



**Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de
Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de
Hidrolases**

Félix Gonçalves de Siqueira



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Enzimologia

BRASÍLIA-DF, 2010

**Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica
e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases**

Félix Gonçalves de Siqueira

Trabalho de pesquisa de doutoramento desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, em colaboração com o Prof. Dr. Jurgen Andreas, do Laboratório de Química Têxtil da Universidade Regional de Blumenau (FURB – Blumenau, SC), como também o Departamento de Agricultura e Engenharia Biológica (PURDUE - West Lafayette, Indiana, EUA), sob a orientação dos professores Dr. Michael R. Ladisch e Dr. Eduardo A. Ximenes.

BRASÍLIA-DF, 2010

Félix Gonçalves de Siqueira

Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, para a obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora:

- ✓ Professor Dr. Carlos André Ornelas Ricart – Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Bioquímica e Proteômica da Universidade de Brasília.
 - ✓ Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha – Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília;
 - ✓ Professor Dr. Robert Neil Gerard Miller – Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília;
 - ✓ Professora Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – USP
- Suplente:
- ✓ Professor Dr. Marcio José Poças Fonseca – Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.

Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
IB/UnB
(Orientador)

Brasília-DF, 5 de maio de 2010.

As minhas filhas e filho amados.

A minha esposa amada e companheira, Dora.

Aos meus pais, Francisco e Sueli, pela sabedoria na educação de seus filhos.

As minhas irmãs, Elane, Eliane e Aline, por todo amor dedicado a nossa família.

Ao meu irmão, Fernandes e família, pela amizade e companheirismo de todas as horas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que reina em meu coração através das bênçãos dispensadas a mim e a meus familiares, dando-me força, saúde e alegria em todos os minutos de minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Sueli, pela confiança, pelos conselhos, apoio e por sempre acreditarem em mim.

A minha sogra, Maria Zélia, pelo apoio e força dedicada a mim e a minha família.

Ao professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, pela oportunidade e confiança, pela orientação e incentivo sempre constante, pelas críticas e sugestões, pela paciência e disposição durante a realização deste trabalho e por acreditar na minha capacidade. Muito obrigado, professor, você será sempre lembrado.

Aos professores Carlos André Ricart, Eliane Noronha, Robert Neil, Adriane Milagres e Márcio Poças, por terem aceitado o convite e pela atenção dispensada, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores: Carlos Roberto Félix, Marcelo do Vale, Bergman Ribeiro, Renato Rezende e Ricardo Kruger, pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas durante a pós-graduação.

A professora Eveline Oliveira (UFLA) pela revisão gramatical de acordo com o novo acordo ortográfico da língua portuguesa, meu sincero agradecimento

Aos professores Jurgen Andreaus (FURB), Eustáquio Dias (UFLA), Romildo Silva (UFLA) Luis Roberto Batista (UFLA), Elba Bon (UFRJ), Aldo Dilon (UCS), Eduardo Ximenes (PURDUE) e Michael Ladisch (PURDUE), pelos ensinamentos durante as colaborações junto aos Laboratórios de Biologia, Agricultura e Química no Brasil e nos EUA. Muito obrigado.

Às grandes amigas Marisia e Margarete, que tanto me ajudaram nesta etapa, muito obrigado.

A Ana, que sempre me atendeu de forma alegre, obrigado por tudo.

Ao Gilvan, Leonora, Natália Milanezi, Diana, Paula, Marcos (PURDUE) e Ricardo (UFRJ), pelos ensinamentos, paciência, apoio e incentivo, serei eternamente grato.

Aos colegas e ex-colegas de pós-graduação: Gil, Daniel, Yara, Luís Henrique, Rafael, Gabriel, Jorge, Adelson, Jimmy, Arnúbio, Yuri, Martinho (FURB), Marcos (FURB) e Fabiana (UFLA), pela troca de experiências, convívio e amizade.

Aos alunos-estagiários amigos, Rômulo, Natália, Thiago, Marly, Beatriz, Ingrid, Alan, Mayara, Gaspar, Antonielle, Sheila e Hellen, pela ajuda, atenção e dedicação.

Às minhas irmãs Aline e Eliane, que trabalharam arduamente em projetos em comum, obrigado pela dedicação e compreensão.

Aos grandes amigos: Nilvan, Kátia, Wellington, José Mundim, Neuza, Maria Dileta, Silon, Gilka, Silomar, Dilvan, Robson, Wélia, Graça, Nair, Adriana e Patrícia e os demais que não foram

aqui mencionados, agradeço do fundo coração pelas orações, incentivo, pelas palavras amigas e amáveis. Muito obrigado, que Deus abençoe a todos.

A minha esposa, Dora e filhos, Vítor e Ana Júlia, obrigado pelo incentivo e paciência nos momentos mais difíceis. Amo todos vocês.

A minha filha amada, Giovanna Maria, que tem me ensinado tanto sobre a vida. Muito obrigado filha, pela compreensão, amor e carinho. O papai te ama muito.

As minhas irmãs e irmão: Elane, Eliane, Aline e Fernandes e família, pela torcida, incentivo e apoio, durante esta etapa de vida.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Resumo	9
	Abstract	11
	Considerações iniciais	13
Capítulo I	<i>Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications.</i> Artigo publicado em 2010 na revista: <i>Mini-Reviews in Organic Chemistry.</i>	18
Capítulo II	Perfil das Holocelulases de <i>Penicillium corylophilum</i> (INPA) Crescido em Diversas Fontes de Carbono Lignocelulósico.	26
Capítulo III	Perfil de Holocelulases de <i>Aspergillus flavus</i> Crescido em Biomassa lignocelulósica.	50
Capítulo IV	Avaliação de Extratos Enzimáticos Fúngicos em Aplicações Têxteis - Biopurga, Biopolimento e Bioestonagem.	87
Capítulo V	<i>The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi.</i> Artigo publicado em 2010 na revista: <i>International Biodeterioration & Biodegradation.</i>	128
Capítulo VI	<i>Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues.</i> Artigo publicado em 2010 na revista: <i>Biodegradation.</i>	146
Capítulo VII	<i>Holocelulases e Perfil Bidimensional de Aspergillus Cultivados em Substratos Lignocelulósicos.</i>	160
Capítulo VIII	Prospecção e Utilização de Fungos Filamentosos do Cerrado para Hidrólise Enzimática de Resíduos Agro-industriais.	206

Capítulo IX	<i>Enzymatic Conversion of Liquid Hot Water Pre-treated Cellulosic Substrates in the Presence of Surface Active Additives, Laccase and Protease Inhibitors.</i> Artigo submetido em abril de 2010 a revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB) durante o 32 nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.	230
	Artigos publicados como colaborador	248
Capítulo X	<i>The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from Acrophialophora nainana.</i> Artigo publicado em 2008 na revista: <i>Current Topics in Biochemical Research.</i>	249
Capítulo XI	<i>Activity Profile And Saccharification Potential Of Sugarcane Bagasse Of An Enzyme Preparation From Acrophialophora nainiana When Grown On Different Carbon Sources.</i> Resumo expandido publicado como co-autor em 2009 no VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática Biomassa (SHEB)	262
Capítulo XII	<i>Purification and characterization studies of an acidic thermostable β-xylanase from Aspergillus awamori.</i> Artigo publicado como co-autor em 2010 na revista: <i>Enzyme and Microbial Technology.</i>	267
Capítulo XIII	<i>Inhibition of Cellulolytic Enzymes Due to Products of Hemicellulose Hydrolysis.</i> Artigo submetido em abril de 2010 a revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB) durante o 32 nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	270
	Considerações Finais e Perspectivas	272
	Anexos	277

RESUMO

A complexidade e heterogeneidade das estruturas de holoceluloses de diferentes resíduos agrícolas requerem a ação sinérgica de enzimas para a sua completa hidrólise, envolvendo: celulase, hemicelulase e poligalacturonase. Os fungos filamentosos, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus awamori*, *Emericella nidulans*, *Acrophialophora nainiana*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus brasiliensis* e *Trichoderma reesei*, produzem holocelulases, quando cultivados em meios líquidos e sólidos tendo como fonte de carbono diferentes materiais lignocelulósicos, tais como engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos do beneficiamento de algodão, resíduos da colheita de milho, entre outros. A purificação parcial em cromatografia de filtração em gel Sephacryl-200 do extrato bruto de *P. corylophilum* crescido piolho-de-algodão-sujo em meio líquido mostrou um pico de atividade de xilanase com 0,340 UI.mL⁻¹. O extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira apresentou atividades relevantes para xilanase, poligacturonase, porém teve atividade de endoglucase cinco vezes menor que o *T. reesei* RUT C-30. O fracionamento do extrato bruto do *A. flavus* (engaço de bananeira) foi realizado por membranas de ultrafiltração (PM: 300, 100, 50 e 30), mostrando multiplicidade de endoglucanase e poligacturonase. Os extratos brutos dos cultivos de *A. flavus* foram submetidos a um processo de purificação (ultrafiltração, cromatografia de filtração em gel e troca iônica), destacando na produção de xilanase e pectinase. O extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira mostrou no processo têxtil de biopurga resultados semelhantes aos apresentados pelos extratos enzimáticos comerciais Denimax Acid L e Viscozyme. No entanto os processos têxteis de biopolimento e bioestonagem tiveram baixo rendimento, provavelmente em função do manchamento causado pelos pigmentos do extrato bruto e pouca atividade de endoglicanase. *A. oryzae*, *A. terreus* e *E. nidulans* foram isolados de compostagem natural de resíduos do rebeneficiamento de algodão, os quais apresentaram atividades relevantes de holocelulases quando crescidos em engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo. A cromatografia de filtração em gel S-400 do concentrado em PM 300 do extrato bruto de *E. nidulans* crescido em

pioelho-de-algodão mostrou para atividade de $0,509 \text{ UI.mL}^{-1}$ para arabinofuranosidase, como também dois picos de xilanase que foram revelados por meio de zimograma. Os cultivos de *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 e *A. flavus* apresentaram atividades de holocelulases relevantes quando cultivados em meio sólido, nas seguintes fontes de carbono: resíduos da colheita de milho, bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira. *A. oryzae*, *A. terreus* e *E. nidulans* apresentaram atividades de holocelulases usando fontes de carbono lignocelulósica em cultivo líquido ou sólido, apresentando efeito de temperatura (40 a 65°C) e pH diversificado (ácido, neutro e alcalino), dependendo do fungo, tipo de substrato e forma de cultivo. O perfil proteômico desses fungos variou quanto ao tipo de substrato usado como fonte de carbono, presença ou não da enzima PNGase F no gel uni e bidimensional. O fitofissionoma cerradão-floresta mostrou uma diversidade de fungos filamentosos do solo, serrapilheira ou troncos em decomposição, quando isolados em meios de cultura e temperaturas diferentes. O uso de lacases e poli-etileno-glicol 4000 junto com enzimas comerciais em hidrólise enzimática de resíduos da colheita de milho (*corn stover*) após o pré-tratamento deste material lignocelulósico (*Liquid Hot Water* – LHW) mostrou um rendimento de 20% a mais quando comparado com a mesma condição sem a presença desses aditivos.

ABSTRACT

The complexity and heterogeneity of structures of holocellulose from different agricultural residues demand the synergistic action of enzymes for complete hydrolysis involving cellulase, hemicellulase and polygalacturonase. The filamentous fungi *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus awamori*, *Emericella nidulans*, *Acrophialophora nainiana*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus brasiliensis* and *Trichoderma reesei* produce holocellulases when grown on liquid and solid media containing as carbon source different lignocellulosic materials such as banana stem, sugarcane bagasse, cotton residues, and corn stover, among others. Partial purification by gel filtration chromatography on Sephacryl-200 of crude extract of *P. corylophilum* grown on dirty cotton residue and liquid medium showed a peak of xylanase activity with 0.340 UI.mL⁻¹. The crude extract of *A. flavus* grown on banana stem showed relevant activities of xylanase and polygalacturonase, although displayed an endoglucase activity five times smaller than observed from *T. reesei* RUT C-30. The fractionation of the crude extract of *A. flavus* (banana stem) was performed using ultrafiltration membranes (PM: 300, 100, 50 and 30), showing the multiplicity of endoglucanase and xylanase. Culture extracts of *A. flavus* underwent a process of purification (ultrafiltration, chromatography, gel filtration and ion exchange), especially in the production of xylanase and polygalacturonase. In the process of textile bioscouring, the crude extract of *A. flavus* grown on banana stem showed results similar to those observed with commercial enzyme extracts Denimax Acid L and Viscozyme. However, the processes of textile biostoning and biopolishing had only a low yield, probably as a result of staining by pigments. *A. oryzae*, *A. terreus*, and *E. nidulans* were isolated from natural waste compost-based re-beneficiation of cotton, and showed relevant activities of holocellulase when grown on banana stem and dirty-cotton residue. Gel filtration chromatography in Sephacryl-400 of the crude extract of *E. nidulans* grown in dirty-cotton showed an arabinofuranosidase activity of 0.509 UI.mL⁻¹, as well as two peaks of xylanase that were revealed by zymogram analysis. Cultures of *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* showed relevant holocellulase activities when grown on solid medium

containing corn crop residues, sugarcane bagasse and banana stem as carbon sources. *A. oryzae*, *A. terreus*, and *E. nidulans* showed holocellulase activities over varied temperatures (40-65°C) and pH (acid, neutral and alkaline), depending on the substrate type and cultivation form. The proteomic profile in two dimensional gels of these fungi depended of the type of substrate used as carbon source, and the presence or absence of the enzyme PNGase F. The savanna forest phytofisionomy showed a diversity of filamentous fungi from soil, litter or decaying logs, when isolated in culture media and different temperatures. The use of laccases and poly-ethylene glycol 4000 together with commercial enzymes in the enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment of lignocellulose (Liquid Hot Water - LHW) showed an increased yield of 20% when compared with the same condition without the presence of these additives.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho de doutorado foi realizado com os propósitos de estudar diversos fungos filamentosos isolados de várias fontes de resíduos lignocelulósicos para a produção de holocelulases e realizar aplicações biotecnológicas nas indústrias têxteis e de biocombustíveis com extratos enzimáticos brutos destes fungos e enzimas comerciais purificadas e concentradas. Dessa forma, foi feito o isolamento de fungos de compostagem de resíduos de algodão da indústria de rebeneficiamento têxtil, como também o levantamento de fungos filamentosos de amostras de solo, serrapilheira e troncos em decomposição do cerrado do entorno do Distrito Federal. Ainda na região do entorno, foi realizada a coleta de diversos tipos de resíduos agrícolas que podem ser utilizados como fonte de carbono para a indução das holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases). Resíduos agroindustriais também foram utilizados nos experimentos de produção e identificação de holocelulases fúngicas, como foi o caso dos de algodão provenientes da indústria de rebeneficiamento de algodão do Vale do Itajaí, SC, um dos maiores polos têxteis do Brasil. Para melhor compreensão, este trabalho está dividido em treze capítulos, dos quais alguns referem-se a artigos já publicados em revistas internacionais. Três deles estão relacionados nos anexos desta tese, pois foram o resultado de colaboração, como co-autor, com colegas de doutoramento e outros grupos de pesquisas de outras universidades, como a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Purdue University (EUA) e a Universidade Regional de Blumenau (FURB). Os demais capítulos são resultantes de trabalhos realizados no Laboratório de Enzimologia (UnB) e outros laboratórios (UnB) que colaboraram com o desenvolvimento desta tese, tendo como perspectiva submissão em revistas internacionais para os próximos meses. Dessa forma, os capítulos foram organizados da seguinte maneira:

1) revisão sobre parede celular de plantas (resíduos vegetais) como indutora da produção de holocelulases, que foi publicado na revista *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, sob o título: *Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications*, em 2010;

2) determinação das atividades de holocelulases produzidas por *Penicillium corylophilum* (INPA) crescido em catorze diferentes fontes de carbono lignocelulósicas, em condição submersa, e avaliação do cultivo durante cinco dias, sob agitação ou não agitação. Os resultados estão em fase de organização para submissão/publicação, neste ano, em revista internacional;

3) uso do *Aspergillus flavus* como agente produtor de holocelulases em quatro diferentes fontes de carbono, dos quais três são resíduos agroindustriais e celulose microcristalina. Foram realizadas purificações parciais dessas holocelulases, utilizando colunas cromatográficas de filtração em gel e de troca iônica, como também a determinação do efeito de temperaturas e pHs. Este capítulo está sendo organizado para submissão/publicação, ainda este ano, em uma revista internacional;

4) aplicação das holocelulases (pectinases e CMCases) dos extratos brutos de *Aspergillus flavus* produzidas em cultivo submerso com engaço de bananeira como fonte de carbono (Capítulo 3), em processos comuns na indústria têxtil, como biopolimento, biopurga e bioestonagem. Este trabalho foi realizado em colaboração com a Laboratório de Química Têxtil da Universidade Regional de Blumenau – FURB. Os resultados serão publicados em dois artigos, que estão sendo preparados para serem submetidos à revista internacional na área de aplicações têxteis;

5) isolamento de fungos filamentosos de compostagem de resíduos de algodão da indústria de rebeneficiamento de fibras têxteis e cultivo dos mesmos em fontes lignocelulósicas como fonte de carbono, no qual apresentaram algumas espécies com grande potencial, como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* e *Emmericella nidulans*. Os resultados foi publicados, em colaboração com os grupos de pesquisas dos Laboratórios de Química Têxtil (FURB) e de Microbiologia dos Alimentos (Universidade Federal de Lavras – UFLA), na revista *International Biodeterioration & Biodegradation*, em 2010, sob o título *The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi*;

6) cultivo de três fungos, sendo dois basidiomicetos e um ascomiceto (*A. flavus*), em meios de cultura líquido (cultivo submerso) e sólido (fermentação semi-sólida), para a determinação das atividades de holocelulases em diferentes condições, como também fazer uso destas enzimas para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e não-tratado. Este capítulo foi publicado em 2010, na revista *Biodegradation*, com o título *Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues*. Este trabalho teve a colaboração dos grupos de pesquisas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e do Professor Dr. Carlos Roberto Félix (Laboratório de Enzimologia – UnB);

7) caracterização enzimática quanto a temperaturas e pHs ótimos das holocelulases dos fungos *A. terreus*, *A. oryzae* e *E. nidulans* (Capítulo 5), que foram crescidos em meios de cultura com diferentes fontes de carbono lignocelulósicas em cultivos submerso (líquido) e sólido, como também a realização de estudos preliminares do perfil proteômico dos mesmos, por meio de géis uni e bidimensionais. Este trabalho foi realizado em conjunto com o grupo de pesquisa do Laboratório de Proteínas e Bioquímica (UnB). A perspectiva é a de que possamos identificar as proteínas observadas nas análises de imagens computacionais dos mapas proteômicos e submetermos os resultados para publicação em revista da área de bioquímica e/ou proteômica;

8) neste capítulo foi apresentado o projeto aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF, para isolamento e cultivo de fungos filamentosos provenientes do cerrado do entorno do Distrito Federal com potencial biotecnológico, tendo sido coletadas amostras de solo, serrapilheira e troncos em decomposição, de cinco fitofissionomias do cerrado. As cepas do primeiro fitofissionoma do cerrado (cerradão), que foi isolado de acordo com o local de coleta, o meio de cultura e a temperatura de crescimento, foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFLA para identificação. A manutenção dessas cepas está sendo feita por meio de repicagem em meio de cultura espalhado em placas de Petri, como também em meios de cultura inclinados em frasco de penicilina cobertos por água salina 1%, ou glicerol 18%, ou óleo mineral,

mantidos em temperatura ambiente. Além disso, as cepas também estão sendo mantidas em glicerol 18%, em criotubos, para armazenagem a -80°C. Parte destas cepas isoladas do cerradão foi cultivada em meio submerso com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono para a determinação de atividades das holocelulases. A perspectiva é a de que, até o fim do primeiro semestre de 2011, sejam feitos os isolamentos e cultivos dos fungos filamentosos das outras amostras das quatro fitofissionomas do cerrado que foram coletadas;

9) este trabalho foi realizado em colaboração com o Departamento de Agricultura e Engenharia Biológica da *Purdue University* (Indiana, EUA) e teve como foco a conversão enzimática de substratos celulósicos e lignocelulósicos na presença de aditivos surfactantes, lacases e inibidores de protease. Os resultados desta investigação foram submetidos à publicação na revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB)*, durante o *32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, que foi realizado em abril de 2010 na cidade de Clearwater, Flórida, EUA;

10) publicação do artigo *The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from Acrophialophora nainiana*, como colaborador na revista internacional *Current Topics in Biochemical Research*, em 2008. Este trabalho foi resultado do Projeto Bioetanol, financiado pela FINEP, na etapa coordenada pelo Laboratório de Enzimologia (UnB). O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do *A. nainiana* na produção de hemicelulases durante o crescimento em diferentes substratos lignocelulósicos, como também as propriedades bioquímicas de endoglucanase e xilanase;

11) caracterização das xilanases, pectinases, FPases (celulases totais) e CMCases (endoglucanases), como também o potencial de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelos extratos brutos de *Acrophialophora nainiana* crescido em quatro diferentes fontes de carbono foram realizados no Laboratório de Química Têxtil (FURB). A contribuição como coautor deste trabalho foi dada pela coleta dos resíduos lignocelulósicos e cultivos do fungo em meios submersos.

Também foi feita a purificação parcial dos extratos brutos por meio de ultrafiltrações. Os resultados deste trabalho foram publicados no VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática Biomassa (SHEB), realizado na cidade de Maringá, PR, em 2009. No entanto, os resultados totais estão sendo preparados para submissão à revista internacional, ainda neste ano de 2010;

12) em colaboração com o Laboratório de Enzimas e Biotecnologia da UFRJ, foi publicado o artigo *Purification and characterization studies of an acidic thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori**, na revista *Enzyme and Microbial Technology*, em 2010. O grupo do laboratório de Enzimologia (UnB) entrou como coautor neste trabalho por ter auxiliado na purificação e caracterização de uma β -xilanase do *A. awamori* crescido em meio submerso, com farelo de trigo como fonte de carbono;

13) na Purdue University (EUA), foram realizados experimentos em colaboração com o grupo de pesquisa do *Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE)*, envolvendo o estudo de combinações de celulase total (Spezyme), β -glicosidase (Novozyme 188), com α -arabinofuranosidases de *Aspegillus niger* ou *Biffisdobacter* sp. e xilanases de microrganismos de rúmen bovino. As diferentes combinações enzimáticas foram utilizadas para avaliar a quantidade de glicose produzida pela hidrólise de resíduos da colheita de milho (*corn stover*), após serem pré-tratados com água fervente sobre pressão (LHW – *Liquid Hot Water*). Os resultados desta investigação foram submetidos à publicação na revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB)*, durante o 32nd *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, que foi realizando em abril de 2010, na cidade de Clearwater, Flórida, EUA.

