enzimas. No entanto, as condições operacionais para a fermentação precisam ser otimizadas para a produção máxima na tecnologia industrial. O método clássico de otimização compreende em mudar uma variável fixa, e manter as demais em certo nível, o que se torna trabalhoso e consome tempo desnecessário, especialmente para um grande número de variáveis, como também podem levar a resultados incertos e conclusões imprecisas. Essas limitações podem ser superadas utilizando planejamento fatorial para assim considerar os efeitos dos fatores simultaneamente, otimizando a atividade da enzima e realizando um número mínimo de experimentos (9,10). Dessa forma, planejamentos fatoriais tem sido utilizados como técnicas confiáveis para estudo da influência de múltiplos fatores na produção de enzimas (11).

O objetivo do trabalho foi verificar a influência de variáveis (pH, concentração do substrato e inóculo, linhagem de *Aspergillus*, tipo de bagaço de cana-de-açúcar, tempo de cultivo, agitação e temperatura) na produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM

4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato através de planejamento fatorial fracionário.

Metodologia

Microrganismo e condições de cultivo

As linhagens de *Aspergillus* foram obtidas da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil: *A. aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924. As culturas foram mantidas em tubos contendo ágar Extrato de Malte esterilizado e incubados a 30°C por 30 dias.

O bagaço de cana-de-açúcar residual (BCR) procedente do processo industrial para obtenção do caldo de cana-de-açúcar e o bagaço de cana-de-açúcar cru (BCC) foram cedidos pela Usina Ipojuca, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. A principal diferença entre o BCR e o BCC é que o primeiro foi processado industrialmente e é resíduo da indústria sucroalcooleira enquanto que o BCC foi obtido pelo método da compressão em uma moenda elétrica doméstica.

Ambos os bagaços (BCC e BCR) foram lavados com água potável e posteriormente com água destilada, seco e moído em processador de alimentos doméstico (Walita Master Plus). O meio de cultivo utilizado para a produção do complexo celulolítico apresentou a seguinte composição: 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 0,13 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,03 g/L $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; 0,03 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/L CaCl_2 ; 0,5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,156 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,14 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,14 mg/L CoCl_2 (4) e BCR ou BCC como substrato nos níveis experimentais (Tabela 1).

O inóculo foi obtido de uma cultura crescida em Ágar Extrato de Malte por 7 dias para ambas linhagens de *Aspergillus*. Os esporos foram suspensos em solução de Tween 80 (0,01%) e inoculados em 50mL do meio de cultivo contido em Erlenmeyers

com capacidade para 250 mL de modo a obter concentração final de acordo com os níveis desta variável experimental. Os cultivos foram mantidos em agitador orbital a diferentes rotações, temperatura e tempo de cultivo (Tabela 1). Após esse período, o cultivo foi centrifugado (5000 . g) e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático.

Atividades enzimáticas

O extrato enzimático foi usado para determinar as atividades das celulases totais, endoglucanases, exoglucanase, celobiase e de xilanase.

A atividade de celulases totais foi determinada utilizando papel de filtro Whatmann n.1 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) como substrato, a atividade de endoglucanase foi determinada usando carboximetilcelulose (CMC) e a atividade de celobiase foi ensaiada utilizando kit comercial de glicose oxidase (Labtest, Minas Gerais, Brasil) (6). A atividade de exoglucanase foi mensurada pela modificação do método de Mawadza *et al.* (12), incubando 250 µL do extrato enzimático com 500 µL de solução 1% (p/v) de celulose microcristalina (Sigmacell type 50, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) em solução tampão citrato (50 mM, pH 5,0) a 50°C durante 2 horas. A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com o método descrito por Bailey *et al* (13), usando xilana de endoderma de aveia (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) como substrato. Por o meio de cultivo conter açúcares redutores que interfeririam no resultado das atividades enzimáticas, o controle foi realizado pela inativação da enzima pela adição do reativo DNS (14) antes de incubação da enzima com seu respectivo substrato.

Para todas as atividades enzimáticas uma unidade foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose ou xilose por minuto de reação, conforme enzima ensaiada. As atividades enzimáticas foram expressas em

atividade volumétrica (U/mL) e atividade relativa (% do ensaio em que a enzima apresentou maior atividade) para comparação dos resultados entre as enzimas estudadas.

Influência de variáveis na produção do complexo celulolítico e da xilanase

Foram determinados os níveis de 8 variáveis na produção do complexo celulolítico: pH, tempo de cultivo, concentração do substrato (%p/v), agitação (rpm), concentração do inóculo, temperatura, tipo do bagaço de cana-de-açúcar e linhagens de *Aspergillus*. Estas variáveis foram analisadas por um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} , com três repetições no ponto central. Os níveis das variáveis experimentais estão listados na Tabela 1. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente usando o programa Statistica 8.0 (Statsoft INC, 2008). Para análise estatística dos resultados foram utilizadas como variáveis resposta as atividades relativas das enzimas do complexo celulolítico (celulases totais, exoglucanase, endoglucanase, celobiase) e da xilanase.

Resultados e discussão

Os bagaços de cana-de-açúcar cru (BCC) e residual (BCR) utilizados neste estudo apresentaram-se como alternativas para a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924.

A fim de obter níveis mais elevados de produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *A. aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 foi necessário estudar e variar consideravelmente as condições de cultivo. A seleção das variáveis foi realizada baseada em dados já descritos na literatura e foram escolhidas: o efeito do tipo dos substratos e sua concentração para produção das enzimas, do pH, da

concentração do inóculo, do tempo, da agitação e da temperatura do cultivo. Foi observada influência significativa na produção das enzimas estudadas.

O planejamento fatorial fracionário realizado foi 2^{8-4} de resolução IV, no qual os efeitos principais não se confundem com as interações de dois fatores, mas, estas, por sua vez, confundem-se entre si (15). As atividades relativas das enzimas do complexo celulolítico e da xilanase nos ensaios relativos ao planejamento fatorial fracionário para produção de complexo celulolítico por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato estão apresentados na Tabela 2.