Capítulo I

Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications

Revisão publicada na Mini-Reviews in Organic Chemistry (2010)

Félix Gonçalves de Siqueira¹; Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹.

¹*Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.*

RESUMO

Os resíduos vegetais representam vasta fonte de carbono para a indução das enzimas que degradam a parede celular de plantas. A matriz de polissacarídeos apresenta grande diversidade estrutural, contendo diferentes tipos de resíduos de açúcares com a mesma ou diferentes ligações, podendo ser ramificadas em diferentes graus, cuja conformação pode ser de cadeia linear, torcida, em forma de hélice ou de cadeias completamente desordenadas. Celulose e hemicelulose são os polissacarídeos mais abundantes na natureza, representando cerca de 35%-50% e 25%-30% do peso seco da parede celular vegetal, respectivamente. A exploração dos polissacarídeos da parede celular vegetal requer um arsenal de enzimas com diferentes modos de ação. A hidrólise enzimática dos componentes da parede celular vegetal tem aplicações em diversas áreas, incluindo a produção de combustíveis, a eliminação de resíduos sólidos, a alimentação animal e as indústrias papeleira e têxtil.

Dentro do contexto acima descrito, foi feita uma revisão, que foi publicada em 2010 no periódico *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, descrita nas próximas páginas, abordando diferentes aspectos da estrutura e função de células vegetais, tendo como foco principal o seu potencial como indutor do conjunto de enzimas com aplicações biotecnológicas.

Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications

Félix Gonçalves de Siqueira and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho *

Enzymology Laboratory, Cellular Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

Abstract: The plant cell wall represents a vast carbon source for the induction of carbohydrate-degrading enzymes. The matrix of polysaccharides presents a great structural diversity, containing different sugar residues with the same or different bonds, branched to varying degrees and whose conformation may be like a straight ribbon, a twisted ribbon, an open helix or completely disordered. Cellulose and hemicellulose are the most abundant polysaccharides, accounting for as much as 35-50% and 25-30% of the dry weight of plant cell wall, respectively. The exploitation of plant cell wall polysaccharides requires an arsenal of enzymes with different mode of action. Enzymatic saccharification of plant cell wall components has potential applications in different fields, including fuel, solid waste disposal, animal feed, and paper/textile industry. The present review covers some aspects of plant cell structure and function, having in mind its potential as an inductor of enzyme systems with biotechnology applications.

Keywords: Cell wall, holocellulose, glycosidase, holocellulase, enzyme specificity.

I. INTRODUCTION

The plant cell wall as a substrate for enzyme action must be considered in a different context, taking into account its complexity and nature (Fig. 1). A kinetic model for the interaction between cell wall components and a consortium of enzyme systems requires the analysis of several factors, including the involvement of different types of chemical linkages and the environment that surrounds the cell wall structure (Fig. 2). Recalcitrance to saccharification is a major limitation for the conversion of lignocellulosic biomass to valuable end products [1]. An intricate arrangement between polysaccharides of the cell wall matrix, hereafter called holocellulose, proteins and lignin makes the cell wall structure a challenge for carbohydrase and ligninase enzyme systems from different sources. Within the groups of carbohydrases, glycosidases have an important role in the hydrolysis of the glycosidic bonds in oligo- and polysaccharides [2]. The strategy adopted by some enzyme sources, like fungi and bacteria, is based on the use of glycosidases with varying substrate specificity, suggesting the role of some enzyme systems as promiscuous agents [2, 3]. Enzyme promiscuity has an important functional role in cell wall deconstruction, involving substrate and catalytic specificities. As a matter of fact, the type of chemical linkage, more than any other factor, determines the enzyme action in a certain kind of substrate. The plant cell wall structure is a good environment to induce substrate promiscuity. In this case, enzyme systems with high substrate promiscuity act in synergism with enzymes with strict substrate specificity, leading to a more efficient catalytic process. Within this context, enzymes that cut specific sites in the plant cell wall are also important tools for understanding the structure and function of cell wall.

II. THE PLANT CELL WALL STRUCTURE

The plant cell wall is a strong fibrillar network that gives each cell its stable shape [4]. It is composed of cellulose, a linear polymer of β -1,4-linked glucose units; hemicelluloses which include a variety of polysaccharides with linear or branched polymers derived from sugars such as D-xylose, D-galactose, D-mannose, D-glucose and L-arabinose; pectin, a linear polymer of α -1,4 galacturonic acid units, some of which are methylated at C-6, some acetylated at C-2 and some with more extensive substitution; starch, composed of two polymers, a linear α -D-glucan (amylose) and a branched glucan (amylopectin); structural proteins, including glycoproteins, expansin and extensin; and lignin, a three-dimensional

network of p-hydroxyphenylpropane units [5-7]. The composition and percentages of these cell wall components vary from one plant species to another [8].

The plant cell wall is a complex structure consisting of three layers (Fig. 1). The outer layer is called middle lamella, being the first layer formed during cell division. It is shared by adjacent cells and consists mainly of pectic compounds and proteins [8, 9]. It is the part of the cell wall that is laid down between two daughter cells as they are separated during division and makes up the outer wall of the cell [10]. The pectic compounds form plastic, hydrophilic gels that cement the cells to one another and provide coherent tissues [9]. The packing of pectic compounds into the wall alters the texture and mechanical properties of the wall due to the fact that the hydrogen bonds between the polysaccharides and the microfibrils are weakened, becoming less rigid [11].

The primary wall is a highly hydrated structure having a relatively sparse distribution of cellulose microfibrils embedded in a gelatinous matrix composed of pectic compounds, hemicelluloses, glycoproteins (hydroxyproline-rich extensions), extension, and expansin [12]. The primary cell wall is formed during the birth of cellulose fiber. The chemical components of plant cell have content and bonding network determined by the origin, age and the treatment of fiber. It defines not only the mode of growth of plant cells, but also their size and shape [9]. The primary cell wall presents some other functions, including structural and mechanical support, protection against pathogens and dehydration. Besides, the plant cell wall is also responsible for cell-cell interactions and carbohydrate storage. The primary walls are dynamic structures, whose composition and architecture changes during plant growth and development (<http://www.cccr.uga.edu/~mao/outline.htm>).

The pectic compounds present in the primary wall include pectins and protopectins (water-insoluble parent pectic substance) and have an essential role in the distribution of water within the wall, in the interaction between the water and the polysaccharides of matrix and between the matrix and microfibrils [11], while the hemicellulosic components include a variety of polysaccharides with linear or branched molecules [13, 14]. During cell wall growth or cell elongation the primary cell wall presents as membranes with arrangements of cellulose microfibrils embedded in the gel-like matrix [12]. Cellulose from primary wall has a lower and more disperse degree of polymerization than from secondary wall and presents a biphasic distribution in the degree of polymerization range [9]. Pectin, cellulose and hemicellulose of the matrix are formed within the membrane of the Golgi body and their associated vesicles [11]. This material is released from the vesicle through the cytoplasm by the process called reverse pinocytosis and the polysaccharides are

*Address correspondence to this author at the Enzymology Laboratory, Cellular Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil; Tel: 0+556133072152; Fax: 0+556132734608; E-mail: eximenes@unb.br

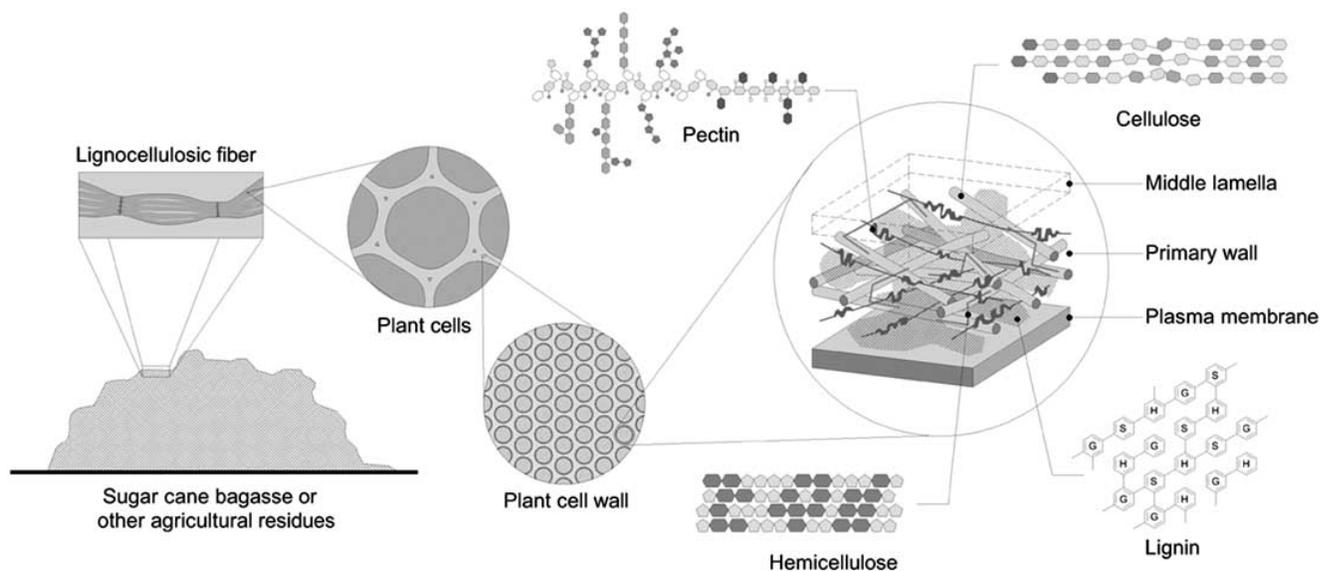


Fig. (1). Cell wall structure of agricultural residues.

packed into the wall. The model proposed by Keegstra *et al.* [15] suggests the binding of wall matrix polymers, including xyloglucan, pectin and glycoproteins, by covalent linkage. In this model cellulose is bonded to the wall matrix by H-bonding to xyloglucans, resulting in a non-covalently cross-linked cellulose-hemicellulose network, which is responsible for the wall tensile strength [4]. However, this model has been questioned because of the lack of evidence for the existence of covalent linkages between xyloglucan, pectin and glycoprotein [4]. Some other models were introduced, in order to give a re-evaluation of the control of wall enlargement. In the tethered network [16, 17], cellulose microfibrils are cross-linked and hydrogen bonded to xyloglucan. In this case, cellulose microfibrils may be tethered together directly via long xyloglucan chains [4]. In addition, the cellulose-xyloglucan network is physically entangled in a non-covalently cross-linked pectic network. Other variations of the tether model include the diffuse and the stratified layer models. In the diffuse model, xyloglucan is hydrogen bonded the surface of cellulose microfibrils without cross-link them directly. On the other hand, the stratified model has to do with the fact that xyloglucan are hydrogen bonded to and cross-link cellulose microfibrils. In this particular case, pectic layers act as spacers between xyloglucan-cellulose lamellae [18]. All the above models have in common the concept that cellulose microfibrils are coated with xyloglucan.

The secondary cell wall is formed inside the primary wall, when the cell enlargement is complete. The wall may become thickened and stronger and take on a distinctive shape and specialized properties [19]. Each type of mature plant cell has a characteristic secondary wall adapted to the particular function of the cell. The secondary wall is much denser and less hydrated than the primary wall and is laid down as three successive layers of cellulose, each of which is adjacent to the plasma membrane. During the cell wall thickening, cellulose is deposited in the secondary wall. Secondary cellulose deposition occurs after the cessation of expansion of the primary wall. Walls layers display a very orderly and parallel arrangement of the microfibrils [19]. In addition to cellulose, hemicelluloses are also laid down during secondary thickening. In angiosperms, these hemicelluloses are also laid down during secondary thickening and are preponderantly xylans, while in gymnosperms they are mainly glucomannans and galactoglucomannans. At the end of this period, lignin begins to form, mostly in the middle lamella, and serves to cement together the fibres, thereby

strengthening the tissue and increasing the rigidity of cell wall. Lignin has an important function in restricting the breakdown of holocellulose structure by hydrolases. The contact between the microfibrils and the matrix in the lignified wall ensures a stress transfer between the components and also avoids that the layers and components of the wall will slip with respect to one another [11]. Thus, the cellulose fibrils are embedded in a network of hemicelluloses and lignin. Cellulose from secondary wall has a rather high degree of crystallinity, with all the glucan chains running in the same direction, and the individual chains being cross-linked to form microfibrils [9]. The network structure is responsible for the elimination of water from the wall and the formation of a hydrophobic composite that contributes to the recalcitrance of the secondary wall to enzyme action. In this context, ferulic acid plays an important function as the component that links hemicelluloses and pectin to each other as well as to lignin [13]. Xylans from monocots contain feruloyl esters on the side chain of arabinofuranosyl residues [9]. It has been hypothesized that these esters are subject to a coupling reaction catalyzed by peroxidase [20]. The release of diferuloyl groups can cause the cross-linking of xylans, influencing the physical properties of the cell wall and its ability to grow and to resist enzymic attack. These coupling reactions may result in a binding together of the phenol-bearing polysaccharides within the cell wall, preventing the biodegradability of the plant cell wall by microorganisms [13]. The secondary wall presents most of the carbohydrate in biomass and shows much wider range of variability than of the primary cell wall. Because of that, it may play a key role as a source of renewable biomass that can be converted to in food and biofuel [21, 22].

The role of plant cell wall polysaccharides is a matter of intense discussion in several scientific reports [23]. The composition of plant cell wall polysaccharides varies from one cell type to another and one species to another [23, 24]. There is a great variety of linkages and branching types. The presence of branch points determines their solubility, viscosity and other physicochemical properties. These complex structures are cross-linked by ionic and covalent bonds that provide a barrier to physical penetration from microbial and mechanical forces [24]. A model of polysaccharide organization derived from a model of pectin structure was proposed by Vorwerk *et al.* [23]. In this model, the cellulose microfibrils are cross-linked by hemicellulose (xyloglucan) and loosely aligned with the highly conserved structure of rhamnogalacturonan I. Ho-

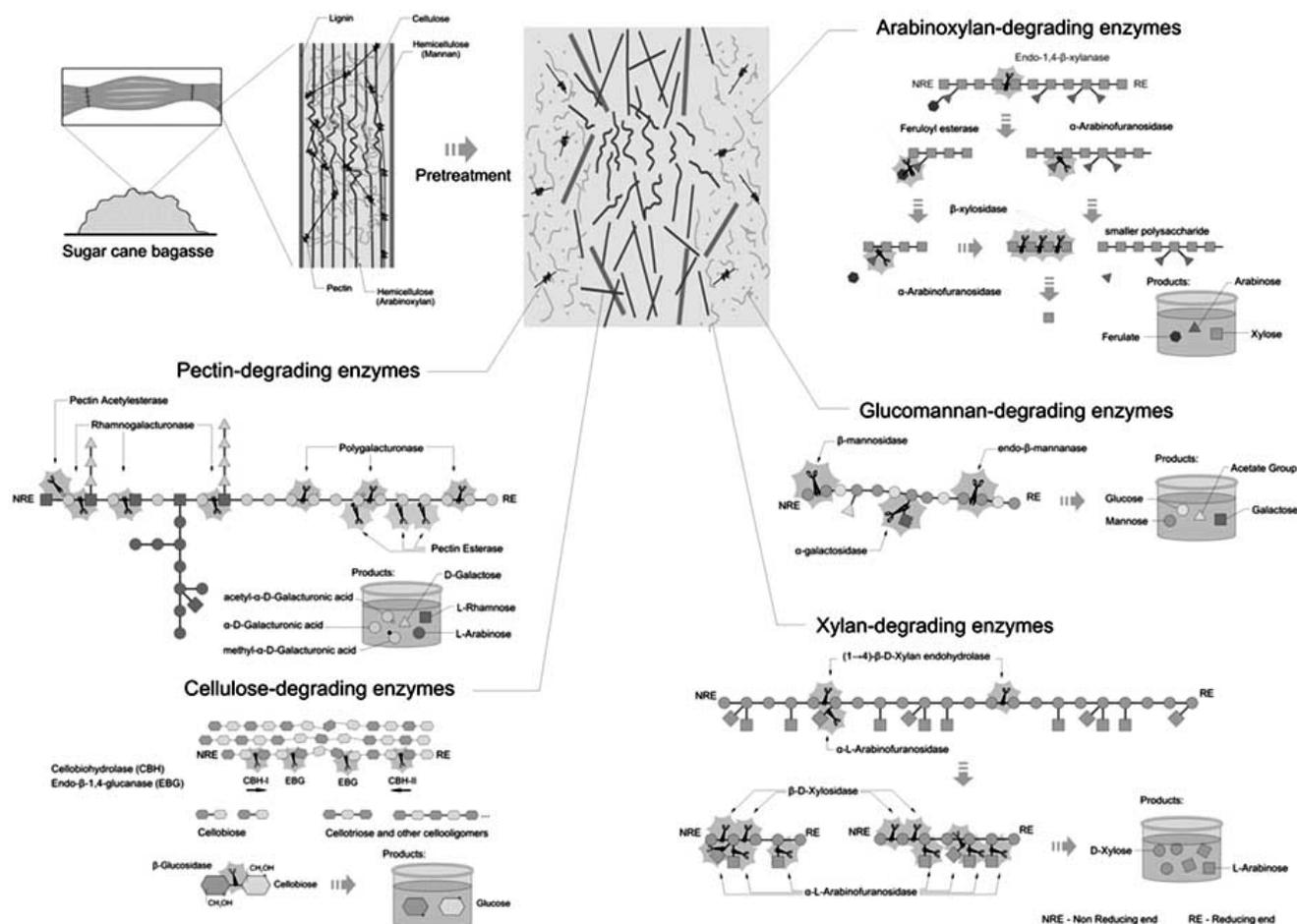


Fig. (2). Enzymatic attack on holocellulose structure.

mogalacturonan, arabinans, galactans and rhamnogalacturonan II are attached to rhamnogalacturonan I as side chains. It is worth to mention that cross-links between homogalacturonan and other pectins are formed through borate diester links between rhamnogalacturonan II, and by calcium molecule bridge between non-esterified domains on homogalacturonan.

Although extensive studies have been carried out, new insights into the structural complexity and heterogeneity of cell wall components such as holocellulose require the development of new techniques for imaging and characterizing the chemical topography of the cell wall at nanometre scale [1].

III. ENZYMATIC BREAKDOWN OF HOLOCELLULOSE

Microorganisms are a rich source of enzyme systems displaying glycosyl hydrolase activities and involved in the breakdown of plant cell wall polysaccharides. The efficiency of bioconversion of these polymers to fermentable sugars depends upon an intricate mechanism of enzyme systems that includes a widespread group of glycosidases [2, 25, 26]. The breakdown of holocellulose is carried out by an ensemble of enzymes which hydrolyse glycosidic bonds in oligo- and polysaccharides (Fig. 2). In some cases, a pretreatment method, such as steam explosion, is also required to increase holocellulose accessibility. The exo-holocellulases act on terminal glycosidic linkages and liberate monosaccharide units, while endo-holocellulases hydrolyse internal glycosidic bonds at random or at specific positions [27, 28]. In addition, enzymes that cleave various branch points are essential for complete hydrolysis of holocellulose.

According to McCann and Carpita [24], the efficiency of holocellulose breakdown to fermentable sugars depends upon macroscopic and molecular features of cell wall polysaccharides. At macroscopic level, it must be considered as the spatial organization of different cell types, the strength and extent of cell-cell adhesion, and the spatial distribution of lignin. At the molecular level, the composition, structural heterogeneity and complexity of cell wall components of different cell types contribute to the recalcitrance of holocellulose to enzymatic attack [1]. This recalcitrance is also due to the strong interchain hydrogen-bonding network present in crystalline cellulose core.

Cellulases, hemicellulases and pectinases belong to a group of enzymes called holocellulase that shows two conserved mechanisms of acid/base hydrolysis of the glycosidic bonds with retention or inversion of the anomeric configuration at the cleavage point [2, 29, 30]. Retention occurs by way of double displacement and inversion via a single displacement reaction [25, 30, 31]. Both mechanisms involve stabilization of an oxocarbenium ion by electrostatic interaction and a pair of carboxylic acids at the active site [30]. Some xylanases and cellulases work via two consecutive single displacements in which anomeric configuration is retained, while others catalyze single displacement reactions with inversion of configuration [28]. However, the physiological role of these mechanisms of reaction remains to be established.

Holocellulose is an insoluble structure with a size of many thousands of carbohydrate residue units. Because of the heterogeneous nature of the holocellulose structure, the synergistic associa-

tion between cellulase and other holocellulose-degrading enzymes is responsible for an efficient and extensive degradation of these carbohydrate structures. Holocellulases are involved in holocellulose breakdown at polymeric and oligomeric levels. It has been said that endo-holocellulases do not readily attack holocellulose because such complex polysaccharides lack unsubstituted regions of similar sugar residues and linkages. In this particular case, it is relevant to mention the action of enzymes that liberate substituents from the main chain structure of holocellulose. In contrast to those endo-holocellulases, the hydrolytic ability in the immediate vicinity of substituted regions have been reported [31]. Holocellulases are grouped in many families of glycosyl hydrolases and may contain non catalytic substrate binding domains in their structure, as well as linker sequences. Two of these families, named 10/F and G/11, present a variety of enzyme with narrow and absolute specificity towards the type of glycosidic bond, respectively [32]. The substrate cross-specificity is a characteristic of many holocellulases [20]. In this case, some holocellulases have a broad specificity whereas some are restricted to a specific substrate [33]. As mentioned before, the hydrolysis of holocellulose by glycosyl hydrolases is linked with plant cell wall structural characteristics as, for example, the nature and extent of the cross-links between different polysaccharides, the interactions between lignin and carbohydrates, the nature and extent of protein cross-linking, cellulose crystallinity and microfibril size [24].