A atividade de celulases totais (L) não foi detectada em um ensaio e as mais altas atividades demonstradas foram de 0,45 e 0,27 UI/mL, essas foram obtidas no menor nível de pH (6,0) e no maior nível estudado de tempo de cultivo (168 horas) e utilizando BCR como substrato para a produção da enzima por *A. aculeatus* URM 4953 (Tabela 2). Todas as variáveis foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), exceto a concentração de substrato, porém as variáveis pH (X_1), linhagem (X_4), tipo de bagaço (X_5) e tempo de cultivo (X_6) apresentaram maiores valores de efeitos (Tabela 3).

Dedavid e Silva *et al.* (11), otimizando a produção de celulases totais por *Aspergillus phoenicis* utilizando resíduo de uva como substrato, e para os níveis estudados de concentração de substrato (0,5, 1 e 1,5% p/v) encontraram atividade máxima de 0,11 UI/mL com 1% de resíduo. Para o uso de resíduo de uva a concentração de substrato foi um efeito estatisticamente significativo (11), no entanto, para a produção de celulases totais utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato por *Aspergillus phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4952 dentre as oito variáveis analisadas a concentração de substrato foi a única variável que não apresentou efeito

significativo e apresentou cerca de 4 vezes mais atividade que *A. phoenicis* descrito por Dedavid e Silva *et al.* (11) no maior nível de produção da enzima.

Alam *et al.*, (9) realizando otimização das condições do processo para a produção de celulase por *Trichoderma harzianum* através bioconversão do estado líquido de lodo de esgoto doméstico analisaram as variáveis temperatura, concentração de substrato, pH, inóculo e agitação, os quais encontraram atividade máxima de 6,9 UI/mL para os níveis: 32,5°C, 0,75% de concentração de substrato, pH inicial 5,0, 2% de inóculo e 175 rpm. A temperatura, o pH inicial e o inóculo foram efeitos estatisticamente significativos, enquanto que a concentração de substrato não foi, o que corrobora com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Para endoglucanase (N) a atividade variou de 0,04 a 0,60 UI/mL. Os ensaios que apresentaram maiores resultados de atividade da enzima se assemelham por estarem com os maiores níveis de agitação (180 rpm) e tempo de cultivo (168 horas) e menor nível de temperatura (30°C) (Tabela 2), além disso, todas as variáveis foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela 3). Tal fato sugere que além de serem utilizados os níveis citados anteriormente, deve ser usado o BCR como substrato para produção de endoglucanase por *A. aculeatus* URM 4953, no menor nível estudado para pH (6,0) e os maiores níveis para concentração do substrato (1,5% p/v) e concentração do inóculo (10^4).

A produção de endoglucanase por *A. phoenicis* utilizando resíduo de uva como substrato apresentou a concentração de substrato como efeito positivo significativo ($p < 0,05$) a 1,5% (p/v), indicando que o maior nível da variável favoreceu a produção da enzima (11). Evento similar foi encontrado neste trabalho uma vez que, para a produção dessa enzima dentre os níveis de concentração de substrato estudados (0,5, 1 e 1,5%), o efeito dessa variável também apresentou-se positivo.

Os efeitos das variáveis na produção de exoglucanase (E) demonstraram que a linhagem *A. aculeatus* URM 4953 apresentou-se mais promissora para produção de dessa enzima utilizando como substrato o BCR. As variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram: pH, concentração de substrato e temperatura de cultivo. Essas duas últimas tiveram efeitos positivos, ou seja, quanto maior a concentração de substrato e maior a temperatura de cultivo, maior foi a atividade enzimática. Enquanto que o pH teve efeito negativo, ou seja, quanto menor o pH inicial do meio, maior foi a produção enzimática, nos níveis estudados (Tabela 3). A mais alta atividade de exoglucanase foi de 0,17 U/mL no pH 6,0, concentração de substrato 1,5% e temperatura de cultivo a 40°C.

A atividade de celobiase (B) variou entre 0,05 e 6,42 UI/mL. Os resultados mais elevados de atividade de celobiase foram obtidos no menor nível de pH (6,0) e tempo de cultivo (72 horas), utilizando BCC como substrato para a produção da enzima por *A. phoenicis* URM 4924 (Tabela 2). As variáveis pH (X_1), linhagem (X_4), tipo de bagaço (X_5) e tempo de cultivo (X_6) foram significativas para a atividade de celobiase a uma probabilidade de 95% (Tabela 3). Wen *et al.* (16) produzindo celobiase por *A. phoenicis*, utilizando chorume de curral como substrato, encontraram como efeitos estatisticamente significativos o pH inicial do meio de 5,1 e a temperatura de 28°C para o cultivo. No presente trabalho, o pH inicial do meio também foi estatisticamente significativos ($p < 0,05$), como um efeito negativo, como no caso do citado trabalho.

A atividade de xilanase (X) mais elevada foi de 30,05 U/mL. Os valores mais elevados de atividade dessa enzima foram apresentados no maior nível da variável agitação (180 rpm) utilizando BCC como substrato para produção de xilanase (Tabela 2), em contrapartida a variável agitação (X_7) foi a única que apresentou-se como um efeito positivo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Cao *et al.*(17) otimizando a produção de xilanase por *Aspergillus niger* AN-13 encontraram como melhores níveis das variáveis experimentais tempo de cultivo de 48 horas, pH inicial do meio igual 8,0 e 5% de substrato (farelo de trigo), no entanto nenhuma variável foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Bocchini *et al.* (18) reportaram que o tempo de cultivo e a interação entre o tempo de cultivo e a concentração de xilana como substrato possuíram um efeito significativo na produção de xilanase por *Bacillus circulans* D1, os quais obtiveram atividade variando de 3,99 e 19,39 U/mL. Heck *et al.* (19) concluíram que a mudança do pH e da temperatura podem melhorar a produção de xilanase consideravelmente. Os resultados apresentados por esses autores não corroboram com o presente trabalho, apesar de ter sido estudado o efeito das variáveis concentração de substrato, pH, temperatura e tempo de cultivo essas não apresentaram-se estatisticamente significativas ($p < 0,05$), tendo a atividade de xilanase nos mais elevados níveis produzidos (82, 94 e 100%) variado dentre os níveis mínimo e máximo para essas variáveis (Tabela 2).