Within the above context, it would be relevant to discuss some aspects of enzyme specificity with emphasis to promiscuity behavior. The nomenclature for glycosyl hydrolases based on reaction catalyzed and substrate specificity has to take into account some aspects related to evolutionary divergence or convergence [34]. Evolutionary divergence has to do with changes in specificity and reaction type, while convergence evolution implicates in enzymes with different folds to catalyze the same reaction on a given substrate.

The glossary below for divergent evolution gives some definitions to describe relationships in sequence, structure and function [35, 36]. Homologs are enzymes that derive from a common ancestor and are structurally related. This group of enzymes shows a high degree of sequence similarity and can also be highly divergent, being thus not specific to a determined chemical reaction. In addition, they can be classified into three categories [35]: family (group of enzymes that catalyze the same reaction mechanism and substrate specificity), superfamily (group of enzymes that catalyze either the same chemical reaction with different substrate specificities or different overall reactions that share a common mechanistic attribute, including partial reaction, intermediate, or transition state, enabled by conserved active site residues that perform the same function), and suprafamily (group of enzymes that catalyze different overall reactions which do not share mechanistic functions, performing different attributes in the members of the superfamily). Orthologs is another term to describe homologous enzymes in different species that catalyze the same reaction. On the other hand, paralogs are homologous enzymes in the same species that diverged from one to another by gene duplication after speciation. Analogs refer to enzymes that catalyze the same reaction but are not structurally related.

The above concepts can be useful to address fundamental questions about the behavior of glycosyl hydrolases in the hydrolysis of holocellulose, having in mind the ability of these enzyme systems to adapt under different structural conditions. Moreover, microbial strategies to overcome the natural resistance of plant cell wall to enzyme attack are concentrated in some parameters of enzyme and substrate specificity. These parameters have interesting implications on our understanding of how the holocellulose structures are enzymatically degraded. Many holocellulases act in a range of structurally similar substrates, while others show ability to catalyze alternative reactions with a range of substrates. Hult and Berglund [3] define promiscuous enzyme as one performs the action. Enzyme

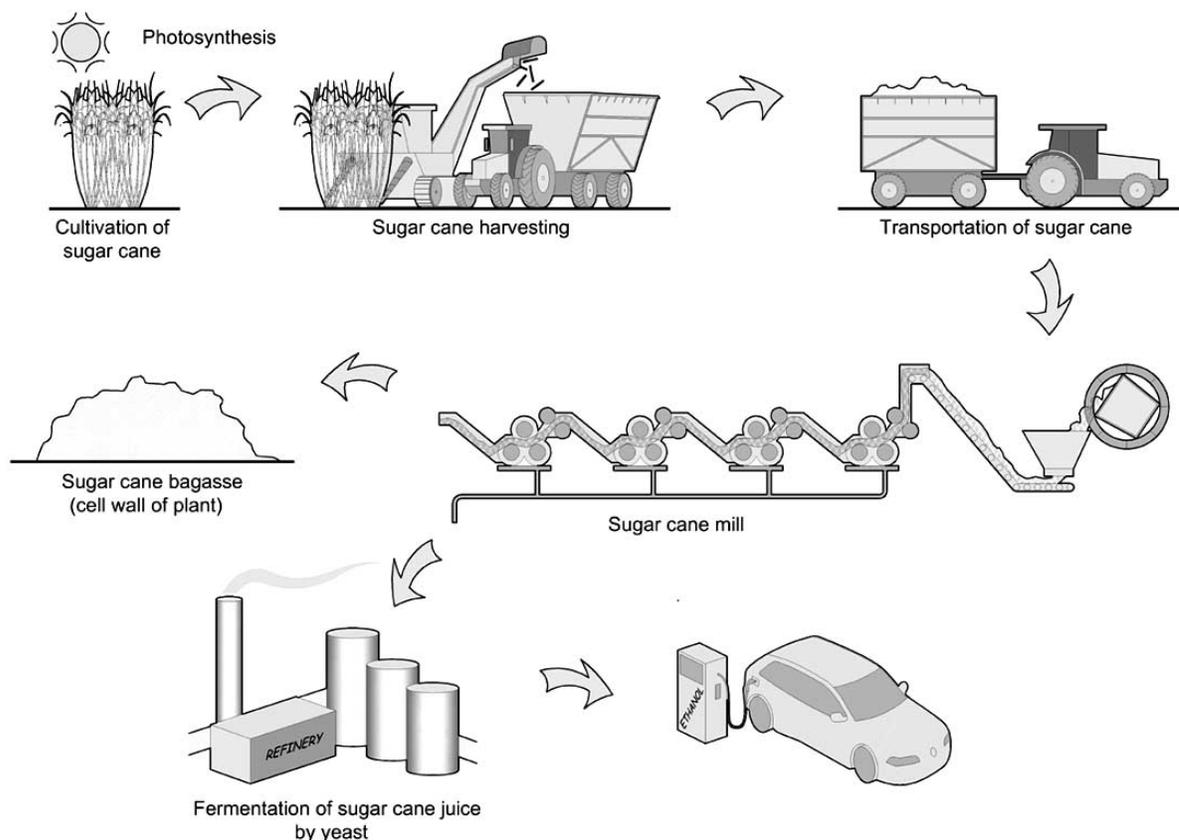


Fig. (3). Overview of sugar cane ethanol production.

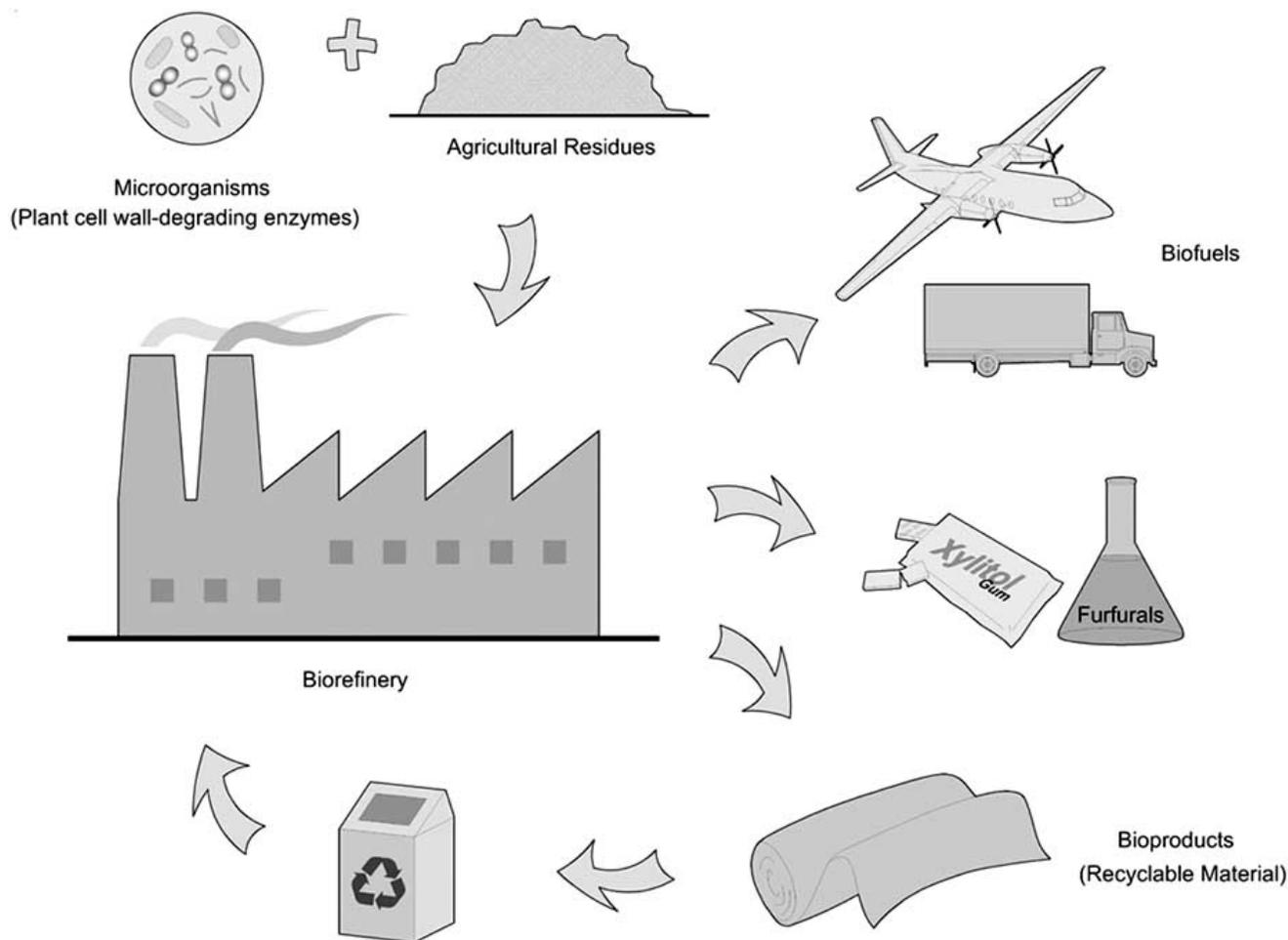


Fig. (4). Simplified model of biorefinery.

promiscuity can be classified in terms of reaction conditions, substrate with relaxed or broad specificity and catalytic properties through different chemical transformations with different transition states. According to Khersonsky *et al.* [37], when a need for new enzymatic functions arise, nature recruits existing enzymes that promiscuously bind the new substrate, or catalyze the new reaction, and then tinkers with their active sites to fit the new substrate and reaction. From the above concepts, it is possible to consider new families of holocellulases presenting a relaxed behavior against different types of substrates and ability to survive in a complex environment and as result of these enzymes have diverged from existing ones. One interesting question was proposed by Glasner *et al.* [36]: how was evolution produced an incredible variety of enzymatic activities from a limited number of protein folds? Back to the cell wall environment, we may consider a consortium of enzyme systems facing the cell wall matrix structure that includes different types of connections and a crystalline substrate like cellulose. This would require from these enzymes conformation states in order to adapt to change in reactions conditions.

IV. ENZYME APPLICATIONS

Holocellulose represents a major reserve of reduced carbon in the environment. Large amounts of holocellulose are present in urban and agro-industrial residues in a form that cannot readily be buried and which has to be disposed off at considerable costs. Therefore, there is a great interest in holocellulose breakdown be-

cause of the possible applications in ruminal digestion, waste treatment, fuel chemical production, and paper manufacture [7, 25]. This may lead to an increased interest in the use of holocellulases, in order to reduce the costs. The exploitation of such materials would require the holocellulose components be used directly or degraded into their respective monomers and then to desirable end products (Fig. 4). Moreover, holocelluloses may be used as a high-grade raw material to produce monomers as glucose and xylose which can then be used as a feedstock for single-cell protein production or in fermentation to ethanol [38-40]. Different regions of the world have used energy crops as feedstock for the production of fuel ethanol. Fig. (3) shows an example of ethanol production by using sugarcane having in mind the Brazilian model. The bioconversion of holocellulose into ethanol reduces processing costs in the overall process and hence makes the process economically viable [41-43]. Sugarcane bagasse is a fibrous organic material that remains after sugar liquor has been removed from the sugar cane and is considered as potential source of ethanol in some developing countries, including Brazil and India [44-46]. It is a lignocellulosic substrate, composed of 42% cellulose, 22% lignin, 28% hemicelluloses and 8% of cane wax and organic acid [44]. Thus, the enzymatic hydrolysis of this residue, aiming commercial and industrial applications, requires the synergistic associations between ligninases and holocellulases. Holocellulases are also important for the efficient degradation of plant materials in animal feed [47]. The accessibility of cellulose to ruminal digestion can be improved by partial enzymatic hydrolysis of holocellulose in animal feed with

consequent improvement of the nutritional value of the feed. Holo-cellulases can also be used in the bleaching of Kraft pulps or to improve fibre properties [27, 45]. There are applications of holocellulases in clarification of juices, preparations of dextrans for use as food thickeners, production of fluids and juices from plant materials, and in processes for the manufacture of liquid coffee and adjustment of wine characteristics [39, 47]. The hydrolases are the majority of currently used industrial enzymes which have carbohydrate-degrading enzymes as the second largest group. The cost of these enzymes has been identified as an economic barrier for their use in biorefineries. Over the years much efforts has been employed to reduce the cost of producing holocellulases [48-50]. For example, cellulase production costs have reached the range of 10-20 cents per gallon of ethanol produced [48]. A major challenge is the improvement of strategies that includes enzyme engineering based on directed evolution and rational design [50, 51].

V. CONCLUSIONS

Therefore, having in mind the obvious importance of holocellulases in the degradation of different types of polysaccharide structures, including agricultural residues, it would be relevant to address the following hypothesis adapted from Hult and Berglund [3]: holocellulases can be exposed to reaction conditions and substrates in the plant cell wall environment that will challenge their specificity and might force them to handle substrates and catalyze reactions they were not designed for. It is also interesting to mention the hypothesis that the above relaxed specificity can result from different conformations in the ensemble catalyzing different reactions, with the native activity catalyzed by the most stable (ground-state) conformation. According to Wroe *et al.* [52], a mutation that increases the stability of a nonnative conformation increases its occupancy in the ensemble and the activity corresponding to this conformation. Thus, holocellulose structure would be a source of nonnative substrates being catalyzed by a spectrum of enzymes showing varying efficiency. In addition, conformational changes enable holocellulases to accommodate different substrates and show relaxed substrate specificity. Another point to be considered has to do with a number of structurally unrelated holocellulases catalyzing the same biochemical reactions. Analogous enzymes (without detectable sequence similarity) are reported as performing functions related to adaptation to new environments and life styles and usually have a limited phylogenetic distribution [53]. Therefore, the scenario of plant cell wall degradation would also include the recruitment of existing holocellulases that take over new functions related to changes in holocellulose specificity or a modified catalytic mechanism.

Because of the structural complexity of plant cell wall, a wide variety of enzyme systems have been developed by different sources, including bacteria and fungi, as strategy to overcome the matrix components. Finally, the large market commercial appeal of holocellulases encourages the development of enzyme preparations able to carry out an efficient hydrolysis of plant cell wall structures.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Mr. A. E. Machado for his assistance in drawing the figures. E. X. F. Filho acknowledges receipt of a research fellowship from CNPq (Brasil).

REFERENCES

- Himmel, M.E.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimtos, M.R.; Brady, J.W.; Foust, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes from biofuels production. *Science*, **2007**, *314*, 804-807.
- Henrissat, B. Enzymology of cell-wall degradation. *Biochem. Soc. Trans.*, **1998**, *26*, 153-156.
- Hult, K.; Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.*, **2007**, *25*, 231-238.
- Cosgrove, D.J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.*, **2001**, *125*, 131-134.
- Martínez, A.T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M.J.; Gutiérrez, A.; Del Río, J.C. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.*, **2005**, *8*, 195-204.
- Moreira, L.R.S.; Filho, E.X.F. An overview mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *79*, 165-178.
- Saha, B.C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *30*, 279-291.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; la Rubia, T.; Martínez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.*, **2002**, *5*, 53-63.
- McNeil, M.; Darvil, A. G.; Fry, S.C.; Albersheim, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Ann. Rev. Biochem.*, **1984**, *53*, 526-663.
- Timell, T.E. Wood hemicelluloses: part I. *Carbohydr. Chem.*, **1964**, *19*, 247-302.
- Northcote, D.H. Chemistry of the plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1972**, *23*, 113-132.
- Wilkie, K.C.B. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1979**, *36*, 215-264.
- de Vries, R.P.; Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2001**, *65*, 497-522.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2005**, *29*, 719-739.
- Keegstra, K.; Talmadge, K.W.; Bauer, W.D.; Albersheim, P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.*, **1973**, *51*, 188-196.
- Hayashi, T. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1989**, *40*, 139-168.
- Fry, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth – a possible relationship. *Physiol. Plant.*, **1989**, *75*, 532-536.
- Ha, M.A.; Apperley, D.C.; Jarvis, M.C. Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiol.*, **1997**, *115*, 593-598.
- Dey, P.M.; Brinson, K. Plant cell walls. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1984**, *42*, 265-294.
- Filho, E.X.F. The xylan-degrading enzyme system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1994**, *27*, 1093-1109.
- Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E.V. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.*, **2007**, *6*, 1-23.
- Zhang, Y.-H. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocelluloses biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *35*, 367-375.
- Vorvek, S.; Somerville, S.; Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, **2004**, *9*, 203-209.
- McCann, M.; Carpita, N.C. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2008**, *11*, 314-320.
- Andreas, J.; Filho, E.X.F.; Elba, B. *Biocatalysis and Bioenergy*; Hou, C.T.; Shaw, J.-F. Eds.; John Wiley and Sons: New Jersey, **2008**, pp. 197-229.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *35*, 377-391.
- Filho, E.X.F. *Recent Research Developments in Microbiology*, Panadala, S.G. Ed.; Reserch Signpost: Trivandrum, **1998**, pp. 165-176.
- Coughlan, M.P. *Xylan and Xylanases*, Visser, J.; Beldman, G.; Someren, M.A.K.; van Voragen, A.G.J. Eds; Elsevier Science: Amsterdam, **1992**, pp. 111-139.
- Birsan, C.; Johnson, P.; Joshi, M.; Macleod, A.; McIntosh, L.; Monem, V.; Nitz, M.; Rose, D.R.; Tull, D.; Wakarchuck, W.W.; Wang, Q.; Warren, R.A.J.; White, A.; Withers, S.G. Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochem. Soc. Trans.*, **1998**, *26*, 156-160.
- Rye, C.R.; Withers, S.G. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 573-580.
- Coughlan, M.P.; Tuohy, M.G.; Filho, E.X.F.; Puls, J.; Claeysens, M.; Vranská, M.; Hughes, M.M. *Hemicellulose and Hemicellulases*, Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P. Eds; Portland Press: London, **1993**, pp. 53-84.
- Rabinovich, M.L.; Melnick, M.S.; Bolobova, A.V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 850-871.
- Wong, K.K.Y.; Tan, L.U.L.; Saddler, J. Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.*, **1988**, *52*, 305-317.
- Hazlewood, G.P.; Gilbert, H.J. *Hemicellulose and Hemicellulases*, Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P., Eds; Portland Press: London, **1993**, pp. 103-126.
- Gerlt, J.A.; Babbitt, P.C. Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct superfamilies. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 209-246.
- Glasner, M.E.; Gerlt, J.A.; Babbitt, P.C. Evolution of enzyme superfamilies. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 492-497.
- Khersonsky, O.; Roodveldt, C.; Tawfik, D.S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 498-506.
- Rubin, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, **2008**, *454*, 841-845.

- [39] Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, **2002**, *18*, 355-383.
- [40] Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. Fuel ethanol production from lignocelluloses: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *56*, 17-34.
- [41] Prasad, S.; Singh, A.; Joshi, H.C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Res. Cons. Recycl.*, **2007**, *50*, 1-39.
- [42] Neves, M.A.; Kimura, T.; Shimizu, N.; Nakajima, M. State of art and future trends of bioethanol production. *DBPMB*, **2007**, *29*, 1-14.
- [43] Lynd, L.R.; van Zyl, W.H.; McBride, J.E.; Laser, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, *16*, 577-583.
- [44] Beukes, N.; Chan, H.; Doi, R.H.; Pletschke, B. I. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.*, **2008**, *42*, 492-498.
- [45] Goldemberg, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol. Biofuels*, **2008**, *1*, 1-7.
- [46] Howard, R.L.; Abotsi, E.; Jansen van Rensburg, E.L.; Howard, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.*, **2003**, *2*, 602-619.
- [47] Kirk, O.; Borchet, T.V.; Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, *13*, 345-351.
- [48] Lynd, L.R.; van Zyl, W.H.; McBride, J.E.; Laser, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, *16*, 577-583.
- [49] Himmel, M.; Ruth, M.F.; Wyman, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 358-364.
- [50] Jeoh, T.; Michener, W.; Himmel, M.E.; Decker, S.R.; Adney, W.S. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnol. Biofuels*, **2008**, *1*, 1-12.
- [51] Zhang, Y.-H.; Himmel, M.E.; Mielenz, J.R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.*, **2006**, *24*, 452-481.
- [52] Wroe, R.; Chan, H.S.; Bornberg-Bauer, E. A structural model of latent evolutionary potentials underlying neutral networks in proteins. *HFSP J.*, **2007**, *1*, 79-87.
- [53] Galperin, M.Y.; Walker, D.R.; Koonin, E.V. Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Res.*, **1998**, *8*, 779-790.

Received: January 27, 2009

Revised: May 14, 2009

Accepted: May 18, 2009

Capítulo II

Perfil das Holocelulases de *Penicillium corylophilum* (INPA) Crescido em Diversas Fontes de Carbono Lignocelulósico

Félix Gonçalves de Siqueira¹; Gilvan Caetano Duarte¹; Thiago Rodrigues¹, Paula Marcela Duque Jaramillo²; Eliane Gonçalves de Siqueira¹, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹.

¹*Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.*

²*Laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.*

RESUMO

O experimento foi realizado com o cultivo do fungo *Penicillium corylophilum*, isolado de troncos em decomposição na floresta amazônica pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em meio submerso, com as seguintes variáveis: fonte de carbono (vários resíduos lignocelulósicos) e agitação mecânica (*shaker*) ou não-agitação do meio durante o crescimento micelial. Nesse caso, a xilanase apresentou as mais expressiva atividade dentre as holocelulases testadas. Os resíduos da colheita do milho (palha da espiga, troncos, folhas, pequenos fragmentos do grão de milho e sabugo) no cultivo com agitação foram os que tiveram atividades de xilanases mais significativas, dentre as catorze fontes de carbonos observadas. Esses resíduos da colheita de milho também foram, juntamente com a borra de café, os substratos com maior expressão de mananases deste fungo. O desempenho destes resíduos repetiu-se nos ensaios de CMCases e pectinases, acompanhados de pó-de-filtro (resíduos do re-beneficiamento da fibra de algodão) e os resíduos de soja, respectivamente. A condição de cultivo de agitação não fez muita diferença ou, até mesmo, proporcionou menor desempenho de algumas atividades enzimáticas em alguns substratos, como

para CMCase em engaçó de bananeira e praticamente todos os substratos para pectinase, principalmente para engaçó de bananeira, bagaçó de cana-de-açúcar, resíduos da colheita de feijão e resíduos da colheita de milho.