Diversas linhagens e espécies de microrganismos tem sido estudadas para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico em diferentes fontes de carbono e esse fator mostrou-se ser importante para produção de celobiase (β -glicosidase) por *Trichoderma reesei*, uma das espécies mais estudadas para produção de enzimas celulolíticas. No entanto, a produção de β -glicosidase por *Trichoderma* não é superior à produção por *Aspergillus phoenicis* o que justificaria o uso de culturas mistas para a produção mais eficiente de complexos celulolíticos (11).

No presente trabalho também foi investigada a produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por cultura mista de *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 (pontos centrais), no entanto os ensaios com cultura mista apresentaram cerca de 10 vezes menos atividade que os melhores ensaios estudados

para as culturas isoladas. Logo, o cultivo misto de *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase em índices elevados não é recomendado.

Para a hidrólise da celulose a monômeros de carboidrato é necessário o sinergismo entre todas as enzimas do complexo celulolítico (12), o que nos leva a investigar dentre os ensaios com uma única linhagem aquele em que foram produzidas maiores quantidades de todas as enzimas do complexo celulolítico simultaneamente.

A segunda parte dessa pesquisa foi analisar estatisticamente os componentes principais da atividade das enzimas do complexo celulolítico e da xilanase. A análise de componentes principais (PCA - do inglês *Principal Component Analysis*) é um método de análise multivariada utilizado para projetar dados n-dimensionais em um espaço de baixa dimensão, normalmente duas ou três. Isso é feito através do cálculo de componentes principais obtidas fazendo-se combinações lineares das variáveis originais. PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras (no caso deste trabalho, dos ensaios), enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings* (20).

Através da PCA também é possível saber a porcentagem da variância explicada pelas PCs. A Primeira Componente Principal (PC1) é o eixo que descreve a variância máxima possível no espaço multidimensional original, e o segundo

componente principal (PC2) é ortogonal ao PC1 e descreve a variância máxima que não foi descrita no PC1 (21). Assim, a PC1 é o vetor próprio associado ao valor próprio mais elevado, e a PC2 é o vetor próprio correspondente ao segundo valor próprio mais elevado.

A PC1 foi responsável pela explicação de 46,80% da variação dos resultados e a PC2 representou 22,38%, o que correspondeu no plano Cartesiano (1×2) a 69,18% da variação dos resultados totais. Na PC1, a combinação das enzimas do complexo celulolítico e xilanase apresentaram peso negativo. Na PC2 os resultados foram contrastantes: celulasas totais (L) e endoglucanase (N) com peso positivo e xilanase (X), exoglucanase (E) e celobiase (B) com peso negativo. Isto significa que as enzimas do complexo celulolítico e xilanase tendem a ter resultados de peso negativo, especialmente porque a PC1 apresenta as enzimas com resultados negativos e explica 46,80% dos resultados (Figura 1).

Na projeção plana multivariada dos ensaios (*scores* dos ensaios) (Figura 2) é possível observar que o ensaio 3 está posicionado no quadrante inferior esquerdo (peso negativo para para PC1 e PC2) e o 5 no quadrante superior direito (peso negativo para PC1 e positivo para PC2) e são os mais distantes do eixo de intersecção do PC1 com a PC2, o que indica que se destacaram na produção enzimática, pois estão localizados na mesma posição das variáveis na projeção plana multivariada das variáveis (*loadings* das variáveis) (Figura 1). Correlacionando dos dados dos *scores* e *loadings* observa-se também que o ensaio 5 apresentou maiores resultados para celulasas totais (L) e endoglucanase (N) que o ensaio 3, esse por sua vez apresentou maiores resultados para xilanase (X) e exoglucanase (E) que o ensaio 5, o que pode ser comprovados pela análise da atividade relativa das enzimas (Tabela 2).

Dessa forma, os resultados obtidos no planejamento estatístico fracionário demonstraram que dentre os ensaios realizados, os que apresentaram atividades mais elevadas para todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase, simultaneamente, foram as dos ensaios 3 e 5, que possuem como similaridade pH 6,0, tempo de cultivo de 168 horas, BCR como substrato para produção das enzimas por *A. aculeatus* URM 4953. As variáveis que foram determinadas como que influenciam a produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanase por *Aspergillus* foram: pH, tempo de cultivo, tipo de bagaço de cana-de-açúcar e linhagem de *Aspergillus*. A linhagem *A. aculeatus* URM 4953 demonstrou ser uma alternativa para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar, um substrato de baixo custo que propiciou o crescimento fúngico e a produção enzimática.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES por conceder bolsa de estudo de pós-graduação, ao CNPq pelo apoio financeiro através do projeto n.º 554740/2006-0 – Desenvolvimento de bioprocessos para agregação de valor a resíduos indústrias do Nordeste e pela bolsa ITI-1A processo n.º 18100/8/2007-6, à Usina Ipojuca S/A por prover o bagaço de cana-de-açúcar usado na pesquisa, ao Prof. Dr. Benício Barros Neto pelo auxílio nas análises estatísticas e à Sra. Ieda Cabral pela assistência técnica.

Tabela 1 – Matriz estatística do planejamento fatorial dos níveis das variáveis experimentais para produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924.

Variáveis		-1	Ponto Central	+1
pH	X_1	6	7,0	8
Concentração de substrato (%p/v)	X_2	0,5	1,0	1,5
Concentração do inóculo (esporos/mL)	X_3	10^2	10^3	10^4
Linhagem	X_4	<i>A. phoenicis</i>	Cultura mista	<i>A. aculeatus</i>
Tipo do bagaço de cana-de-açúcar	X_5	BCC ^a	Mistura 1:1	BCR ^b
Tempo de cultivo (horas)	X_6	72	120	168
Agitação (rpm)	X_7	0	90	180
Temperatura (°C)	X_8	30	35	40

^a Bagaço de cana-de-açúcar cru

^b Bagaço de cana-de-açúcar residual

Tabela 2 – Distribuição dos níveis das variáveis experimentais para produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase com as respostas da atividade relativa das enzimas após cultivo de *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *A. phoenicis* URM 4924 utilizando bagaço de cana-de-açúcar cru (BCC) e residual (BCR) como substrato.

Ensaio	Fatores Experimentais ^a								Atividade relativa das enzimas (%) ^b				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	L (%)	E (%)	N (%)	B (%)	X (%)
1	6	0,5	10 ²	<i>A. phoenicis</i>	BCC	72	0	30	9	13	13	100	8
2	8	0,5	10 ²	<i>A. aculeatus</i>	BCR	72	180	40	10	14	13	3	9
3	6	1,5	10 ²	<i>A. aculeatus</i>	BCR	168	0	40	62	100	20	20	66
4	8	1,5	10 ²	<i>A. phoenicis</i>	BCC	168	180	30	16	19	97	2	82
5	6	0,5	10 ⁴	<i>A. aculeatus</i>	BCR	168	180	30	100	18	100	6	52
6	8	0,5	10 ⁴	<i>A. phoenicis</i>	BCC	168	0	40	5	9	7	1	6
7	6	1,5	10 ⁴	<i>A. phoenicis</i>	BCC	72	180	40	9	16	41	76	94
8	8	1,5	10 ⁴	<i>A. aculeatus</i>	BCR	72	0	30	9	16	14	1	13
9	6	0,5	10 ²	<i>A. aculeatus</i>	BCC	168	180	40	10	16	14	22	48
10	8	0,5	10 ²	<i>A. phoenicis</i>	BCR	168	0	30	0	0	13	3	0
11	6	1,5	10 ²	<i>A. phoenicis</i>	BCR	72	180	30	26	26	32	3	31
12	8	1,5	10 ²	<i>A. aculeatus</i>	BCC	72	0	40	8	7	9	1	6
13	6	0,5	10 ⁴	<i>A. phoenicis</i>	BCR	72	0	40	6	15	15	10	12
14	8	0,5	10 ⁴	<i>A. aculeatus</i>	BCC	72	180	30	25	37	43	4	100
15	6	1,5	10 ⁴	<i>A. aculeatus</i>	BCC	168	0	30	10	0	57	3	8
16	8	1,5	10 ⁴	<i>A. phoenicis</i>	BCR	168	180	40	13	19	13	1	7
17	7	1,0	10 ³	Cultura mista	Mistura 1:1	120	90	35	7	7	14	4	10
18	7	1,0	10 ³	Cultura mista	Mistura 1:1	120	90	35	5	13	10	10	11
19	7	1,0	10 ³	Cultura mista	Mistura 1:1	120	90	35	8	14	13	8	10

^a X₁: pH; X₂: Concentração do substrato (%p/v); X₃: Concentração final de esporos (esporos/mL); X₄: Linhagem; X₅: Tipo de bagaço (BCC – bagaço de cana-de-açúcar cru, BCR – bagaço de cana-de-açúcar residual); X₆: Tempo de cultivo (horas); X₇: Agitação (rpm); X₈: Temperatura (°C).

^b L: Celulase total; E: Exoglucanase; N: Endoglucanase; B: Celobiase; X: Xilanase

Tabela 3 – Efeitos das variáveis na produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase.

Variáveis		L	E	N	B	X
Média		17,79	18,89	28,32	14,63	30,16
pH	X ₁	-18,25	-10,38	-10,38	-28,00	-12,00
Concentração de substrato (%p/v)	X ₂	-1,50	10,13	8,13	-5,25	9,00
Concentração do inóculo	X ₃	4,50	-8,13	9,88	-6,50	5,25
Linhagem	X ₄	18,75	11,38	4,88	-17,00	7,75
Tipo do bagaço	X ₅	16,75	11,38	-7,62	-20,25	-20,25
Tempo de cultivo	X ₆	14,25	4,63	17,62	-17,50	-0,50
Agitação (rpm)	X ₇	12,50	0,63	25,63	-2,75	38,00
Temperatura do cultivo (°C)	X ₈	-9,00	8,38	-29,63	1,50	-5,75

Em negrito efeitos estatisticamente significativos a $p < 0,05$

Legenda: L – Celulase, E – Exoglucanase, N – Endoglucanase, B – Celobiase, X - Xilanase