1. Introdução

Vários fatores influenciam a escolha de uma enzima ou de um complexo enzimático em um processo industrial, tais como especificidade e pureza, temperatura, pH, inibidores, ativadores, métodos de análises, custos e substratos. A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente é de hidrolases (75%); dentre estas, as proteases são as mais utilizadas, correspondendo a 40% do mercado. Em segundo lugar estão as carboidrases (Said & Pietro, 2004).

A demanda por enzimas mais estáveis em condições altamente ácidas ou alcalinas e altas temperaturas, além de apresentar elevada atividade e especificidade, está crescendo rapidamente, especialmente nas últimas décadas (Bhat, 2000; Haki & Rakshit, 2003). A vantagem de enzimas termofílicas e termoestáveis é que elas mantêm a sua atividade em operações a elevadas temperaturas (geralmente maiores que 45°C), que favorecem a solubilização e a redução da viscosidade dos substratos e produtos e aumentam a taxa de reação. Outra característica importante é a maior resistência à ação de proteases. Além disso, processos biotecnológicos em temperaturas elevadas têm o risco reduzido por contaminação de microrganismos mesófilos (Wojtczak *et al.*, 1987; Said & Pietro, 2004; Gomes *et al.*, 2007).

Celulases, hemicelulases e pectinases são produzidas por grande variedade de microrganismos, como bactérias, actinomicetos, fungos e leveduras. Entretanto, os fungos filamentosos são os microrganismos produtores mais eficientes de enzimas extracelulares (Warren, 1996, Jørgensen *et al.*, 2003; Shallom & Shoham, 2003; Guimarães *et al.*, 2006). Segundo Andraeus *et al.* (2009), os microrganismos são capazes de degradar holocelulose da parede celular das plantas, em função de uma bateria de enzimas que trabalham em sinergismo, denominadas de

holocelulases. O termo holocelulose é utilizado para descrever o conteúdo de carboidrato total contido no material lignocelulósico (Freer *et al.*, 1998), ou seja, após a remoção da lignina das estruturas da parede celular das plantas (Zhang *et al.*, 2008).

No panorama global, a partir dos anos 1970, a crise mundial de petróleo abriu perspectivas para a busca de fontes alternativas de energia renovável. Tornou-se prioridade o desenvolvimento de microrganismos com perfis adequados à alta produção de celulases. Avanços significativos foram obtidos em relação à caracterização dos complexos celulolíticos de bactérias e fungos (Eveleigh *et al.*, 1995).

Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social. Dentre eles, figuram os derivados da produção agrícola geradora de resíduos de culturas, como palha de cereais e de milho, sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros (Assis, 1994). Portanto, é importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grandes quantidades no país (Ramos, 1999). Os resíduos agrícolas e agroindústrias, no caso bagaço de cana, engaço de bananeira, resíduos de milho e soja e piolho de algodão, são utilizados como fontes de carbono para a produção de melhor atividade enzimática, a partir da inoculação de fungos filamentosos (basidiomicetos e deuteromicetos) para a obtenção de monossacarídeos, que poderão ser utilizados em indústrias que utilizam processos fermentativos (Ramos, 1999).

De acordo com inventário ambiental realizado pela Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções (ABIT), posição em agosto de 2003, o desempenho ambiental do setor têxtil brasileiro pode ser considerado satisfatório, com base nos dados a seguir: os destinos finais dos resíduos sólidos industriais mais empregados foram reciclagem/reutilização (79%), incineração(47%) e aterro industrial de terceiros (42%) (Fontenele & Sousa-Junior, 2004).

Nos diversos processos da indústria têxtil são gerados diferentes tipos de resíduos com diferentes composições químicas. Os resíduos de algodão são gerados na fiação e na tecelagem e equivalem a, aproximadamente, 8% do total do algodão processado (Lima, 1992) sendo, até então, pouco explorados. O resíduo de algodão é inconveniente por ocupar grandes espaços físicos e representar sério problema para a indústria têxtil, devido ao grande excedente acumulado nos aterros industriais, o que diminui consideravelmente sua vida útil. Sua utilização como fonte de combustível para caldeiras gera gases tóxicos, o que requer a instalação de filtros especiais e de custo elevado. Uma alternativa para utilizar grandes quantidades de resíduos de algodão de forma “ecologicamente correta” seria a produção de cogumelos comestíveis. Outro resíduo, denominado de engaço de bananeira, não tem sido aproveitado totalmente e, após o processo de separação das pencas, esse material acaba sendo descartado de forma inadequada, gerando sérios problemas ambientais e fitossanitários (Soffner, 2001). A utilização do engaço em processos biotecnológicos, como a produção de enzimas e de cogumelos, pode ser uma importante alternativa para este resíduo.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o perfil enzimático de celulases, hemicelulases e pectinases do fungo *Penicillium corylophilum*, quando crescido em catorze fontes de carbono agroindustriais sob agitação ou não-agitação do meio de cultura líquido (submerso), com purificação parcial por ultrafiltração e cromatografias de baixa pressão, como filtração em gel e troca iônica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Análise bromatológica dos resíduos agroindustriais

As análises bromatológicas dos resíduos utilizados nos cultivos e para hidrólise enzimática foram realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciência dos Alimentos

e no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

Todos os resíduos foram secados, a 60°C, por 48 horas, moídos e, posteriormente, embalados em sacos plásticos de polietileno e armazenados até a temperatura de 20° a 25°C. As análises de umidade e matéria seca foram realizadas com os substratos sem nenhum tipo de tratamento prévio.

A proteína bruta, ou proteína total, foi determinada pelo método microkjeldahl, conforme procedimento da AOAC (1995). Os teores de extrato etéreo, ou seja, gordura total, foram determinados com éter etílico, por meio de aparelho de Soxhlet (AOAC, 1995). Os teores de cinzas foram determinados pelo método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso do material submetido a aquecimento a 550°C (AOAC, 1995). A fibra bruta foi determinada segundo metodologia da AOAC (1995).

Os teores de lignina, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), matéria seca, umidade, lignina, hemicelulose e celulose foram determinados segundo metodologia proposta por van Soest & Wine (1967), citados por Silva (2002). A porcentagem de carboidrato foi calculada pela diferença: 100 - (fibra + gordura + cinzas + proteínas). As determinações de cálcio foram realizadas por espectrofotômetro de absorção atômica, à longitude de onda de 422,7 nm, enquanto o fósforo foi determinado mediante espectrofotômetro de UV visível, à longitude de onda de 420 nm.

2.2 Produtos químicos e substratos

Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Os resíduos agroindustriais utilizados neste trabalho como fonte de carbono foram adquiridos em fazendas da região rural e também em fazendas de cidades do entorno do Distrito Federal. Os resíduos do beneficiamento de algodão, classificados como piolho-de-algodão-sujo, piolho-de-algodão-limpo e pó-de-filtro, foram adquiridos da indústria de rebeneficiamento de algodão Hantex Resíduos Têxteis, em Gaspar, SC.

2.3 Cultivo do fungo – com agitação e sem agitação

O fungo foi cultivado em triplicata, utilizando-se erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido (meio suplementar – MS), com a seguinte composição em g/L: 7,0 g de KH_2PO_4 ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 g de extrato de levedura e 1% de resíduo agroindustrial como fonte de carbono, em pH 7,0. A inoculação foi feita por suspensão de esporos (10^8 esporos/mL – relação de 1 mL de solução de esporos/100 mL de meio de cultura), obtidos de culturas de rotina. O cultivo foi feito sob agitação, a 120 rpm, em agitador rotatório (shaker), enquanto o cultivo em repouso foi em *biological oxygen demand*, ou BOD, na ausência de luz. A temperatura, para ambos os cultivos foi de 28°C, durante 5 dias. Os cultivos (com e sem agitação dos 14 tratamentos – T1 a T14) foram filtrados a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro comum para separar a massa micelial e os substratos do sobrenadante. Os filtrados resultantes foram utilizados como fonte de enzimas, sendo denominados extrato bruto do *P. corylophilum* para cada fonte de carbono e condição de cultivo.

2.4 Determinação da atividade enzimática das holocelulases

Foram determinadas as atividades enzimáticas dos extratos brutos e parcialmente purificados por cromatografia em filtração em gel dos tipos Sephacryl S-200 e S-400, para atividades de celulasas, hemicelulasas e pectinases, segundo o método *dinitro-salicylic acid*, ou DNS (Miller, 1959).

Os ensaios enzimáticos para a determinação de endoglicanase (CMCase), xilanase, pectinase e mananase foram realizados pelo método de DNS, tendo 50 μL de enzima e 100 μL de substrato; os três primeiros ensaios foram realizados com solução de 1% do substrato e de 0,5% para o último ensaio, reagindo por 30 minutos, a 50°C. Após este tempo, foram adicionados 300 μL de DNS e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrômetro a 540 nm. Para o ensaio de FPase (celulase total), foi utilizado papel Whatman número 1, em forma de tiras de 1x6cm, com, aproximadamente, 50 mg de massa como substrato e 150 μL de enzimas, que foram incubadas, por 1 hora, a 50°C. Para a determinação de avicelase (exoglicanase), utilizaram-se 100 μl de solução 1% de celulose microcristalina (avicel) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, 50 μL de solução de enzima por 2 horas, sob agitação, a 50°C. Os ensaios de FPase e avicelase foram interrompidos e analisados como descrito acima.

Para a determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas as curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para calibração, foi utilizada uma solução estoque de 2 mg/mL, para cada açúcar redutor (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico), variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, totalizando sempre o volume de 150 μL . Assim, foram construídos 5 pontos para plotagem no gráfico de regressão linear. Do gráfico, foi obtida a equação da reta, que foi utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a adição de 300 μL de DNS, com fervura por 10 minutos e leitura a 540 nm. Para todos os ensaios enzimáticos, utilizou-se $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ como unidade de açúcar redutor liberada durante todo o tempo de duração..

2.5 Cromatografia de filtração em gel S-400 e S-200

A purificação parcial foi realizado à temperatura ambiente. Os extratos brutos do cultivo com agitação do *P. corylophilum* em engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar e piolho-de-

algodão-sujo foram concentrados (10x) por ultrafiltração, utilizando-se sistema de filtragem de membrana da Amicon System com retenção de 300 KDa (PM 300). Alíquotas das amostras concentradas em PM 300 foram fracionadas em cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-400, 2,5 x 60,0 cm), enquanto alíquotas das amostras ultrafiltradas foram fracionadas em Sephacryl S-200 (2,5 x 40,0 cm), em colunas pré-equilibradas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,15 M de NaCl. Frações de 5 mL foram coletadas em fluxo de 20 mL/h. Frações correspondentes às holocelulases foram coletadas e armazenadas a 4°C.

Após a corrida da amostra nas colunas de Sephacryl S-400 e S-200, foram determinados os perfís de eluição de proteína total a 280 nm, como também as atividades enzimáticas para celulases (FPase, CMCase e avicelase), hemicelulases (xilanase e mananase) e pectinase (poligalacturonase).

3. Resultados e discussões

A análise bromatológica dos resíduos ligninocelulósicos demonstraram que as amostras de engaço de bananeira (banana prata) tiveram valores significativos de cinzas, proteína total e lignina (Tabela 1). Para proteína total, o valor que se destacou foi o da amostra casca de grão de soja com mais de 17%, enquanto os resíduos de cana-de-açúcar (bagaço e palha) e os da colheita de milho foram os que tiveram os menores percentuais, em torno de 3% (Tabela 1). As cascas de grão de soja e os resíduos da colheita da soja tiveram os valores mais significativos para os teores de gordura total, como também o engaço de bananeira. No entanto, os resíduos da colheita de milho, bagaço de cana-de-açúcar e piolho-de-algodão-limpo tiveram os mais baixos teores de gordura total, com cerca de 1%. O maior percentual de lignina foi apresentado pelos resíduos da colheita da soja e engaço de bananeira com 7,4%, enquanto que os derivados dos resíduos de milho tiveram os menores índices. Os maiores índices de celulose foram mostrados pelos resíduos da colheita de milho e piolho-de-algodão-limpo, com percentuais por volta de 75%. Porém, os teores de holocelulose, somatório de celulose com hemicelulose tiveram valores superiores a 80% para palha da espiga de milho e pó-de-filtro (resíduos de re-beneficiamento das fibras de algodão) que, por sua

vez, teve o maior percentual de hemicelulose. Os carboidratos solúveis e calorias tiveram no bagaço de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho os valores com maior significância, enquanto o pó-de-filtro-algodão foi o que teve menor representatividade (Tabela 1).

Castro *et al.* (2004) avaliaram a constituição bromatológica de resíduos de lixadeira da indústria de beneficiamento de algodão, quando utilizados na produção de composto para cogumelos comestíveis. A constituição deste resíduo foi de 1,22%, 94,4%, 91,34%, 89,59%, 3,06% e 1,77%, para proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Já este resíduo de algodão suplementado com farelo de trigo (20%) apresenta teores de 57% e 12% para celulose e hemicelulose, respectivamente, e 4% de proteína total (Gonçalves *et al.*, 2010). A disposição em local aberto dos variados resíduos da indústria de beneficiamento do algodão é um grande problema ambiental, como é o caso deste resíduo de lixadeira (Santos *et al.*, 2004).

Segundo Soffner (2001), o engaço de bananeira é a estrutura que sustenta as pencas de bananas na bananeira e este material é jogado no lixo no momento da separação das pencas nas chamadas *packing-house* ou deixados no solo dos bananais. Esta mesma autora fez a análise bromatológica do engaço da *Musa acuminata cavendishii* (variedade: Grande naine ou nanicão), que apresentou 93% de umidade, como também 8,79%, 46,75% e 44,46% para lignina, extrativos totais e holocelulose, respectivamente. Segundo Siqueira *et al.* (2010 *in press*), os teores de holocelulose para o engaço de bananeira da variedade nanicão cultivadas no sul de Minas Gerais foram de, aproximadamente, 40%, 18% de lignina e 7,6% de proteína bruta, tendo resultados significativos na produção de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* na forma axênica. O engaço de bananeira também apresentou resultados significativos como fonte de carbono utilizada para a produção de hemicelulases de fungos filamentosos (Medeiros *et al.*, 2008).

Holtz *et al.* (2007) apresentaram teores de holocelulose de 71,5% para o resíduo proveniente do beneficiamento de algodão na indústria têxtil que foi utilizado como fonte nutricional para o

cultivo de cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. Segundo a descrição feita por Zambom *et al.* (2001), a casca de soja possui, aproximadamente, 60% de holocelulose e 8,22% de lignina, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Porém, ressalta-se que, no presente trabalho, foram utilizados não somente cascas do grão de soja, como também restos das vagens, troncos e folhas do pé-de-soja. Os teores de holocelulose para dois tipos de resíduos de milho apresentam teores entre 74% e 86%, sendo estes valores próximos aos encontrados para os resíduos da colheita de milho deste experimento, porém, divergem nos teores para lignina, pois Rubio *et al.*, (1998) relataram que o teor é de 14%. O bagaço de cana-de-açúcar, segundo Sun *et al.* (2004), tem de 40% a 50% de glicose, que constitui a celulose, formando uma estrutura cristalina e de 25% a 35% de hemicelulose, que é composto de xilose, arabinose, galactose, glicose e manose, tendo, assim, em sua estrutura holocelulósica, entre 65% a 80% de carboidratos, conforme descrito neste trabalho.

As fontes de carbono borra de café e celulose microcristalina (Sigmacell) não foram avaliadas bromotologicamente, pois estes dois substratos foram incluídos no experimento após o envio das amostras para análise nos laboratórios da UFLA

Tabela 1. Análises bromatológicas dos resíduos agroindustriais utilizados nos cultivos submersos como fontes de carbono para o fungo *Penicillium corylophilum*.

Resíduos lignocelulósicos	% Cinzas	% Matéria seca	% Proteína total	% Gordura	% FDA	% FDN	% Carboidratos	Quilocalorias (kcal g*100g)	% Hemicelulose	% Celulose	% Lignina	% Cálcio	% Fósforo
Casca do grão de soja	5,4	90,1	17,5	3,5	49,6	66,3	29,4	219,0	16,7	44,4	5,2	0,66	0,2
Resíduos da colheita da soja	3,6	90,8	7,5	2,5	61,3	71,7	41,5	218,5	10,4	51,9	9,4	0,78	0,08
Palha da espiga de milho	1,6	90,8	5,3	1,5	47,8	86,8	52,7	245,1	39,0	43,4	4,3	0,09	0,04
Sabugo de milho	4,2	90,0	5,9	1,7	40,5	72,0	55,5	260,7	31,5	37,0	3,5	0,01	0,11
Resíduos da colheita do milho	3,4	90,8	3,6	1,1	80,2	80,8	50,7	226,7	0,6	75,9	4,3	0,16	0,06
Resíduos de algodão - pó de filtro	1,2	93,2	5,0	1,5	45,3	93,1	5,6	55,3	47,7	40,8	4,5	0,27	0,07
Piolho de algodão "limpo"	2,8	92,8	6,2	1,1	77,8	81,9	20,8	118,1	4,1	73,0	4,8	0,53	0,1
Piolho de algodão "sujo"	4,6	91,5	6,9	1,8	72,0	81,8	30,0	163,7	9,8	65,7	6,3	1,01	0,14
Engaço de bananeira - banana-prata	7,8	91,6	8,6	2,3	62,3	79,8	36,7	202,0	17,4	52,9	9,4	0,98	0,09
Palha da cana-de-açúcar	5,7	90,6	3,7	2,6	52,5	71,7	47,6	228,5	19,2	47,0	5,5	0,57	0,03
Bagaço da cana-de-açúcar	0,8	92,4	3,1	1,2	39,7	55,9	64,7	281,7	16,2	34,6	5,1	0,02	0,03
Resíduos da colheita de feijão	0,0	90,2	6,1	1,4	50,7	72,6	30,9	160,7	21,9	44,1	6,6	0,62	0,09

Os extratos brutos derivados dos cultivos com agitação foram mais significativos do que o meio de cultivo estático (sem agitação) para as atividades de holocelulases em praticamente todos os tratamentos. A atividade de xilanase proveniente do meio sob agitação destacou-se entre as holocelulases testadas neste experimento. Os resíduos derivados da colheita do milho em cultivo com agitação mostraram maior relevância entre as fontes de carbono lignocelulósicas testadas para atividades de xilanase (Figura 1). No entanto, os resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, pilho-de-algodão-sujo e limpo, palha da cana-de-açúcar e resíduos da colheita de feijão também apresentaram atividades significativas para xilanase, com cerca de 80% dos melhores resultados observados entre os resíduos da colheita de milho.

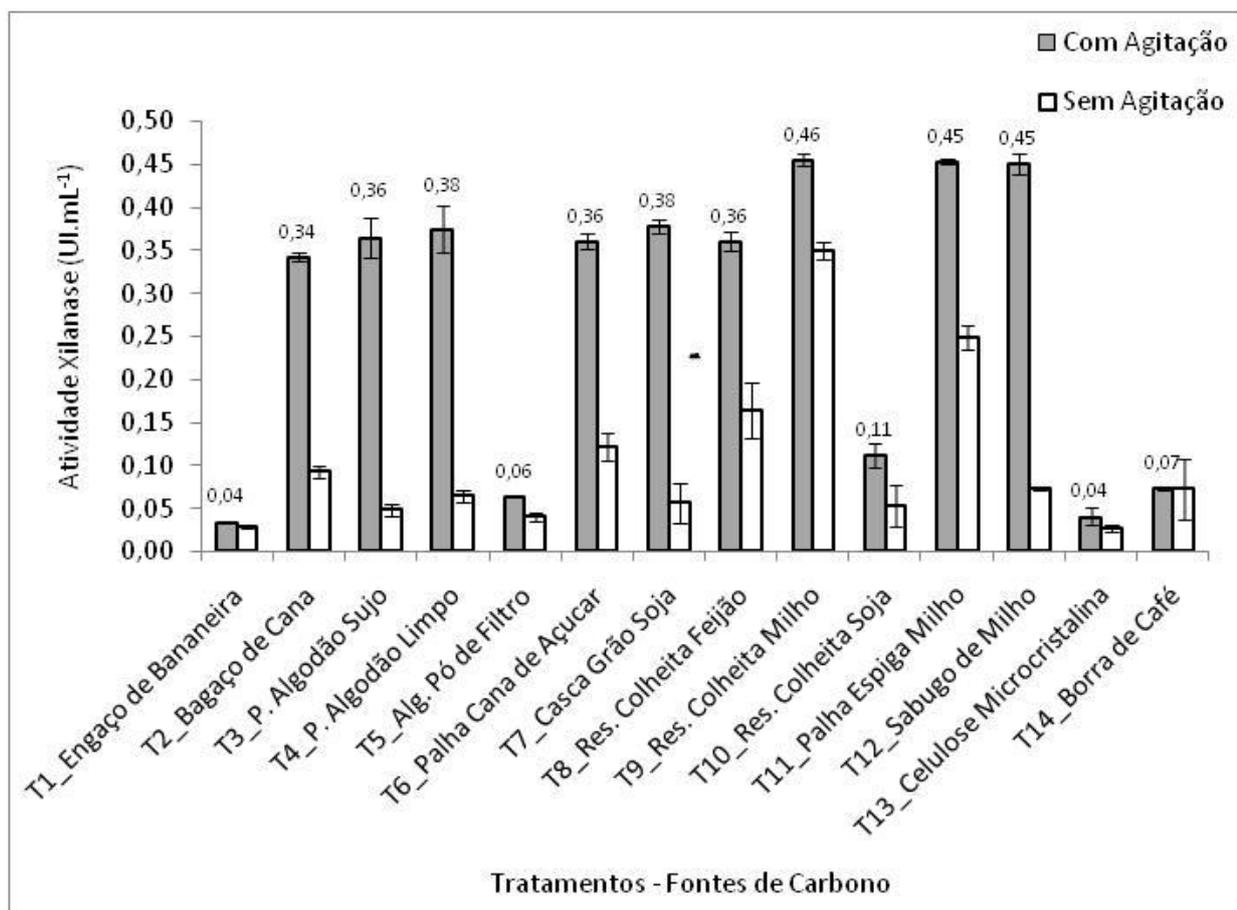


Figura 1. Atividade de xilanase dos extratos brutos de *Penicillium corylophilum* (INPA) cultivado em diferentes resíduos agrícolas com e sem agitação, em cultivo submerso.