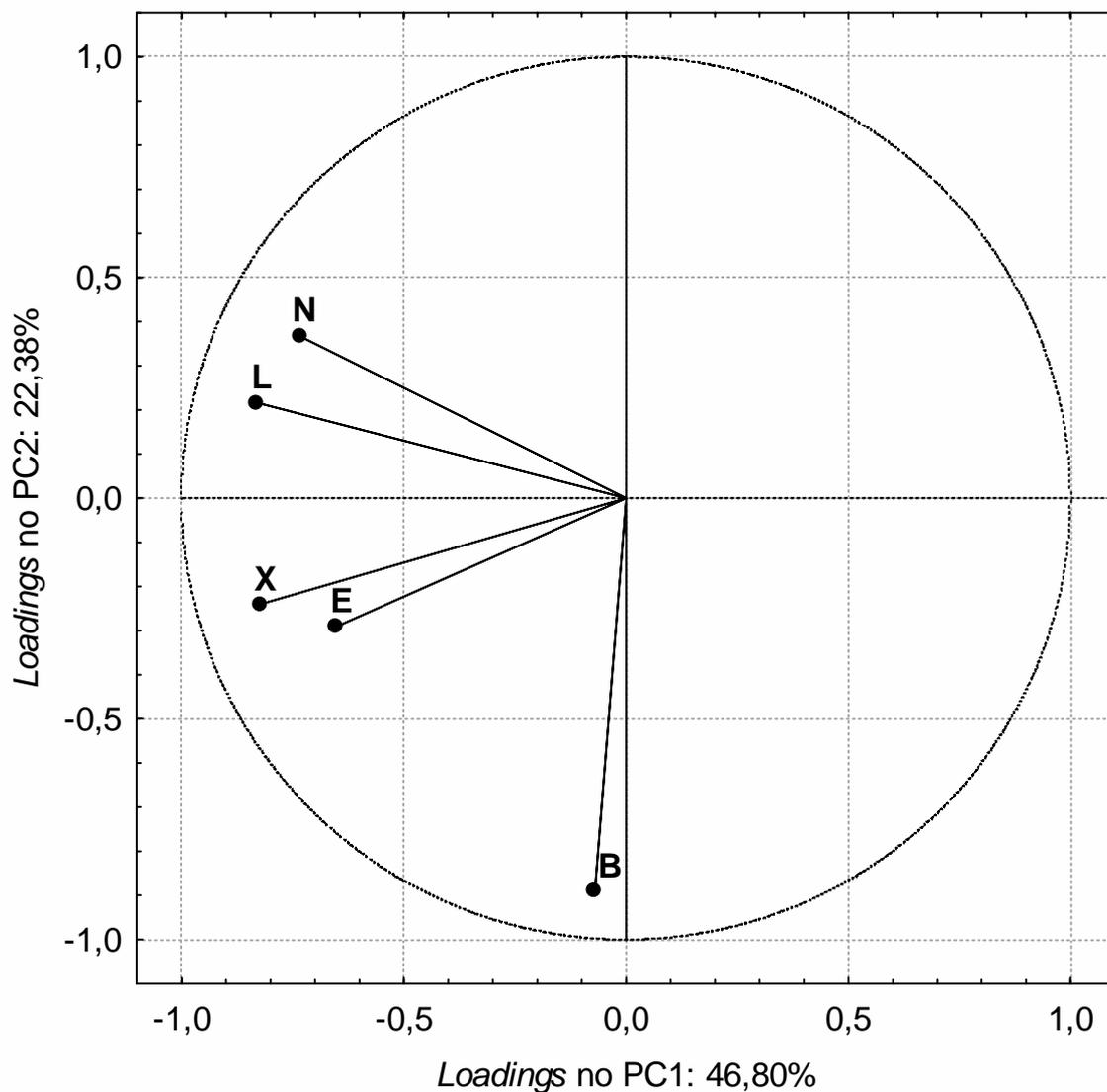


Figura 1 – Projeção plana multivariada das variáveis para a atividade relativa (%) de celulasas totais (L), exoglucanase (E), endoglucanase (N), celobiase (B) e xilanase (X). *Loadings* dos primeiro e segundo componentes principais. O plano formado por estes componentes reproduzem 69,18% da informação original.

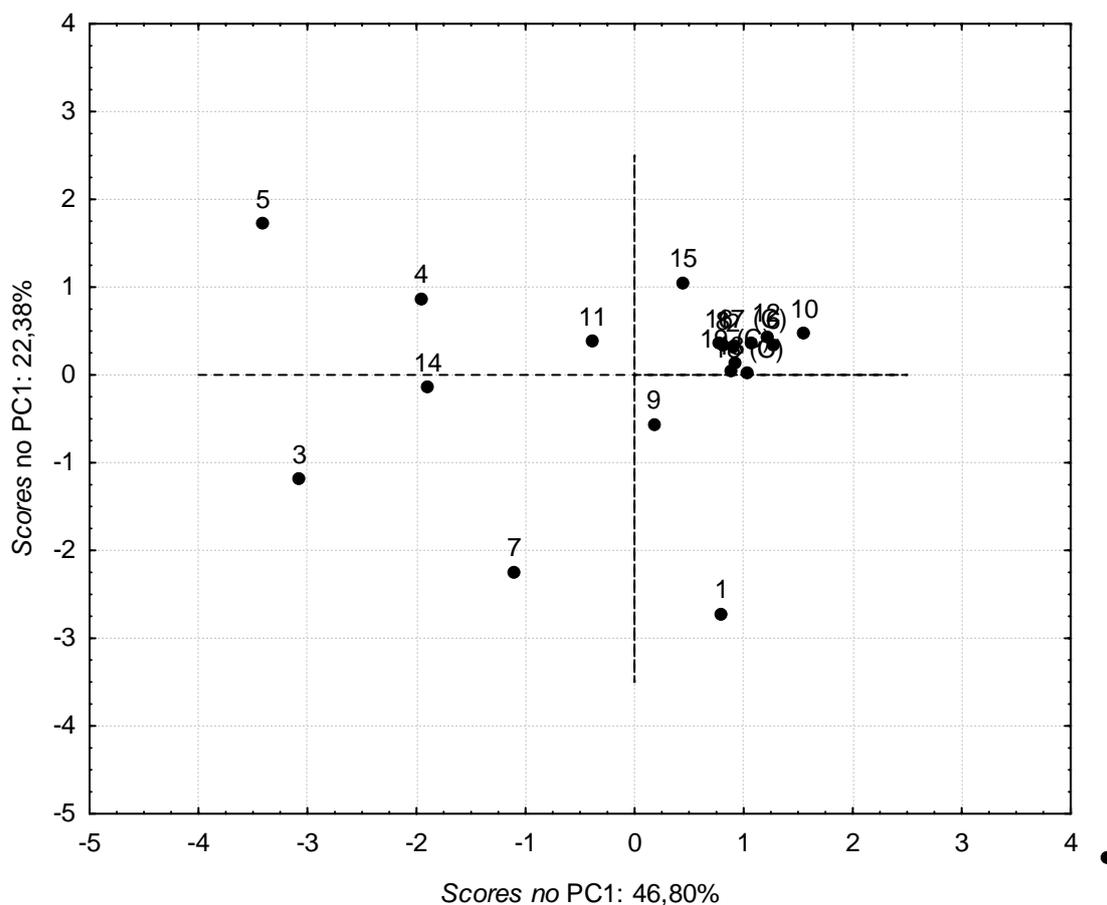
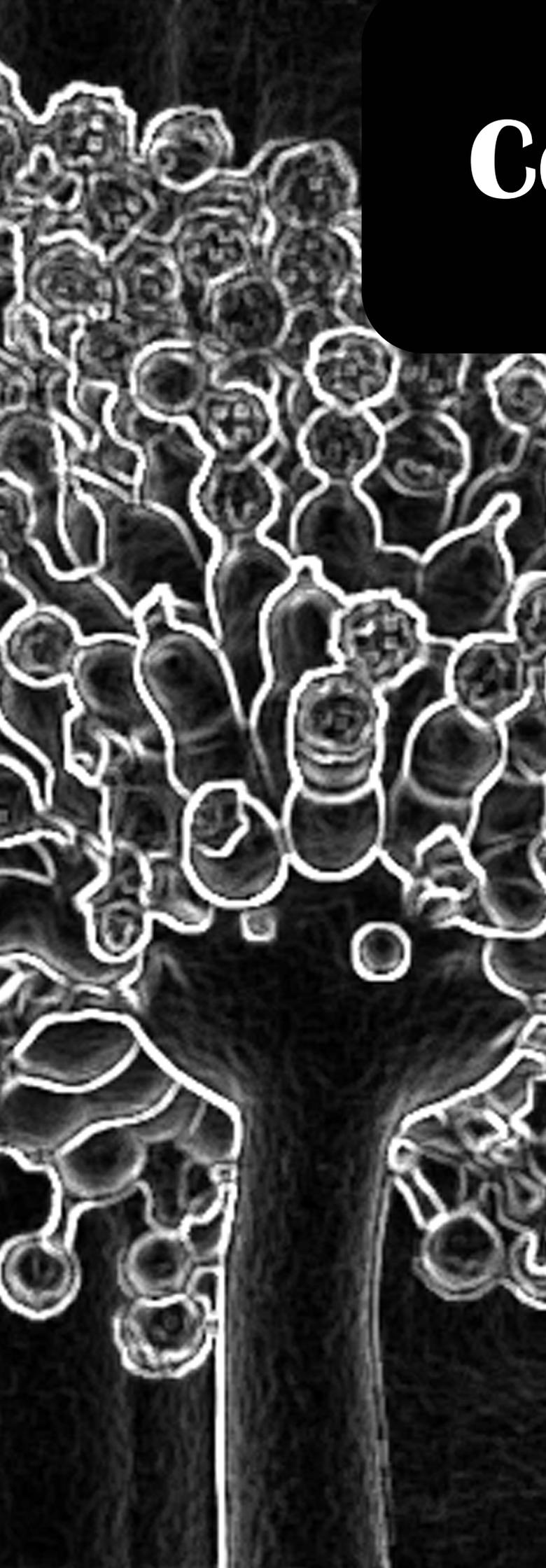


Figura 2 – Projeção plana multivariada dos ensaios para a atividade relativa de celulases totais, exoglucanase, endoglucanase, celobiase e xilanase. Scores dos ensaios no plano formado pelos dois principais componentes.

Referências Bibliográficas

1. Bocchini, D. A., Oliveira, O. M. M. F., Gomes, E., Silva, R. D. (2005) *Process Biochemistry*. 40, 3653-3659.
2. Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T. (2000) *Bioresource Technology*. 74, 69-80.
3. Sánchez, C. (2009) *Biotechnology Advances*. 27, 185-194.
4. Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A. J. P., Ramos, L. P. (2008) *Bioresource Technology*. 99, 1417-1424.
5. Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. (2006) *Biotechnology Advances*. 24, 452-481.
6. Ghose, T. K. (1987) *Pure applied chemistry*. 59, 257-268.
7. Dumitriu, S. *Polisaccharides: structure, diversity and functional versatility*. (2005) Marcel Dekker: New York.
8. Heck, J. X., Hertz, P. F., Ayub, M. A. Z. (2002) *Brazilian Journal of Microbiology*. 33, 213-218.
9. Alam, M. Z., Muyibi, S. A., Wahid, R. (2008) *Bioresource Technology*. 99, 4709-4716.
10. Heck, J. X., Flôres, S. H., Hertz, P. F., Ayub, M. A. Z. (2005) *Process Biochemistry*. 40, 107-112.
11. Dedavid e Silva, L., Cortez Lopes, F., Terra Silveira, S., Brandelli, A. (2009) *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152, 295-305.
12. Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B. (2000) *Journal of Biotechnology*. 83, 177-187.
13. Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K. (1992) *Journal of Biotechnology*. 23, 257-270.
14. Miller, G. L. (1959) *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
15. Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. (2003) Editora UNICAMP: Campinas.
16. Wen, Z., Liao, W., Chen, S. (2005) *Process Biochemistry*. 40, 3087-3094.
17. Cao, Y., Meng, D.J., Lu, J., Long, J. (2008) *African Journal of Biotechnology*. 7, 631-638.
18. Bocchini, D. A., Alves-Prado, H. F., Baida, L. C., Roberto, I. C., Gomes, E., Da Silva, R. (2002) *Process Biochemistry*. 38, 727-731.
19. Heck, J. X., Flôres, S. H., Hertz, P. F., Ayub, M. A. Z. (2006) *Bioresource Technology*. 97, 1902-1906.
20. Ferreira, E. C., Rodrigues, S. H. B. G., Ferreira, M. M. C., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A. (2002) *Eclética Química*. 27, 77-90.
21. Lyra, E., Moreira, K., Porto, T., Carneiro da Cunha, M., Paz Júnior, F., Neto, B., Lima-Filho, J., Cavalcanti, M., Converti, A., Porto, A. (2009) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25, 1499-1504.