Os resíduos da colheita de milho também apresentaram resultados significativos para as atividades de mananases, porém, o pilho-algodão-limpo foi o mais expressivo, apesar de ter um erro padrão significativo quando comparado aos demais resíduos; o bagaço de cana-de-açúcar apresentou valores com pouca variação de mananases, quando comparado com os resultados mais expressivos (Figura 2). Os valores de atividade de mananase não foram muito expressivos, quando comparados com outros resultados obtidos no Laboratório de Enzimologia, com outros fungos testados neste trabalho, como foi o caso dos fungos do gênero *Aspergillus*, que foram isolados de compostagem de resíduos de algodão e também cultivados em resíduos lignocelulósicos (Capítulo VII).

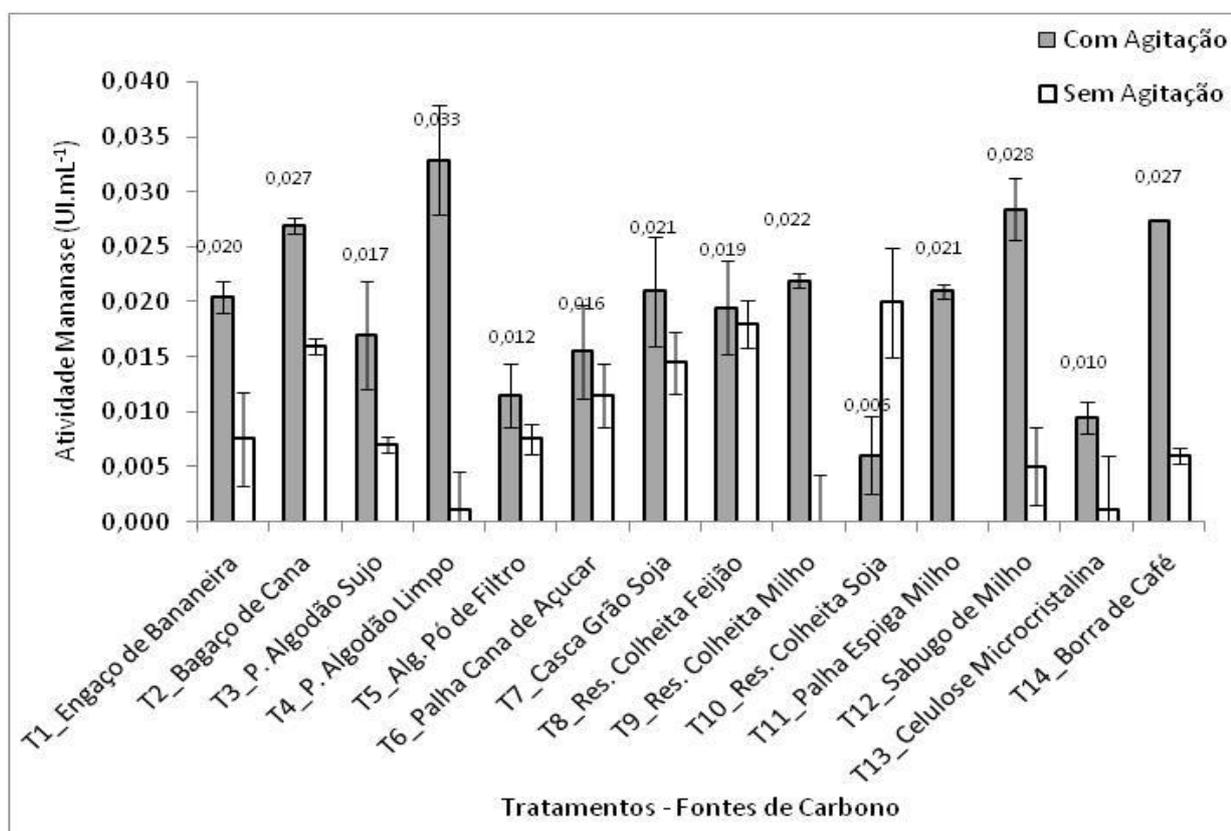


Figura 2. Atividade de mananase dos extratos brutos de *Penicillium corylophilum* (INPA) cultivado em diferentes resíduos agrícolas com e sem agitação, em cultivo submerso.

As atividades de CMCase e pectinase do *P. corylophilum* (Figuras 3 e 4) também não foram expressivas, quando comparadas com os resultados obtidos com *Aspergillus* sp. (Capítulo VII). O bagaço de cana-de-açúcar em cultivo sob agitação foi o substrato com maior relevância entre os

demais testados para atividade de CMCase (Figura 3), enquanto a atividade de pectinase, na condição de não-agitação, apresentou, para alguns substratos, valores sem diferença significativa com relação a atividades sob condição de agitação do meio de cultivo, como foi os casos dos resíduos da colheita de feijão e bagaço de cana-de-açúcar, borra de café, resíduos da colheita de soja e sabugo de milho.

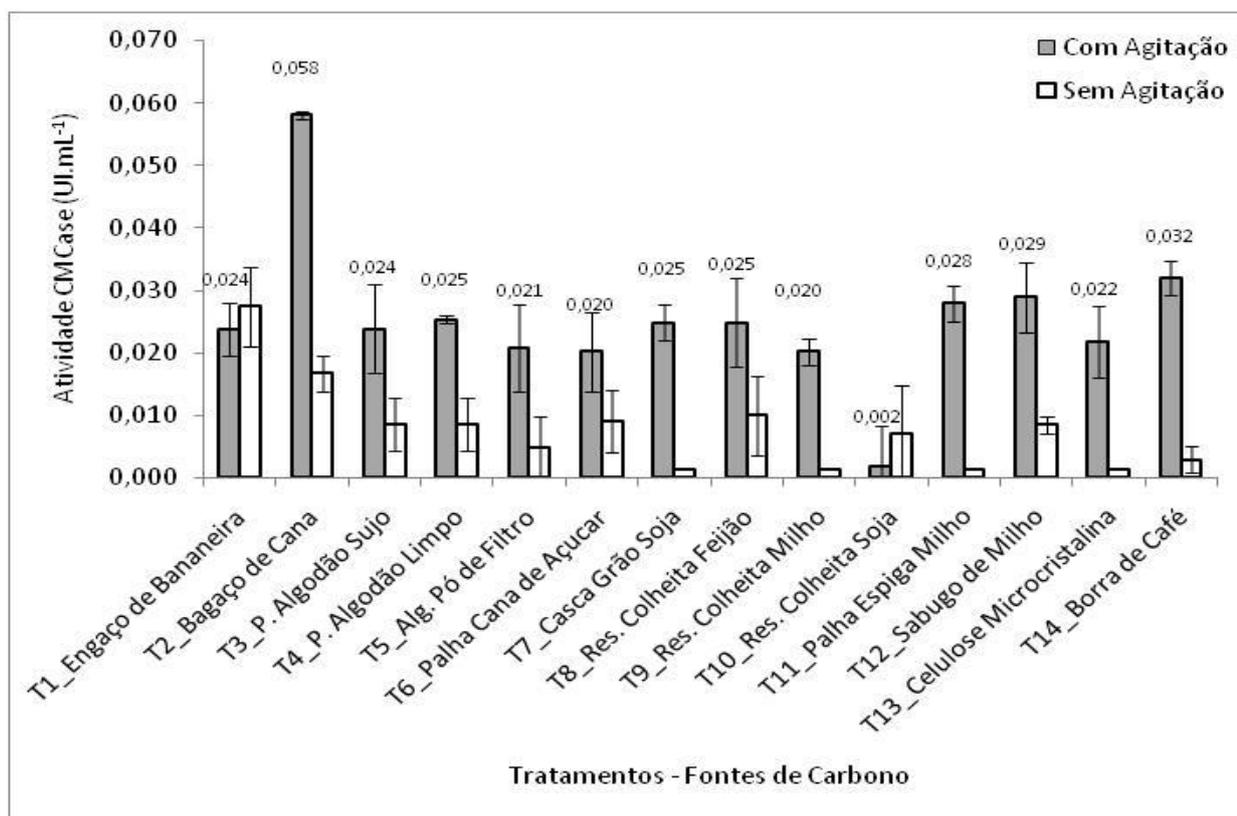


Figura 3. Atividade de CMCase de *Penicillium corylophilum* (INPA) cultivado em diferentes resíduos agrícolas com e sem agitação, em cultivo submerso.

O *P. corylophilum* tem sido isolado de diversas fontes lignocelulósicas, tais como casca de arroz, casca de frutas, troncos em decomposição, solo, etc. (Hamlyn *et al.*, 1987; Taekema, *et al.*, 1994; Medeiros, *et al.*, 2003). As atividades enzimáticas desse fungo vêm sendo exploradas a partir do crescimento em meios de cultura submerso ou sólido, em fontes de carbono lignocelulósica, como farelo de trigo, palhas e resíduos de colheitas agrícolas e de subprodutos de beneficiamento industrial (Chávez *et al.*, 2006). Beneficiamento de jutas na indústrias têxteis ganhou melhor

qualidade quando extrato bruto de *P. corylophilum* crescido em casca de arroz como fonte de carbono foi aplicado ao processo (Basak *et al.*, 2004).

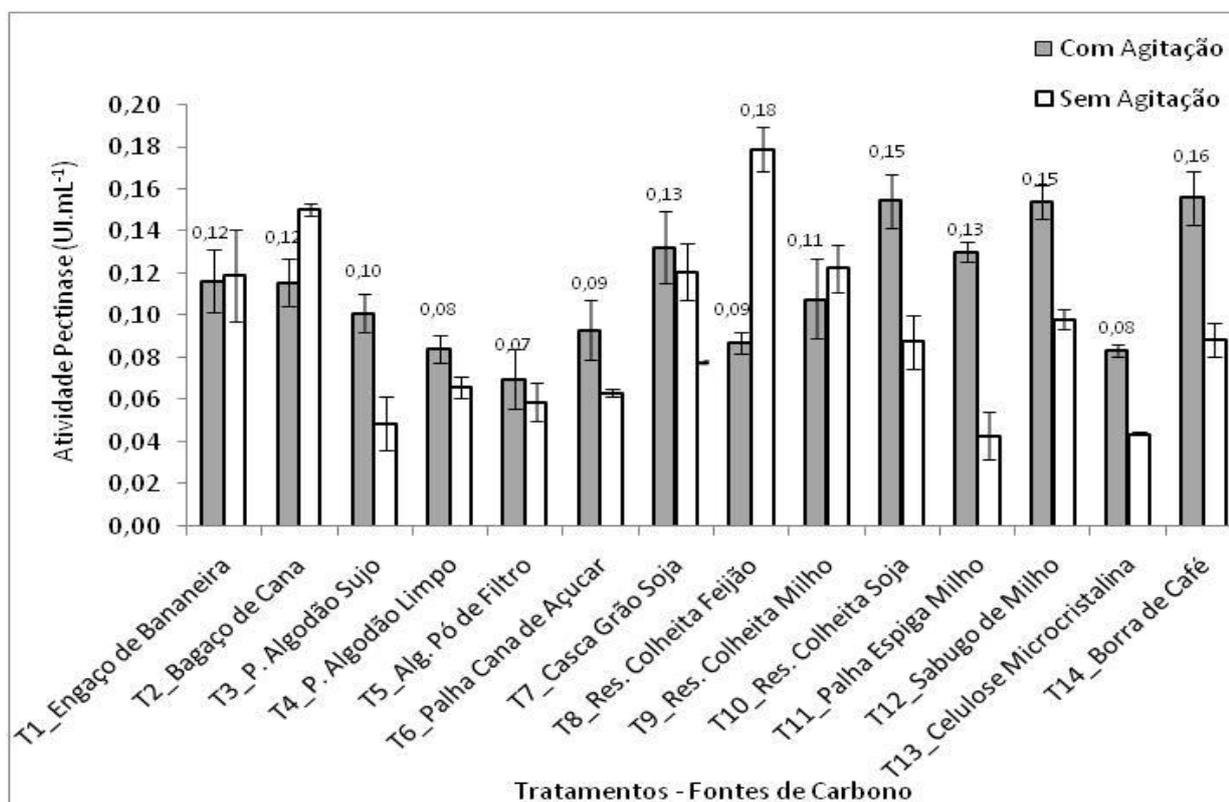


Figura 4. Atividade de pectinase de *Penicillium corylophilum* (INPA) cultivado em diferentes resíduos agrícolas com e sem agitação, em cultivo submerso.

Os extratos brutos de *P. corylophilum* crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, pilho-de-algodão-sujo e engaço de bananeira foram ultrafiltrados em membrana Amicon do tipo PM 300, concentrada a 10%. As amostras de concentrados foram aplicados em coluna cromatográfica do tipo Sephacryl S-400, enquanto os ultrafiltrados foram submetidos à cromatografia do tipo Sephacryl S-200. Apesar de outros resíduos lignocelulósicos terem apresentados valores mais significativos para algumas atividades de holocelulases, como xilanases, a escolha destes três substratos se deu em função de resultados obtidos em trabalhos executados anteriormente no

Laboratório de Enzimologia, utilizando-se outras cepas de *Penicillium corylophilum* (dados não apresentados).

O perfil cromatográfico em coluna de Sephacryl S-200 das amostras de ultrafiltrados dos tratamentos com engaço, bagaço e piolho-de-algodão-sujo mostraram somente um pico de atividade de xilanase em cada um dos substratos-cultivo (Figuras 5, 7 e 9). O ultrafiltrado de piolho-de-algodão-sujo apresentou o pico com maior atividade de xilanase, assim como também a menor atividade para outras atividades de holocelulases nas frações em torno do pico de xilanase (Figura 7). O ultrafiltrado em bagaço de cana-de-açúcar teve o pico de xilanase na fração 35, aproximadamente, da mesma forma que o engaço de bananeira, enquanto o pilho-de-algodão teve o pico na fração 50, mostrando, assim, que estas enzimas, apesar de serem do mesmo fungo, têm características diferentes quanto à massa molecular (Figuras 5, 7 e 9).

Medeiros *et al.* (2003) purificaram parcialmente uma xilanase oriunda de extrato bruto de *P. corylophilum* crescido em meio submerso, com arabinoxilana como fonte de carbono, utilizando cromatografias de filtração em gel e troca iônica. Dados na literatura reforçam que o extrato bruto deste cultivo apresenta ação efetiva na melhora da qualidade de polpa celulósica de papel kraft, conforme análises por microscopia de força atômica (Medeiros *et al.*, (2007). O uso de xilanases de espécies de *Penicillium* sp. em processos biotecnológicos vem aumentando significativamente (Chávez *et al.*, (2006).

Nas figuras 6, 8 e 10 estão representados os picos de atividades para holocelulases dos concentrados em PM 300. As cromatografias de filtração em gel para os concentrados de engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo mostram dois picos proteicos significativos, sendo o primeiro próximo à fração 25 e 60 para o segundo (Figuras 6 e 8), enquanto o concentrado de bagaço de cana-de-açúcar teve apenas um único pico proteico na fração 55 (Figura 10).

Os picos de atividades das holocelulases foram diversificados em S-400 (Figuras 6, 8 e 10), no entanto, a maioria destas atividades situou-se junto aos picos proteicos, coeluinto nos principais. Porém, algumas atividades de xilanase e, principalmente, de pectinase demonstraram picos de atividades diversificados na cromatografia com S-400. Nesta cromatografia, o extrato bruto concentrado de bagaço de cana-de-açúcar foi o que apresentou a maior multiplicidade de picos para pectinase.

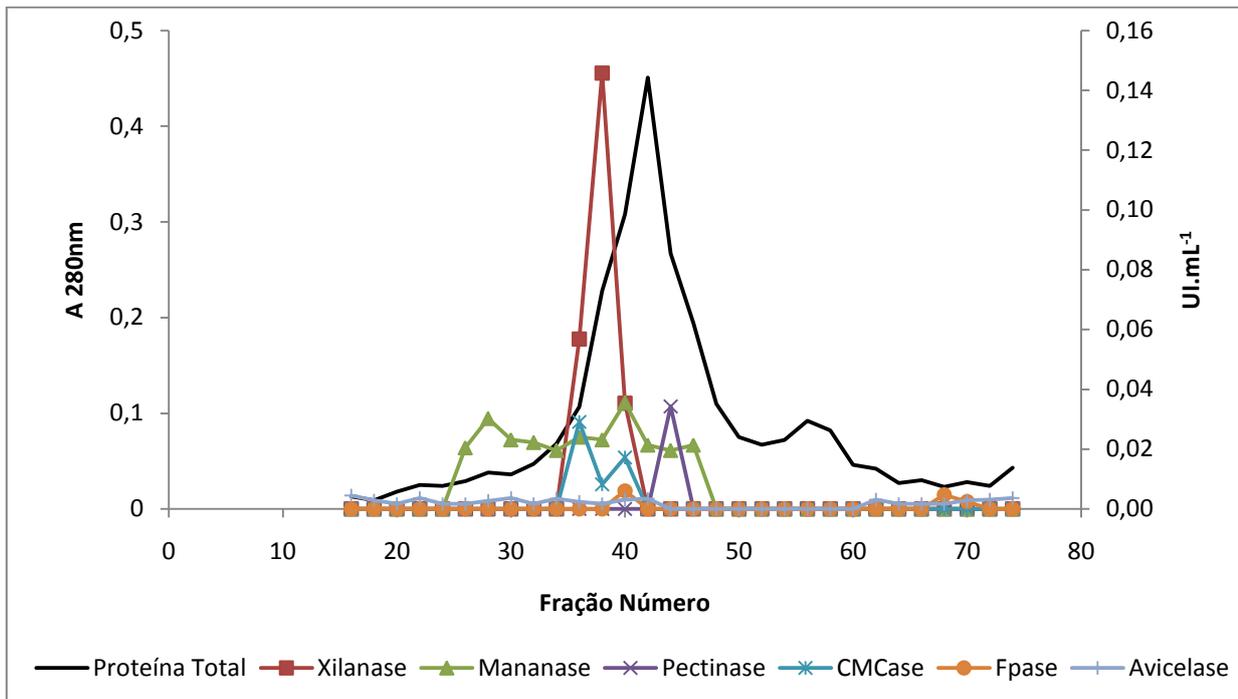


Figura 5. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em engaço de bananeira com agitação, ultrafiltrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200).

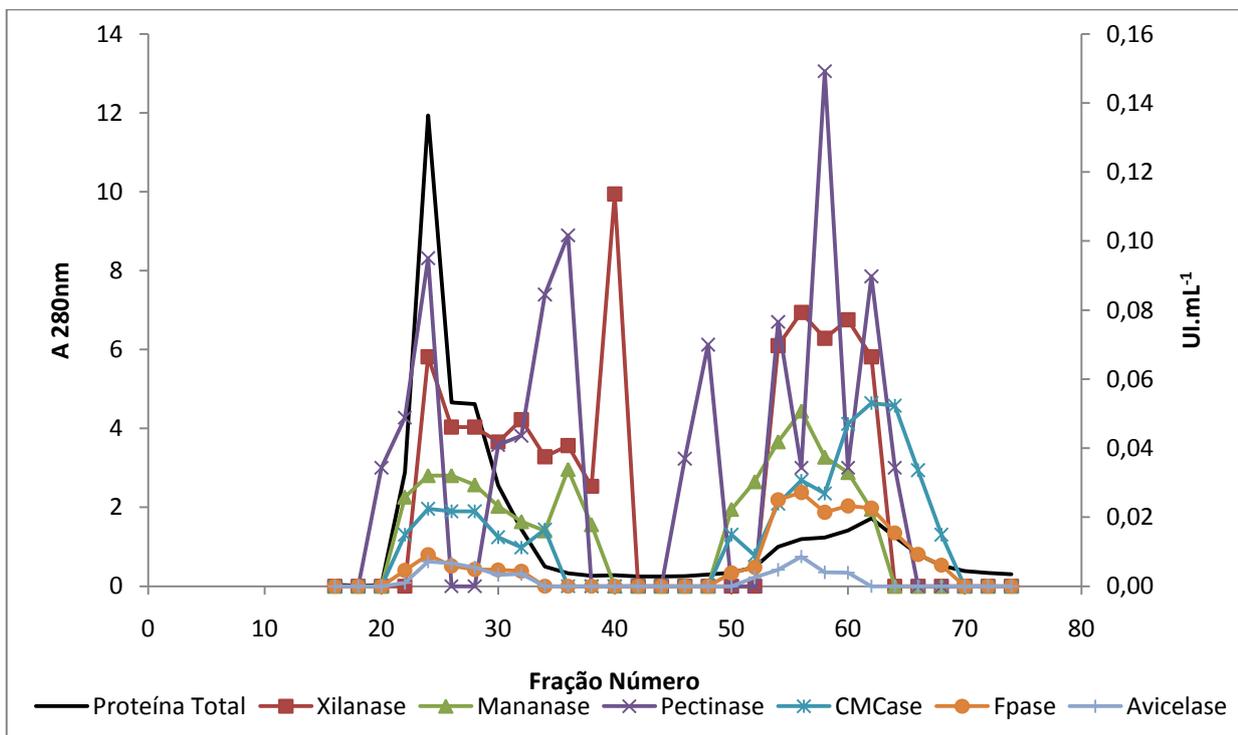


Figura 6. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em engaço de bananeira com agitação, concentrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-400).

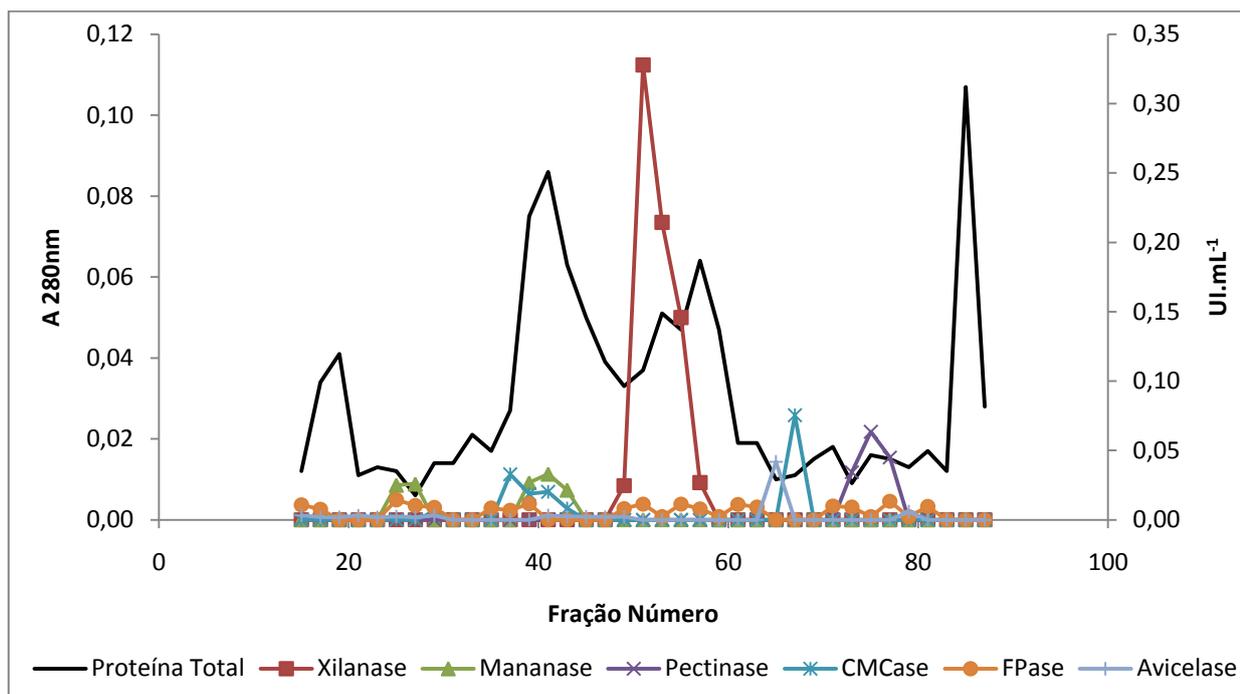


Figura 7. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em piolho-de-algodão-sujo com agitação, ultrafiltrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200).

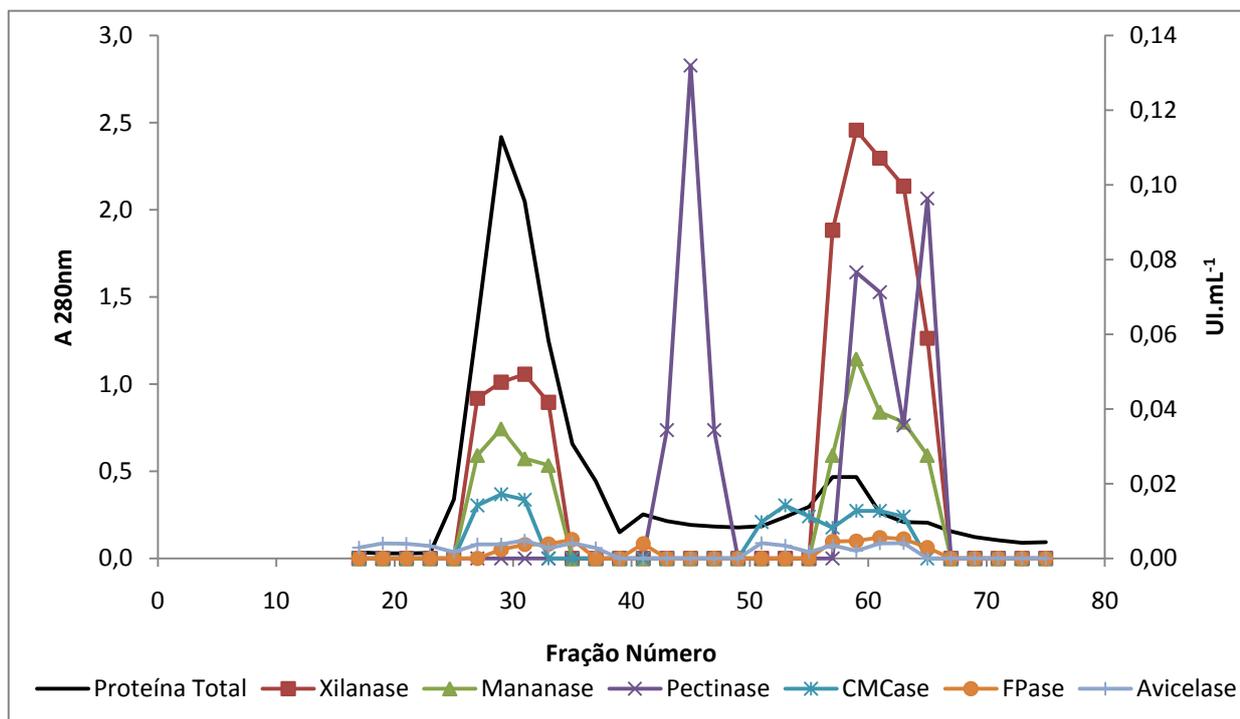


Figura 8. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em piolho-de-algodão-sujo com agitação, concentrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-400).

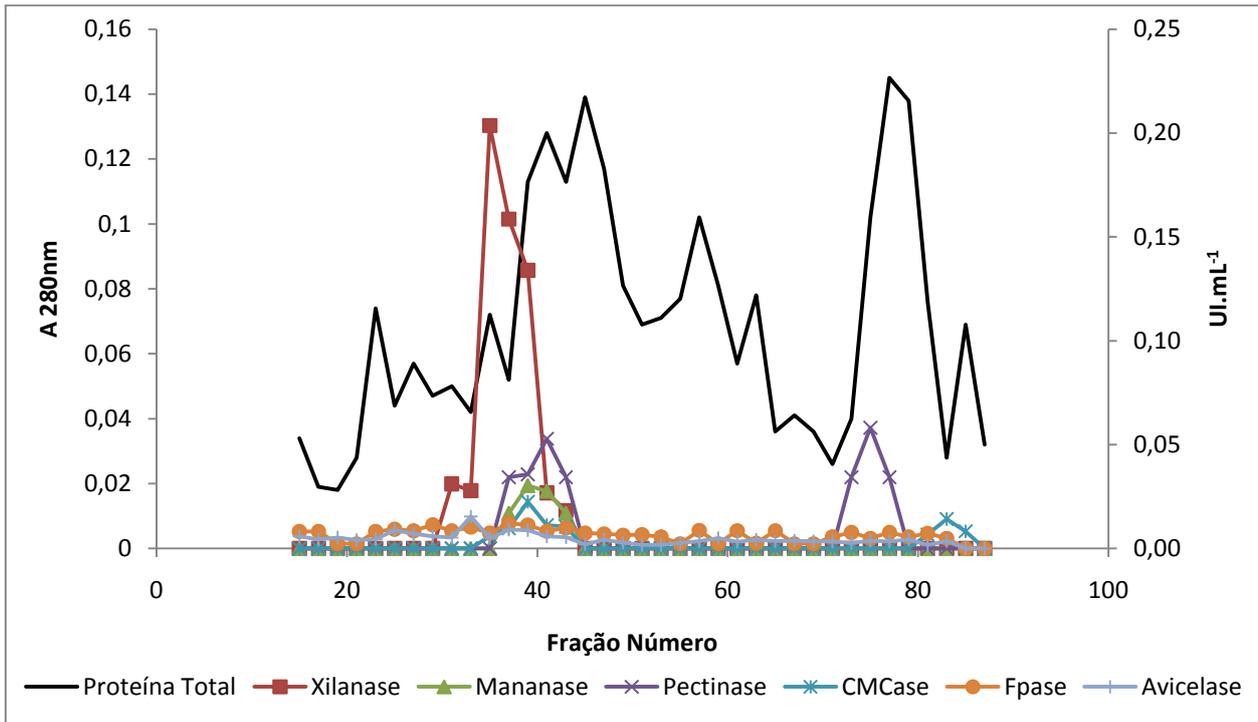


Figura 9. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em bagaço de cana-de-açúcar com agitação, ultrafiltrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200).

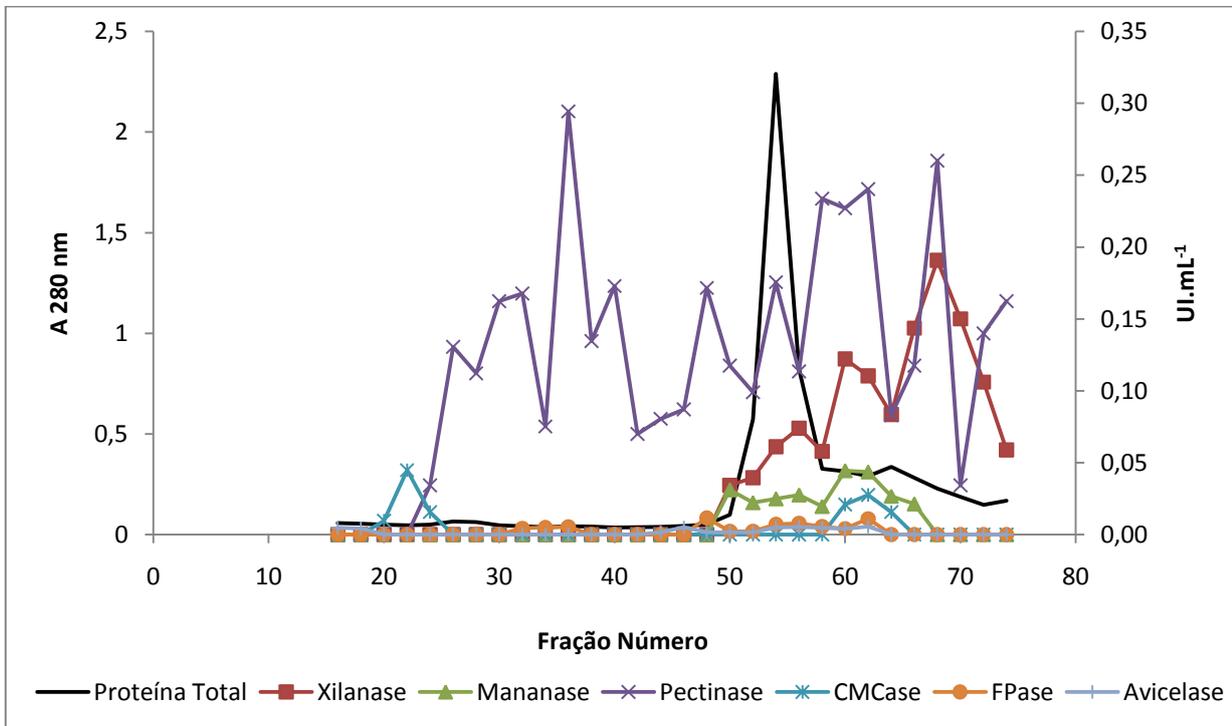


Figura 10. Atividades de holocelulases do extrato bruto de *P. corylophyllum* crescido em bagaço de cana-de-açúcar com agitação, concentrado em PM 300 e submetido à cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-400).

4. Conclusões

Os resíduos lignocelulósicos derivados da colheita do milho apresentaram atividade de xilanase significativa no cultivo submerso com *Penicillium corylophilum*, como também para os resíduos do rebeneficiamento de algodão (piolhos-de-algodão), bagaço e palha da cana-de-açúcar. A atividade de xilanase também foi relevante quando os três extratos brutos (bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e pilho-de-algodão-sujo) foram submetidos à purificação em cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200). Diminuir os custos de produção de enzimas extracelulares fúngicas é objeto de várias pesquisas. Desse modo, o uso de resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono no meio de cultivo demonstra ser uma alternativa para se alcançar esta meta. As hemicelulases dos extratos brutos provenientes do *P. corylophilum*, nas condições deste trabalho, apresentam atividades que podem ser exploradas para aplicações biotecnológicas.

5. Referências

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (1995). **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**, 16 ed, Whashington.
- ASSIS, P.E.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. **Symposium of Technological Innovations in the Sugar Cane Agro-industry – STAB**, 1994, 13, 10-12.
- BASAK, M.K.; GANGULY, P.K.; BHADURI, S.K.; SARKAR, S. 2004. Industrial production of *Penicillium corylophilum* on rice husk and its application in jute processing. **Indian Journal of Biotechnology**, 3, 70-73.
- BHAT, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. 18, 355-383.
- CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A.; DIAS, E.S.; SANTOS, J. 2004. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, 28(3):608-613.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, 123, 4, 413-433.
- EVELEIGH, D.E. ; BOK, J.D.; EL-DORRY, H.; ELGOGARY, S.; ELLISTON, K. GOYAL, A.; WALDRON, C.; WRIGHT, R.; WU, Y.M. 1995. Cellulase lessons revealed through the microbe's perspective. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51-52, p. 169-177.
- FONTENELE, R.E.S.; SOUSA-JUNIOR, K.C. Gestão Ambiental e Competitividade Internacional do Setor Têxtil do Ceará. In: **XVII Congresso Latino-Americano de Estratégia**, 2004, Itapema - Santa Catarina.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. 2007. Enzimas Termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. **Química Nova**. 30, 1, 136-145.
- GONÇALVES, C.C.M.; PAIVA, P.C.A., DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G., HENRIQUE, F. 2010. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (fries) sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência Agrotecnológica**, 34, 1, 220-225.
- 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.; POLIZELI, M.L.T.M. 2006. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, 3, 474-480.
- HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. **Bioresource Technology**, 89, 17-34.
- HAMLYN, P.F.; WALES, D.S.; SAGA, B.F. 1987. **Extracellular enzymes of *Penicillium***. Biotechnology Group, Shirley Institute, Manchester, UK. books.google.com
- HOLTZ, M.; SILVEIRA, M.L.L.; WISBECK, E. 2007. Caracterização e utilização do resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de corpos frutíferos de *Pleurotus Ostreatus*. In: **VI**

- Congresso Brasileiro do Algodão**, 2007, Uberlândia - MG. VI Congresso Brasileiro do Algodão. Campinas - SP : Editora Esphera, 2007. v. VI. p. 13-13.
- JØRGENSEN, H.; KUTTER, J. P.; OLSSON, L. 2003. Separation and Quantification of Cellulases and Hemicellulases by Capillary Electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. 317, 85-93.
- LIMA, J.J. 1992. **Controle do processo de fiação**. Rio de Janeiro: SENAI/CETIQT
- MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E.X.. 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 52, 2, 97-100
- MEDEIROS, R.G.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; SILVA-JR., F.G.; FERREIRA-FILHO, E.F. 2007. The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology** 40, 4, 723-731.
- MEDEIROS, R.G.; SOFFNER, M.L.A.P.; THOMÉ, J.A.; CACAIS, A.O.G.; ESTELLES, R.S.; SALLES, B.C.; FERREIRA, H.M.; LUCENA NETO, S.A.; SILVA-JR, F.G.; FILHO, E.X.F. 2008. The Production of Hemicellulases by Aerobic Fungi on Medium Containing Residues of Banana Plant as Substrate. **Biotechnology Progress**, 16(3): 522-524.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426-428.
- RAMOS, L.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**, Londrina, PR, 17 a 21 de maio de 1999, p. 233-236.
- RUBIO, M.; TORTOSA, F.J.; QUESADA, J.; GÓMEZ, D. 1998. Fractionation of lignocellulosics. Solubilization of corn stalk hemicelluloses by autohydrolysis in aqueous medium. **Biomass and Bioenergy**, 15, 6, 483-491.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. 2004. Enzimas Termoestáveis Industrialmente Importantes. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004. Cap. 2, p. 9-20.
- SANTOS, J.; CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A.; BANYS, V.L. 2004. Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, 28(4):919-923.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**. 6, 219-228.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. 2002. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Universidade de Viçosa, Brasil, p.235.
- SIQUEIRA, F.G.; MARTOS, E.T.; SILVA, R.; DIAS, E.S. Biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* cultivation in banana stalk and Bahia grass based substrates, **Revista Horticultura Brasileira**, código de tramitação (*in press*) em 2010.
- SOFFNER, M.L.A.P. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira**. São Paulo, Brasil, 67p. (M.Sc. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP), 2001.

- SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SUN, Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**. 56(2):195-204.
- TAEKEMA, S.; KOLKMAN, I.; SOYTONG, K. 1994. Isolation of soil fungi in the north east of Thailand. **Journal of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (Thailand)**, v. 2 (2) p. 16-27.
- van SOEST, P. J.; WINE, R. H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds, IV. Determination of plant cellwall constituents. **Journal Assoc. Anal. Chem.**, 50(1):50-51.
- WARREN, R.A.J. 1996. Microbial Hydrolysis of Polysaccharides. **Annu. Rev. Microbiol.** 50, 183-212.
- WOJTCZAK, G.; BREUIL, C.; YAMADA, J.; SADDLER, J.N. 1987. A Comparison of the Thermostability of Cellulases from Various Thermophilic Fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 27, 82-87.
- ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C. SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. 2001. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, 23, 4, 937-943, 2001.

Capítulo III

Perfil de holocelulases de *Aspergillus flavus* crescido em biomassa lignocelulósica

Félix Gonçalves de Siqueira¹; Eliane Gonçalves de Siqueira¹; Leonora Rios de S. Moreira¹, Gaspar Virgílio Ferreira¹, Paula Marcela Duque Jaramillo²; Ricardo Sposina Sobral Teixeira³, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹.

¹Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. ²Laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil. ³Laboratório de Tecnologia Enzimática, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/RJ, Brazil.

RESUMO

O fungo mesofílico *Aspergillus flavus* é descrito, na literatura, como comopolita e capaz de crescer ou degradar diferentes tipos de substratos, como plantas, animais e resíduos vegetais. Este microrganismo apresentou um arsenal de holocelulases capazes de degradar os polissacarídeos da parede celular de plantas, principalmente quando crescido com resíduos lignocelulósicos (engajo de bananeira, resíduos da indústria de rebeneficiamento de algodão e bagaço de cana-de-açúcar), como fonte de carbono em cultivo submerso. Este fungo, com três dias de cultivo submerso nessas fontes de carbono, produziu valores significativos de celulases, hemicelulases e pectinases, conforme curva de indução realizada por, aproximadamente, trinta dias de cultivo. O *A. flavus* destacou-se na produção de pectinases no cultivo com as três fontes lignocelulósicos, apresentando atividade em uma ampla faixa de pH, principalmente acima de 8,0 em tampão Tris-HCl e temperatura na faixa de 50°-65°C. As atividades de xilanase e mananase nos substratos lignocelulósicos também se destacaram, com maiores valores de pH e temperatura na faixa ácida e

50°-60°C, respectivamente. As holocelulases de *A. flavus* apresentaram perfis de atividades enzimáticas quando da purificação parcial em cromatografias de filtração em gel Sephacryl S-400 e nas de troca iônica CM e Q-sepharose. Desse modo, as enzimas encontram-se, praticamente, nas mesmas frações da purificação parcial das holocelulases desse fungo, quando crescido nos resíduos agroindustriais lignocelulósicos. O engaço de bananeira foi uma das fontes de carbono lignocelulósica que mais estimularam o fungo na produção das holocelulases, porém, esse material é rico em extrativos vegetais que, muitas vezes, inteferiram em alguns resultados, como, por exemplo, na produção de géis de eletroforese e zimograma. O processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado ou não-tratado) apresentou em torno de 5% de conversão de polissacarídeos em açúcares redutores. O fungo apresentou afinidades ao substrato avicel, quando analisado o módulo de ligação a carboidratos (CBM) para endoglicanase (CMCase) e xilanase (hemicelulase).

1. Introdução

Aspergillus flavus é um fungo que obtém recursos para o crescimento principalmente de forma saprofítica. No entanto, tem também as características de um patógeno oportunista com espectro não-específicos de hospedeiros (plantas e animais). Este fungo tem elevado nível de importância agrícola, devido à produção da substância cancerígena denominada aflatoxina, o que reduz significativamente o valor de culturas contaminadas, como amendoim e milho, entre outras.

Para acessar uma grande variedade de nutrientes e penetrar nos tecidos dos substratos, o *A. flavus* tem capacidade de produzir inúmeras hidrolases extracelulares. Muitas hidrolases são produzidas para funcionar na degradação de polímero e capturar nutrientes, mas a regulação da secreção das hidrolases é complexa e dependente do substrato de cultivo (Mellon *et al.*, 2007).

A produção e a secreção de enzimas servem como agentes facilitadores, que permitem ao fungo obter os nutrientes essenciais para seu crescimento e reprodução. No entanto, pela sua própria

natureza, é possível utilizar essas enzimas para numerosos processos industriais, como, por exemplo, indústria têxtil, indústria de papel, indústria de sucos e de biocombustíveis, entre outras (Murphy & Horgan, 2005).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de enzimas hidrolíticas holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases) do fungo mesofílico *Aspergillus flavus* crescido meio submerso com macro e micronutrientes, tendo como fonte de carbono 1% (m/v) engaço de bananeira (espécie nanicão - *Musa cavandishii*), bagaço de cana-de-açúcar (variedade JAVA de *Sacharrum officinarum*), resíduo da indústria de rebeneficiamento de algodão (piolho-de-algodão-sujo) e celulose microcristalina (SigmaCell).

2. Materias e Métodos

2.1 Linhagem do fungo e condição de cultivo

O *Aspergillus flavus* foi isolado de troncos de árvores em decomposição, no cerrado goiano, no entorno do Distrito Federal, Brasil. A manutenção do microrganismo, da coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, foi feita com repicagens periódicas em batata-dextrose-ágar (BDA) e ágar-aveia. O meio de cultura utilizado foi o MS - meio suplementado (KH_2PO_4 – 7 g; K_2HPO_4 – 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 g; extrato de levedura 0,6 g, com 1% da fonte de carbono (engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, piolho-de-algodão-sujo e celulose microcristalina). Os valores foram calculados em g/L e o pH acertado para 7,0, tendo os ensaios/cultivo sido feitos em triplicata. Foi preparado uma solução de esporos em água salina esterilizada e inocularam-se 10^8 esporos/mL em cada frasco de cultivo. A incubação foi realizada por 7 dias, à temperatura de 28°C, sob agitação de 120 rpm. O meio de cultivo resultante foi centrifugado e filtrado ao final do processo de crescimento para a obtenção do extrato bruto.