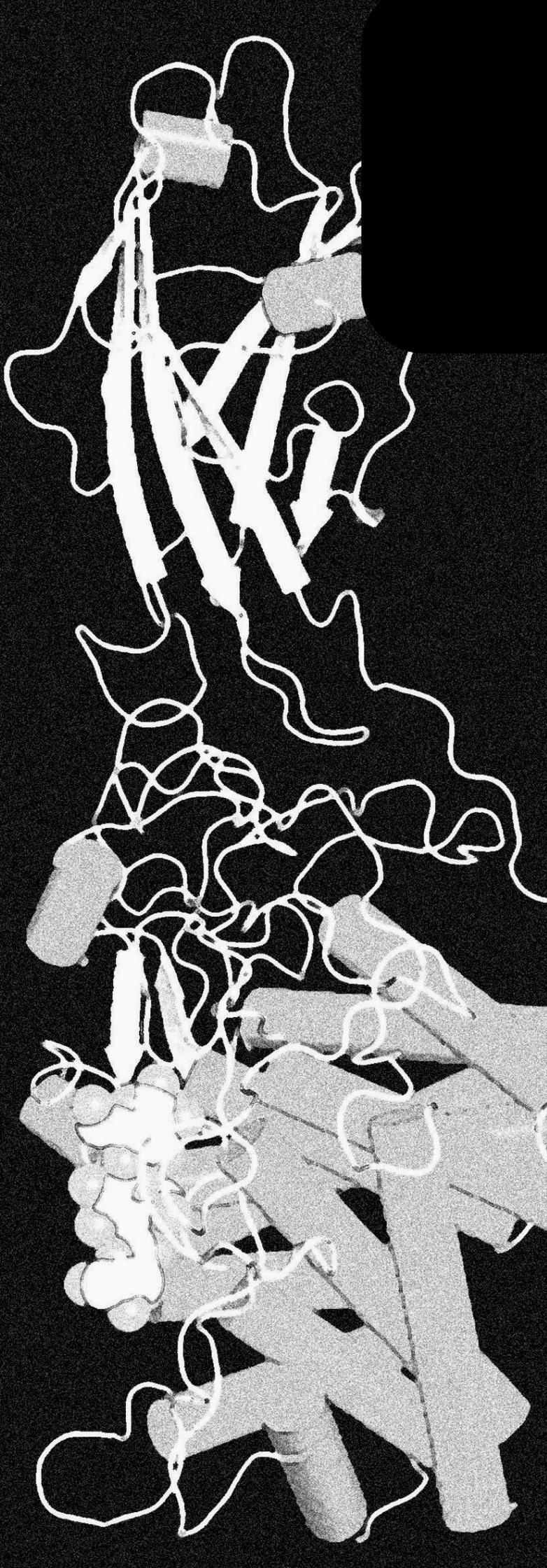
Conclusão



CONCLUSÃO

- ✓ Todas linhagens de *Aspergillus* estudadas produziram enzimas do complexo celulolítico e xilanase.
- ✓ *A. phoenicis* URM 4924 e *A. aculeatus* URM 4953 são alternativas promissoras para produzir enzimas do complexo celulolítico e a xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar residual e cru como substrato em cultivo submerso.
- ✓ O BCC foi melhor indutor para produção de celulases totais e xilanase, enquanto que o BCR induziu melhor a produção de exoglucanase, já a produção de endoglucanase e celobiase nos níveis mais elevados foi independente do tipo de bagaço de cana-de-açúcar utilizado.
- ✓ As melhores condições para produção das enzimas do complexo celulolítico e da xilanase foram: pH 6,0, tempo de cultivo de 168 horas, bagaço de cana-de-açúcar residual como *A. aculeatus* URM 4953 como linhagem ($P < 0,05$).
- ✓ A linhagem *A. aculeatus* URM 4953 demonstrou ser uma alternativa para a produção de todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanase utilizando bagaço de cana-de-açúcar, um substrato de baixo custo que propiciou o crescimento fúngico e a produção enzimática.

Anexos



ANEXO 1

Trabalhos publicados anais de eventos

SALES, M. R. ; MOURA, R. B. ; SILVA, M. F. ; MACEDO, G. R. ; LIMA FILHO, J. L. ; PORTO, A. L. F . **Cellobiase Production by *Aspergillus* spp. on Low Cost Substrate.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2009, Natal.

SILVA, M. F. ; NASCIMENTO, J. C. S ; SALES, M. R. ; PORTO, T. S. ; MACEDO, G. R. ; PORTO, A. L. F . **Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Xilanase produzida por *Aspergillus phoenicis* URM 4924.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2009, Natal.

SILVA, M. F. ; NASCIMENTO, J. C. S ; SALES, M. R. ; PORTO, T. S. ; MACEDO, G. R. ; PORTO, A. L. F . **EXTRAÇÃO DA XILANASE DE *Aspergillus phoenicis* URM 4924 POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS UTILIZANDO PEG/FOSFATO.** In: VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2009, Recife.

Trabalhos apresentados em eventos

SALES, M. R. ; MOURA, R. B. ; SILVA, M. F. ; MACEDO, G. R. ; LIMA FILHO, J. L. ; PORTO, A. L. F . **Cellobiase Production by *Aspergillus* spp. on Low Cost Substrate.** In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2009, Natal.

SILVA, M. F. ; NASCIMENTO, J. C. S ; SALES, M. R. ; PORTO, T. S. ; MACEDO, G. R. ; PORTO, A. L. F . **Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Xilanase produzida por *Aspergillus phoenicis* URM 4924.** In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2009, Natal.

SALES, M. R. **Deteção e estudo da produção de complexo celulolítico em amostras de *Aspergillus* utilizando cana-de-açúcar como substrato.** 2008. I SICBIO - Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas, UFPE.

ANEXO 2

Instruções aos autores – Revista Agropecuária Brasileira



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

ISSN 0100-204X *versão
impressa*

ISSN 1678-3921 *versão online*

Escopo e política editorial

A revista **Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)** é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas, Novas Cultivares e Revisões a convite do Editor.

Forma e preparação de manuscritos

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a 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 em relação 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 é aplicado somente 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.

Forma e preparação de manuscritos

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.

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 Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Organização do Artigo Científico

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, Materials 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, Materiales 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.

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.

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 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, os resultados e a conclusão.

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.

Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus (http://www.fao.org/aims/ag_intro.htm) ou no Índice de Assuntos da base SciELO (<http://www.scielo.br>).

Introdução

A palavra Introdução deve ser centralizada 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 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.

Resultados e Discussão

A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, 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 em relação aos apresentados por outros autores.

Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.

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 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.

Devem ser 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 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 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 a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

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

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.cpaio.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.

Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

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

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, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as 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 nos programas Word, Excel ou Corel Draw, 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

Envio de manuscritos

Os manuscritos devem ser submetidos conforme instruções contidas no endereço: <http://www.sct.embrapa.br/seer>

© 2009 Embrapa Informação Tecnológica - Pesquisa Agropecuária Brasileira

Caixa Postal 040315
70770-901 Brasília, DF Brasil
Tel.: +55 61 273-9616
Fax: + 55 61 340-5483



pab@sct.embrapa.br

ANEXO 3

Instruções aos autores – Applied Biochemistry and Biotechnology



springer.com



Applied Biochemistry and Biotechnology

Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology

Editor-in-Chief: Ashok Mulchandani

ISSN: 0273-2289 (print version)

ISSN: 1559-0291 (electronic version)

Journal no. 12010

Humana Press

[Online version available](#)

[Online First articles available](#)

Aims and scope

Applied Biochemistry and Biotechnology: Part A, Enzyme Engineering and Biotechnology is a journal devoted to publishing the highest quality innovative papers in the fields of biochemistry and biotechnology. Though the typical focus of the journal is to report applications of novel scientific and technological breakthroughs, quality papers on technological subjects that are still in the proof-of-concept stage will also be considered. In addition, Applied Biochemistry and Biotechnology will provide a forum for practical concepts of biotechnology, utilization, including controls, statistical data analysis, problem descriptions unique to a particular application, and bioprocess economic analyses. In this regard, case studies are of particular interest. Applied Biochemistry and Biotechnology accepts previously unpublished work dealing with any of the areas of interest outlined above. Pertinent reviews of special interest to its readers will be considered. Book reviews, meeting and symposia notices, and news items relating to biotechnology in both the industrial and academic communities are welcome. In addition, we often publish a list of patents and publications of special interest to our readers.

Description

This journal is devoted to publishing the highest quality innovative papers in the fields of biochemistry and biotechnology. The typical focus of the journal is to report applications of novel scientific and technological breakthroughs, as well as technological subjects that are still in the proof-of-concept stage. Applied Biochemistry and Biotechnology provides a forum for case studies and practical concepts of biotechnology, utilization, including controls, statistical data analysis, problem descriptions unique to a particular application, and bioprocess economic analyses. The journal publishes reviews deemed of interest to readers, as well as book reviews, meeting and symposia notices, and news items relating to biotechnology in both the industrial and academic communities. In addition, Applied Biochemistry and

Biotechnology often publishes lists of patents and publications of special interest to readers.

Impact Factor: 1.04 (2008) *

* Journal Citation Reports®, Thomson Reuters

Abstracted/Indexed in:

Abstracts in Anthropology, Academic OneFile, AGRICOLA, ASFA, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Biotechnology Citation Index, CAB Abstracts, CAB International, CEABA-VtB, Chemical Abstracts Service (CAS), ChemWeb, Compendex, CSA/Proquest, Current Abstracts, Current Awareness in Biological Sciences (CABS), Current Contents/ Agriculture, Biology & Environmental Sciences, Current Contents/ Life Sciences, DECHEMA, Elsevier Biobase, EMBASE, Food Science and Technology Abstracts, Gale, GeoRef, Global Health, Google Scholar, Health Reference Center Academic, IBIDS, INIS Atomindex, Journal Citation Reports/Science Edition, OCLC, PubMed/Medline, Reaction Citation Index, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded (SciSearch), SCOPUS, Summon by Serial Solutions, TOC Premier

Instructions for Authors

Submissions may be made online using Springer's Editorial Manager electronic submission site at <http://abab.edmgr.com>. First-time users will need to Register before submitting a manuscript. If you experience any problems, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Manuscripts

Type manuscript in English, double-spaced on numbered pages with 1- to 1.5-inch margins. Please prepare the article as a Microsoft Word document. See the Computer Graphics section for figure specifications.

A cover letter must accompany the submission giving the rationale for publication in Applied Biochemistry and Biotechnology, particularly with respect to the originality, scientific merit and importance to the field of Applied Biochemistry and Biotechnology. Author(s) also are required to provide names and contact information (mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address) of at least three experts in the field as potential reviewers for the manuscript. Please do not suggest anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisors, students, or recent collaborators.

Abstracts

Abstracts should be 100–200 words.

Index Entries

Include 5–10 index entries/key words.

Artwork

Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be lowercase letters. Include figure captions. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation.

Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.

Photographs should be of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.

Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator and Adobe Photoshop v5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, JPEG (high-quality, low-compression) and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi.

Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

Nomenclature

Authors should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. All abbreviations should be fully defined in the text.

Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provide titles for all tables.

References

Cite in the text by italic Arabic numerals in parentheses, set on the text line, numbered in the order they appear. List at the end of the paper in consecutive order. Please follow the style indicated below:

Journal reference: 1. Haselbeck, A. and Hösel, W. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42, 207–219.

Chapter in book: 2. Gaastra, W. (1984), in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2: *Nucleic Acids* (Walker, J. M., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 333–341.

Book reference: 3. Franks, F. (1993) *Protein Biotechnology*, 2nd ed., Humana, Totowa, NJ.

Report/Document: 4. Macgregor, S. (1993), PhD thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, UK.

Online: 5. Cancer Facts and Figures 2006. Available from: www.cancer.org. Accessed December 31, 2006.

Page Charges

There are NO page charges for accepted articles.

Reprints

Reprints and/or a final PDF file are available to authors at standard rates when ordered prior to publication.