2.2 Análises bromatológicas dos resíduos agroindustriais

As análises bromatológicas foram realizadas conforme descrito no Capítulo II, tabela 1, desta tese. Tendo sido incluídas as análises para o substrato engaço de bananeira da variedade nanicão para este trabalho.

2.3 Produtos químicos e substratos

Todos os reagentes e substratos deste trabalho tiveram as mesmas origens do material descrito no Capítulo II.

2.4 Determinação da fonte de nitrogênio

Foi feito um experimento inicial para determinar a melhor fonte de nitrogênio, preparando o MS com diferentes fontes de nitrogênio, como: T1 = extrato de levedura + sulfato de amônio; T2 = extrato de levedura + ureia; T3 = ureia e T4 = sulfato de amônio. A fonte de carbono utilizada neste procedimento foi o engaço de bananeira, avaliando-se as atividades de FPase (celulase total), CMCase (endoglicanase) e β -glicosidase.

2.5 Atividades enzimáticas e proteína total dos extratos brutos

Foram determinadas as atividades enzimáticas dos extratos brutos para celulasas, hemicelulasas e pectinases, conforme descrito no capítulo II.

A determinação da atividade de β -glicosidase foi feita utilizando-se para-nitro-fenil-glicosídico (*pNPG*) como substrato (Iembo *et al.*, 2006). A mistura de incubação foi composta de 100 μ L de enzima, 50 μ L de *pNPG* e 850 μ L de água destilada, por 10 minutos, a 50°C, sendo interrompida com a adição de 1 mL de Na₂CO₃ (carbonato de sódio), a leitura foi feita a 410 nm. Para a construção da curva de calibração de *pNPG*, utilizou-se uma solução estoque de *pNP* de 1,0 μ mol/mL, em 900 μ L de água destilada. Foram utilizadas oito concentrações diferentes, variando

de 8 a 100 μL em água destilada para construir os pontos da curva. As concentrações receberam 1 mL de Na_2CO_3 e incubados por 10 minutos, a 50°C , os quais foram lidos a 410 nm. Após a plotagem dos valores em um gráfico, obteve-se a equação da reta que servirá de parâmetro para a determinação da quantidade de pNP liberado.

A quantidade de proteína total foi determinada por meio da curva analítica com diferentes concentrações da solução estoque de albumina bovina (BSA) de 0,1mg/mL. Foram utilizados 100 μL de extrato bruto, em 1 mL de solução de Bradford, sendo os resultados expressos no eixo das coordenadas, em μg de proteína total/100 μL de extrato bruto enzimático.

2.6 Curva indução de atividades enzimáticas

As atividades para holocelulases foram mensuradas a cada três dias, durante um período de 27 dias, para determinar as curvas de induções dos extratos brutos do *A. flavus* cultivado em engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Foram determinadas quatro curvas, sendo duas para cada fonte de carbono lignocelulósica. A diferença entre uma curva e outra foi o pré-tratamento ou não das fontes de carbono utilizadas. O pré-tratamento foi realizado por meio da lavagem do material em água corrente, tendo sido autoclavados, por duas horas, a $121^\circ\text{C}/1\text{atm}$, após a lavagem. Após deixar escorrer o excesso de água da autoclavagem, cada material foi disposto em bandejas para secagem, a 65°C , em estufa, por dois dias. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio suplementar (MS – descrito no Capítulo II) com 1 g de fonte de carbono lignocelulósica (pré-tratada ou não). Foram inoculados 10^8 esporos/mL do fungo em cada erlenmayer com meio de cultivo preparado, sendo incubados a 50°C , com 120 rpm de agitação. Cada cultivo foi feito em triplicata, isto é, três erlenmeyers para cada data de coleta, totalizando 81 erlenmeyers e produzindo nove pontos na curva de indução. As atividades de celulasas (FPase, CMCase e avicelase), hemicelulasas (xilanase e mananase) e pectinase foram determinadas conforme protocolos descritos no Capítulo II, tendo sido retirados, de cada

erlenmayer, 2 mL como amostra. Cada amostra foi acondicionada em eppendorfs, que foram centrifugados a 8.000 rpm, durante 10 minutos. As atividades de holocelulases e proteína total (Bradford) foram determinadas do sobrenadante do material centrifugado.

2.7 Efeito da temperatura e pH

O efeito da temperatura e o pH foram determinados para os extratos brutos dos cultivos do *A. flavus* crescido em engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar, como também das frações eluídas (50-60) em cromatografia de filtração em gel S-400 de cada um destes extratos brutos concentrados em PM 300.

O efeito da temperatura foi mensurado para as atividades de holocelulases (conforme protocolo descrito para DNS no Capítulo II), após a incubação em banho-maria na faixa entre 30°C e 80°C, com um intervalo 5°C entre uma mensuração e outra, totalizando nove pontos no gráfico do efeito de temperatura.

Para determinar o efeito do pH, foram utilizados os tampões: acetato de sódio 50 mM pH 3,0-6,0; fosfato de sódio 50 mM pH 6,0-7,5 e Tris-HCl 50 mM pH 7,0-9,0. Os protocolos para a determinação das holocelulases descritos no Capítulo II foram adaptados para a verificação do efeito do pH. Nos ensaios de xilanase, pectinase, CMCase e mananase, utilizaram-se: 75 µL de tampão (conforme mencionado acima); 25 µL de amostra da enzimas com 50 µL de substrato 1%, m/v (arabinoxilana, pectina e carboximetilcelulose, respectivamente) e 0,5% m/v (galactomanana), a 50°C, por 30 minutos. O ensaio de FPase foi determinado com papel de filtro (1x6cm) como substrato, 100 µL de tampão e 50 µL de enzimas, a 50°C, por 1 hora. O ensaio de avicelase foi determinado pela mistura de celulose microcristalina (50 µL) como substrato (1% m/v) e 50 µL de enzimas, a 50°C, por 2 horas e 100 µL de tampão.

2.8 Purificação parcial em cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel

A purificação parcial ocorreu na temperatura ambiente. Os extratos brutos (engajo de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, piolho-de-algodão-sujo e celulose microcristalina) foram concentrados (10x) por ultrafiltração, utilizando-se sistema de filtragem de membrana da Amicon System PM 300

Alíquotas das amostras concentradas em PM 300 foram fracionadas em cromatografias de gel filtração em Sephacryl S-400 (2,5 x 60,0 cm), em colunas pré-equilibradas com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 0,15 M de NaCl. Frações de 5 mL foram coletadas em fluxo de 20 mL/h. Frações correspondentes às holocelulases foram agrupadas e armazenadas a 4°C.

O perfil de proteína total de cada amostra submetida à cromatografia de filtração em gel S-400 foi determinado por meio da leitura de amostras (200 µL) obtidas das frações (1 a 95), no comprimento de onda a 280 nm no SpectraMax M2e (Molecular Devices). As atividades para holocelulases (conforme Capítulo II) também foram mensuradas para as frações pares ou ímpares, dependendo da análise do pico proteico.

2.9 Marcadores moleculares para cromatografia de filtração em gel S-400

Para definir a massa molecular das holocelulases apresentadas na cromatografia de filtração em gel S-400, utilizaram-se algumas proteínas ou complexos previamente conhecidos. Os marcadores moleculares utilizados foram diluídos em tampão acetato de sódio 50 mM, nas respectivas concentrações descritas a seguir. O volume final da solução de tampão com o marcador foi de 3,5 mL. O volume vazio foi determinado por meio dos marcadores: tiroglobulina com 669 kDa (4 mg/mL) e *blue dextran* de 2000 kDa (4mg/mL). Albumina (67 kDa) foi aplicada na concentração de 7 mg/mL de tampão, marcando-se as frações nas quais ocorreu a formação do segundo pico proteico para alguns cromatogramas, em que ocorreu a maioria das atividades enzimáticas.

2.10 Cromatografias de troca iônica

Os perfis para cromatografia de troca iônica foram determinados por meio de CM-Sepharose (catiônica) e Q-Sepharose (aniônica). A fração de 5 mL foi coletada num fluxo de 25 mL/h das frações selecionadas da cromatografia de filtração em gel S-400. O gradiente de NaCl foi de 0 a 1 M, a partir da fração número 21, em ambas as cromatografias. Os tampões utilizados foram acetato de sódio 50 mM, pH 5 e fosfato de sódio 50 mM em pH 7, para CM-Sepharose e Q-Sepharose, respectivamente. As eluições em Q-Sepharose foram realizadas após a diálise das amostras em sacos de celulose, por 24 horas, contra tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7, sob agitação lenta, à temperatura de 4°C (câmara fria). Nas primeiras doze horas, o tampão fosfato foi trocado a cada três horas e, depois, a cada 6 horas.

2.11 Eletroforese e zimograma

A eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi feita conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando um gel de 12%. Depois da desnaturação eletroforética, o gel contendo 1% de xilana foi cortado longitudinalmente em dois pedaços, sendo uma parte corada com prata, de acordo com o método de Blum *et al.* (1987) e a outra, tratada com Triton X-100 (1%), por 30 minutos, a 4°C. Logo depois, foi submetido à incubação com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, por 10 minutos, a 50°C. A atividade de xilanase foi detectada com incubação em Congo Red (0,1%), por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Depois de corado, o gel foi lavado com água, para a remoção do excesso de congo Red e descorado, por 30 minutos, com 1 M de NaCl, em temperatura ambiente. Ácido acético (100 mM) foi adicionado em seguida, para proporcionar melhor visualização das bandas formadas (adptado de Nascimento *et al.*, 2002). O gel de eletroforese no sistema *Phastsystem* foi realizado conforme descrição de Valencia-Jiménez *et al.* (2007).

As etapas gerais da purificação parcial das holocelulases, nas diferentes fontes de carbono lignocelulósica, são apresentadas na figura 1.

2.12 Purificação parcial por ultrafiltração em membranas

Nesta etapa foram utilizadas membranas PM 300, PM 100, PM 50 e PM 30, para purificação do extrato do bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira 1% e bagaço de cana-de-açúcar 1% (Figura 2). Foram determinados as atividades enzimáticas para CMCase (endoglicanase) e xilanase para cada concentrado e o ultrafiltrado das membranas utilizadas, empregando o método de DNS. Foi determinado também, para as mesmas amostras, o teor de proteína total (Bradford, 1976).

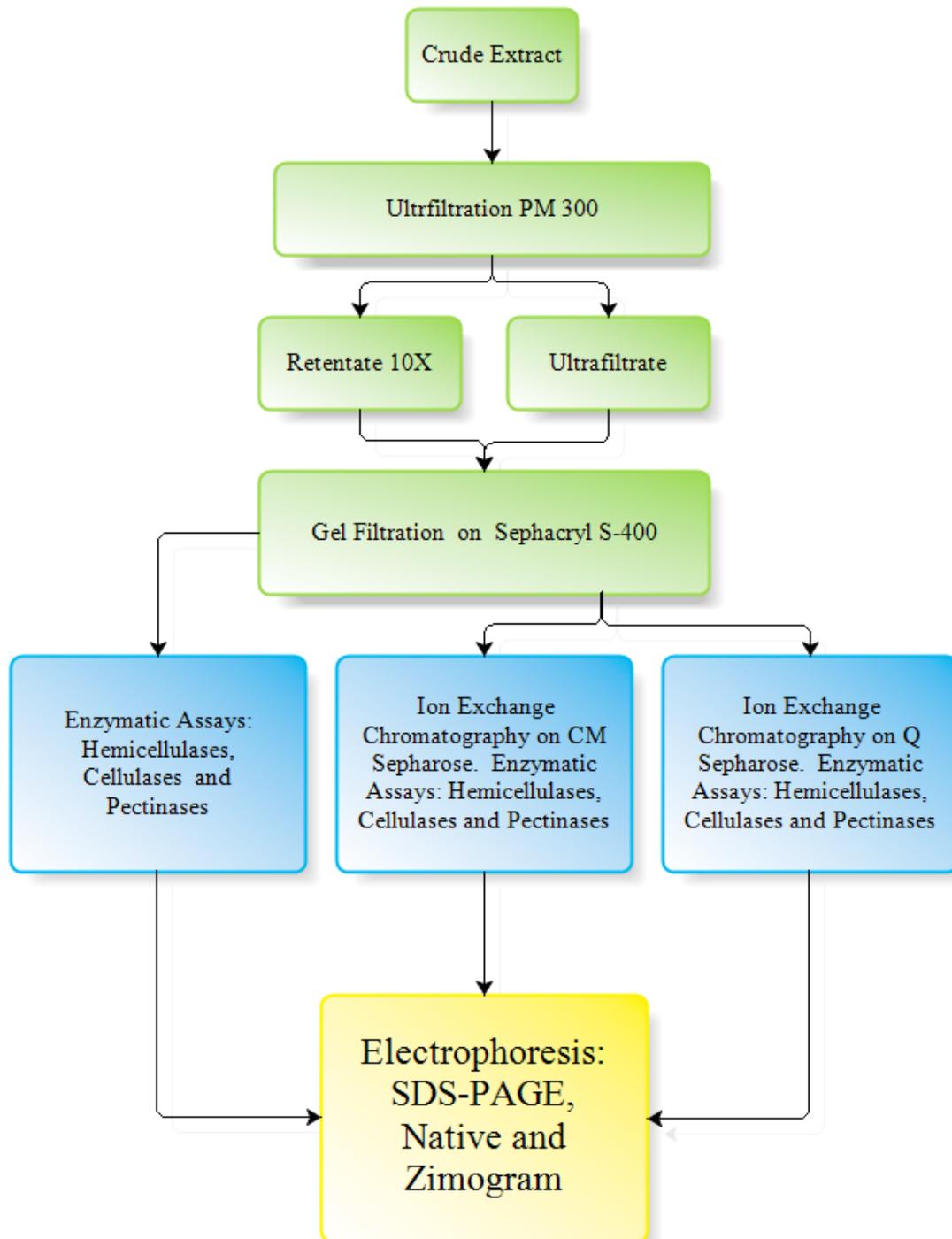


Figura 1. Esquema para purificação parcial das holocelulases de *Aspergillus flavus* crescido em fontes de carbono lignocelulósica (O texto em inglês foi mantido por se tratar de material preparado para submissão à publicação em revista internacional).

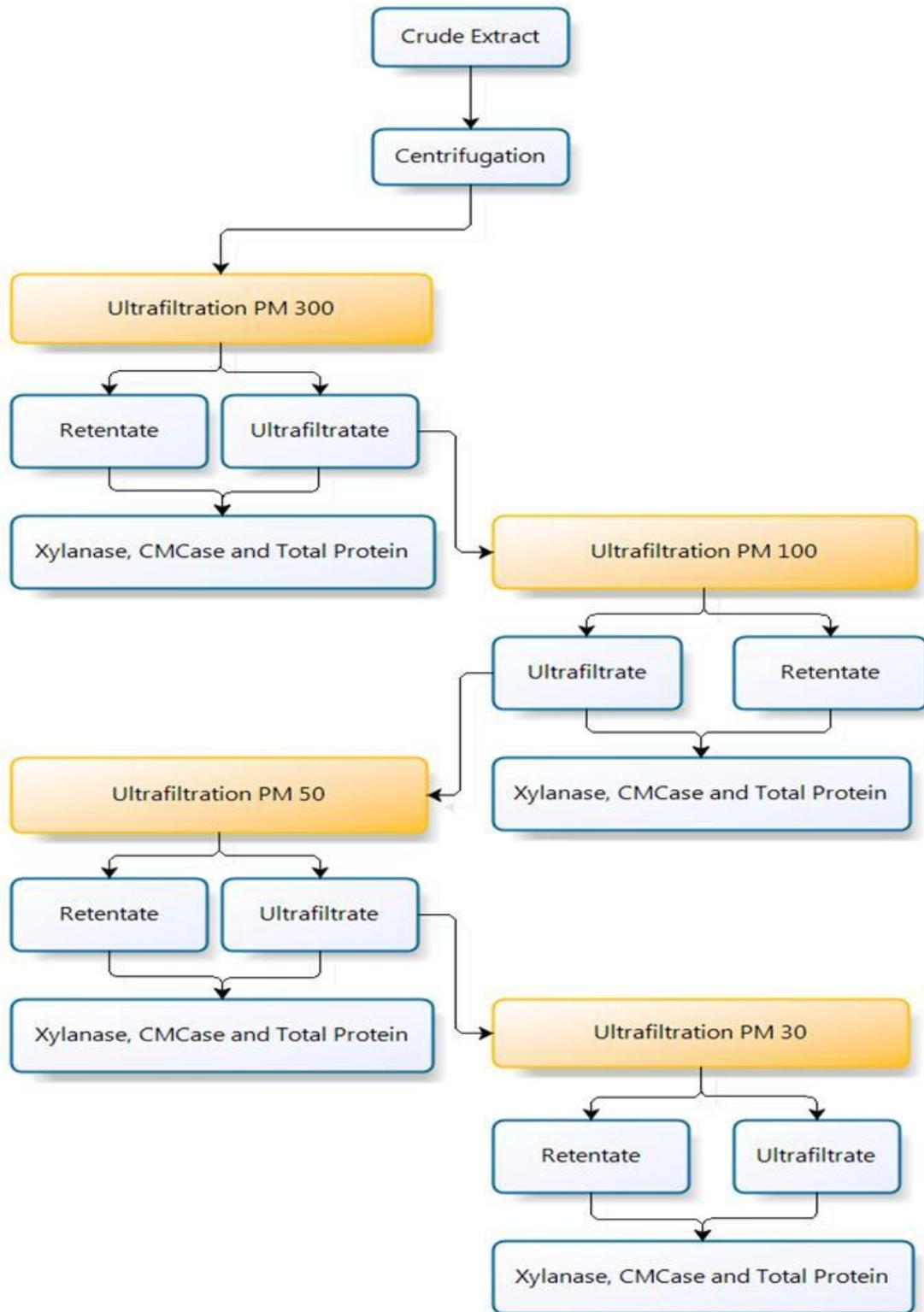


Figura 2. Esquema da purificação enzimática por membranas de ultrafiltração de retenções diferentes (O texto em inglês foi mantido por se tratar de material preparado para submissão à publicação em revista internacional).

2.13 Hidrólise enzimática

Foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* L., variedade Java, procedente da Fazenda Brejo, no município de Formosa, GO. O bagaço encontrava-se seco e triturado e sofreu dois procedimentos para a realização do experimento. No primeiro ensaio de hidrólise, o bagaço foi autoclavado (sem pré-tratamento), juntamente com o volume de água utilizado para diluir as enzimas (Tabela 1), durante 1 hora, a 121°C/1atm, denominado aqui substrato “não-tratado”. O segundo ensaio ocorreu com a lavagem do bagaço de cana-de-açúcar em água corrente quente que, após a lavagem, foi autoclavado por duas horas, a 121°C/1 atm de pressão. Depois da autoclavagem, retirou-se o excesso de água para secagem, a 65°C, por dois dias (bagaço pré-tratado). Após a secagem, utilizou-se uma peneira fina para separar os pedaços maiores do bagaço do farelo de bagaço. Então, mediu-se a massa de 1g de farelo de bagaço de cana para cada frasco de hidrólise, que foi novamente autoclavado. Porém, desta vez, utilizou-se o volume final de água que foi utilizado para diluir as enzimas (Tabela 1). Desse modo, os dois tratamentos do bagaço são denominados, neste trabalho, como não-tratado e pré-tratado.

A proteína total foi observada no extrato bruto por meio do método de Bradford (triplicatas), como também durante todo o experimento. A hidrólise desses dois tipos de tratamentos dado ao bagaço foi realizada variando-se a concentração de proteína total em relação a 1 g de bagaço de cana-de-açúcar, numa relação de banho de 50 mL de solução de enzima diluída em água por 1 g de bagaço de cana, conforme tabela 1.

Os açúcares redutores foram determinados utilizando-se o método de ácido dinitrosalicílico (DNS). As amostras de hidrólise enzimática (1 mL) eram retiradas a cada 24 horas, durante o período de 96 horas, para avaliação da produção de açúcar redutor, glicose e proteína total. A alíquota retirada da solução de hidrólise a cada período foram centrifugadas, selecionando-se o sobrenadante para análises posteriores. A quantidade de glicose liberada foi determinada por meio do kit da BioSystems Reagents & Instruments para glicose (glucose oxydase/peroxidase) CODE-

11504. O rendimento de hidrólise da celulose em glicose foi calculado baseando-se no fator de conversão de 1,1, o qual é obtido pela adição de uma molécula de água a cada quebra da ligação β -1,4. Foi considerado para o cálculo que o bagaço de cana-de-açúcar tenha 35%. Desse modo, utilizando-se 1 g de bagaço de cana para hidrólise, o máximo em glicose a ser obtido será de: $(0,35 \times 1,1 = 0,385\text{g})$. Assim, tem-se a seguinte equação para determinar o rendimento em percentual da hidrólise da celulose em glicose: $R\% = \{[\text{Glicose}]/\text{Glicose Máxima}] \times 100\}$.

Tabela 1. Extratos brutos de fungos utilizados na hidrólise de 1g de bagaço de cana-de-açúcar (não-tratado ou pré-tratado), utilizando-se diferentes concentrações de proteínas totais, para dois tipos de tratamento do bagaço de cana.

Fungos	Concentração de proteína total (1mg/g de bagaço de cana-de-açúcar)	volume de enzima (mL)	volume de água (mL)	volume Total (mL)	Fpase (UI.mL ⁻¹)	FPU (UI.mL ⁻¹ de enzima utilizado)
<i>A. nainiana</i>	1mg/g	1,85	48,15	50mL	0,111	0,207
<i>A. awamori</i>		1,67	48,33		0,363	0,605
<i>T. reesei</i> RUT C30		1,28	48,72		0,799	1,022
<i>A. flavus</i>		1,53	48,47		0,140	0,214
<i>A. nainiana</i>	5mg/g	9,27	40,73	50mL	0,111	1,033
<i>A. awamori</i>		8,33	41,67		0,363	3,027
<i>T. reesei</i> RUT C30		6,39	43,61		0,799	5,110
<i>A. flavus</i>		7,66	42,34		0,140	1,070
<i>A. nainiana</i>	10mg/g	18,54	31,46	50mL	0,111	2,065
<i>A. awamori</i>		16,66	33,34		0,363	6,054
<i>T. reesei</i> RUT C30		12,78	37,22		0,799	10,216
<i>A. flavus</i>		15,31	34,69		0,140	2,139

2.14 Adsorção das enzimas em avicel

A adsorção em avicel foi determinada pela incubação de 200 µl de amostra da enzima com 0,1 g de avicel em 800 µL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 4°C, por 15 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante retirado para dosagem das atividades residuais de xilanase e endoglicanase (CMCase), mensuradas pelo uso de DNS (Badhan *et al.*, 2007).

3. Resultados e discussões

3.1 Análises bromatológicas

A holocelulose dos resíduos agroindustriais apresentou, nos resíduos de piolho-de-algodão-sujo, teores em torno de 76%, seguidos de engaço de bananeira 51%, enquanto o bagaço de cana-de-açúcar apresentou 50,8% (Tabela 2). O engaço de bananeira da variedade nanicão tem maiores teores de cinza ou matéria mineral que a variedade prata (Capítulo 2), indicando, assim, que esses resíduos têm minerais em sua composição que podem estar associados a extrativos totais derivados da lignina, por exemplo. A celulose microcristalina, também utilizada como fonte de carbono neste experimento, é puramente celulose, conforme a descrição do fabricante. Holtz *et al.* (2007) apresentaram teores de holocelulose de 71,5%, em um resíduo proveniente do beneficiamento de algodão na indústria têxtil, que foi utilizado como fonte nutricional para o cultivo de cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. Segundo Siqueira *et al.* (2010 no prelo), a holocelulose de engaço de bananeira da variedade nanicão cultivadas no sul de Minas Gerais apresentou teores de, aproximadamente, 40%, 18% de lignina e 7,6% de proteína total, tendo resultados significativos na produção de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* na forma axênica. O bagaço de cana-de-açúcar, segundo Sun *et al.* (2004), tem de 40% a 50% de glicose que constitui a celulose, formando uma estrutura cristalina e de 25% a 35% de hemicelulose, tendo, assim, em sua estrutura holocelulósica, entre 65% a 80%, conforme descrito neste trabalho.

Tabela 2. Análises bromatológicas dos resíduos agroindustriais utilizados nos cultivos submersos como fontes de carbono para o *Aspergillus flavus*.

Análises bromatológicas	Bagaço de cana-de-açúcar	Engaço de bananeira (var. nanicão)	Piolho-de-algodão "sujo"
Cinzas (%)	0,8	16,8	4,6
Matéria seca (%)	92,4	89,4	91,5
Proteína bruta (%)	3,1	10,6	6,9
Gordura (%)	1,2	3,2	1,8
FDA* (%)	39,7	50,3	72,0
FDN** (%)	55,9	57,8	81,8
Carboidratos solúveis (%)	64,7	28,6	30,0
Quilocalorias (kcal g*100g)	281,7	185,9	163,7
Celulose (%)	34,6	43,6	65,7
Hemicelulose (%)	16,2	7,4	9,8
Lignina (%)	5,1	6,7	6,3
Cálcio (%)	0,02	0,8	1,01
Fósforo (%)	0,03	0,26	0,14

* FDA – fibra detergente ácida; ** FDN – fibra detergente neutra

3.2 Perfil das atividades de holocelulases

A definição da fonte de nitrogênio a ser utilizada no meio de cultura suplementar foi realizada por meio dos resultados para celulasas (FPase, CMCase e β -glicosidase), quando o *A. flavus* foi cultivado utilizando-se os mesmos reagentes do meio suplementar descrito nos materiais e métodos, modificando-se apenas a fonte de nitrogênio. Os resultados para atividades de celulasas, com diferentes fontes de nitrogênio, mostraram ser mais significativos quando utilizados em conjunto com extrato de levedura e sulfato de amônio (dados não apresentados).

A atividade de xilanase foi significativa no cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, porém, os resíduos agroindustriais piolho-de-algodão-sujo e engaço de bananeira também foram representativos, enquanto, para celulose microcristalina, os valores não foram significativos quando comparados com as demais fontes de carbono (Figura 3). Desse modo, a celulose não induziu o fungo a produzir xilanase. Porém, Bailey *et al.* (1993) relataram que, para *Trichoderma reesei*

VTT-D-86271 cultivado em celulose ou xilana como fonte de carbono, em fermentadores com controle de pH, foram encontrados resultados de xilanases significativos em ambas as fontes de carbono.

A mananase, também do grupo das hemicelulases mostrou resultados significativos em engaçõ de bananeira e bagaçõ de cana-de açúcar (Figura 3), enquanto a pectinase merece destaque para os três substratos que tiveram valores significativos de atividade de xilanase, tendo piolho-de-algodão-sujo e bagaçõ de cana sido os mais expressivos (Figura 3). No grupo das celulases, os meios com bagaçõ de cana e engaçõ de bananeira tiveram melhor representatividade para atividade de endoglicanase. Já para celulase total (FPase), o bagaçõ de cana foi o mais expressivo, enquanto na atividade de avicelase o piolho-de-algodão-sujo foi o mais significativo (Figura 3).

No entanto, as atividades de celulases dessa estirpe de *A. flavus* não foram representativas quando comparadas com atividades das hemicelulases, como também das pectinases. Esse fungo é, costumeiramente, isolado de casca de frutas em decomposição ou, até mesmo, nas frutas à venda nas gôndolas de mercados de frutas e verduras; e como as cascas de frutas e verduras são ricas em pectina, explica-se o êxito na atividade pectinolítica. Outro fator, também em relação a esta eficiência na produção de pectinases, está relacionado com o sistema de invasão dos tecidos das plantas por esse fungo, que usa pectinases para fazer aberturas no tecido vegetal, quando na forma de fitopatôgeno (Mellon *et al.*, 2007). Muitas hidrolases diferentes estão envolvidas na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal e têm sido isoladas e caracterizadas a partir de múltiplas espécies de *Aspergillus*, mas são poucos os relatos sobre esta enzimas de *A. flavus* (de Vries & Visser, 2001). Estas hidrolases incluem glucanase (endo e exo), xilanase, mananase, rhamnogalacturonana-hidrolases, pectina liase, arabinofuranosidase e galactosidase. Segundo Melo *et al.* (2007), *A. flavus* é capaz de produz enzimas homólogos que auxiliam na maceração do tecido vegetal.

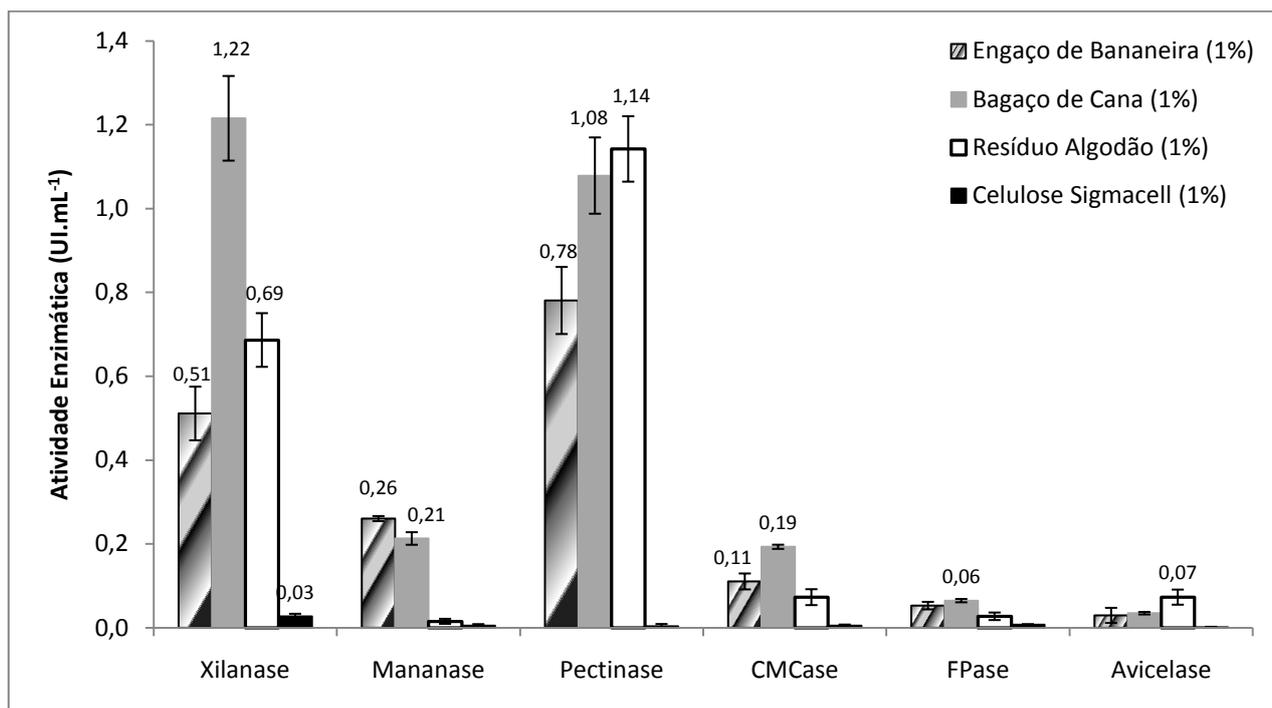


Figura 3. Atividades de holocelulases de *Aspergillus flavus* crescido em meio líquido, em diferentes fontes de carbono.

O extrato bruto do cultivo do *A. flavus* em engaço de bananeira em meio submerso foi o que apresentou maior quantidade de proteína total, quando comparado com as outras três fontes de carbono lignocelulósicas (dados não apresentados). Essa quantidade de proteína total pode ser explicada com base nos dados da tabela 2, os quais demonstram que o engaço de bananeira tem mais de 30% e 70% de proteína que o piolho-de-algodão-sujo e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. Demonstra-se, dessa forma, que o engaço de bananeira é substrato rico em proteínas e também em carboidratos (Tabela 2), podendo, assim, ser explorado em diversas formulações e formas de cultivos, para diversos tipos de microrganismos.

A curva de indução de atividade de holocelulase de *A. flavus* em engaço de bananeira ou bagaço de cana-de-açúcar, tanto pré-tratado como não-tratado, apresentou, no terceiro dia de cultivo, os melhores resultados para atividades de hemicelulases (xilanase e mananase), pectinase e CMCase (Figura 4). No entanto, a atividade de FPase mostrou melhores resultados em torno do

sexto dia de cultivo. Observa-se também que a atividade xilanase, após o terceiro dia de cultivo, apresentou-se constante ao longo de todo o período de cultivo, como também pouca variação na atividade entre os substratos pré-tratados ou não-tratados. No entanto, pectinase e mananase sofreram perdas significativas de atividade após o pré-tratamento do engaço de bananeira, que foi um substrato melhor para a indução dessas enzimas que o bagaço de cana-de-açúcar (Figuras 4A e 4B). Porém, estas duas atividades enzimáticas não sofreram grandes variações de atividade no substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e não-tratado (Figuras 4C e 4D).

Desse modo, pode-se entender que o pré-tratamento do engaço de bananeira removeu constituintes da hemicelulose e pectina, que servem de indutores para o fungo expressar holocelulases. Vários tipos de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos têm sido utilizados para favorecer a ação enzimática, tais como ácidos, autoclavagem e água fervente hermeticamente fechada, entre outros, os quais são exemplos de pré-tratamento desses substratos (Mosier *et al.*, 2005; Andraus, *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009).

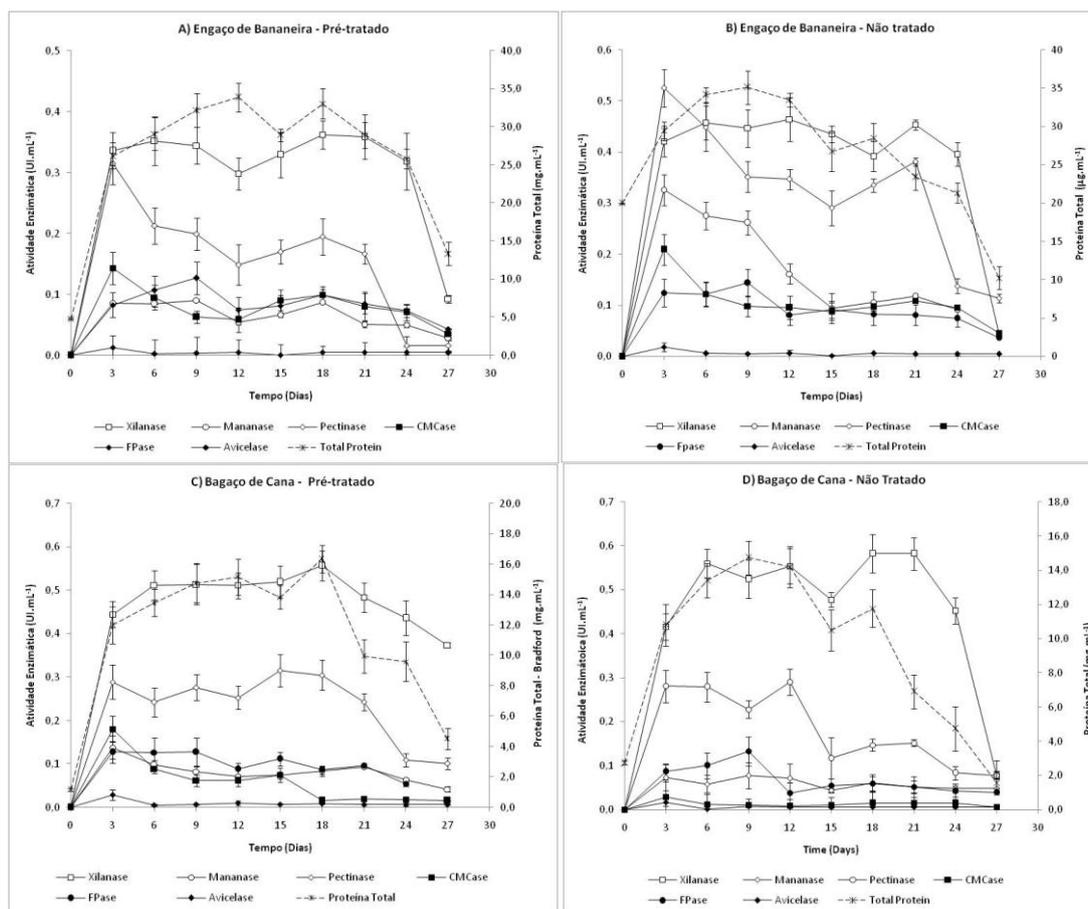


Figura 4 - Curva de indução enzimática (celulases, hemicelulases e pectinase) e proteína total dos extratos brutos do *A. flavus* com as seguintes fontes de carbono: (A) engaço bananeira – pré-tratado; (B) engaço de bananeira normal (não-tratado); (C) bagaço de cana-de-açúcar – pré-tratado; (D) bagaço de cana-de-açúcar normal (não-tratado).

O fungo *A. flavus* produz atividades significativas de poligalacturonase, quando cultivado em resíduos agrícolas como fonte de carbono (casca de banana, casca de batata, bagaço de laranja, entre outros), em meio submerso (Arotupin, 2007). De acordo com Cleveland & Cotty (1991), a capacidade do *A. flavus* de se difundir nos capuchos de algodão (frutos) está fortemente correlacionada com a produção de determinadas endo-poligalacturonase. Existe grande variabilidade na produção pectinases por isolados *A. flavus*, que também mostram forte atividade xilanólítica (Abdel-Sater & El-Said, 2001). Dessa forma, o *A. flavus* pode ser relacionado entre os fungos de grande importância na produção de pectinases, dependendo apenas na definição da fonte de carbono. Neste trabalho, os resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar, engaço de

bananeira e piolho-de-algodão-sujo) mostraram-se favoráveis para produção pectinases e xilanase (Figura 3).

O perfil proteico foi muito similar entre os pares de substratos pré-tratados ou não-tratados, como também manteve valores semelhantes (Figura 4). Porém, nos substratos não-tratados, a partir do décimo quinto dia de cultivo, inicia-se um declínio de proteína total, com um novo pico de atividades enzimáticas, que também foi observado nos substratos pré-tratados com menor intensidade. As holocelulases, principalmente xilanase e pectinase, são aparentemente produzidas novamente pelo fungo para continuar a degradação da holocelulose da parede celular, enquanto a proteína total pode ter sido assimilada no metabolismo fúngico, pois continua em declínio (Figura 4).

3.3 Holocelulases – Efeito da temperatura

As atividades de pectinase e xilanase foram as mais representativas nos ensaios para a determinação do efeito da temperatura entre as holocelulases testadas (Figura 5). O resultado de destaque em diferentes temperaturas, para essas duas atividades enzimáticas, corroboram os demonstrados na figura 3, que foi realizado a 50°C.

A atividade de pectinase foi mais significativa na faixa de temperatura entre 60°-65°C, para praticamente todas as amostras avaliadas (Figuras 5A-D), exceto para o extrato bruto de bagaço de cana-de-açúcar, que apresentou um pico mais expressivo a 50°C (Figura 5C). O substrato engaço de bananeira apresentou, tanto para a amostra de extrato bruto como também para a amostra submetida à cromatografia de filtração em gel (S-400), atividade para pectinase acima de 80% na faixa de temperatura entre 50° e 70°C, quando comparado com o pico de atividade mais expressivo (Figuras 5A e 5B).

Nas figuras 5C e 5D é apresentada a atividade para xilanase no substrato bagaço de cana, que teve melhores resultados na faixa de temperatura entre 50° e 60°C. Já a atividade de xilanase em engaço de bananeira apresentou os melhores resultados em ampla faixa de temperatura, mantendo-se praticamente estável entre 40°-70°C na amostra de extrato bruto, enquanto a amostra da cromatografia (Sephacryl S-400) foi entre 40° e 55°C (Figuras 5A e 5B).

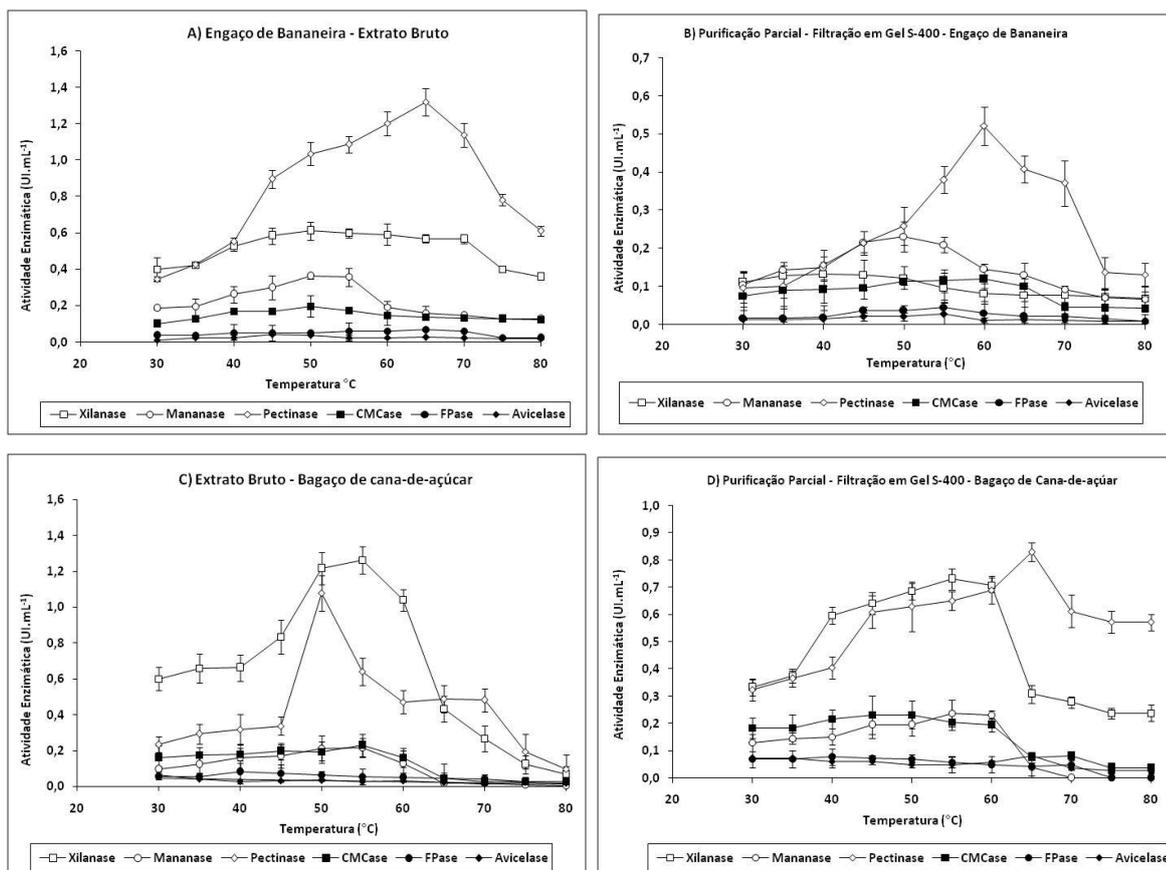


Figura 5. Efeito da temperatura nas atividades de holocelulases em extrato bruto (cultivo em fontes de carbono lignocelulósicas não-tratadas) e das frações (50 a 60) da filtração em gel S-400 do concentrado em PM 300. A) Extrato bruto em engaço de bananeira; B) filtração em gel S-400 – engaço de bananeira; C) extrato bruto em bagaço de cana-de-açúcar; D) filtração em gel S-400 – bagaço de cana-de-açúcar.

Os melhores resultados do efeito da temperatura para xilanase produzida por algumas espécies de fungos filamentosos estão na faixa entre 40° e 60°C (Biswas *et al.*, 1988; Carmona *et al.*, 1997; Gawande & Kamat, 1999; Salles *et al.*, 2000; Abdel-Sater & El-Said, 2001).

3.4 Holocelulasas – Efeito do pH

O efeito do pH teve melhores resultados para xilanase, em ambas as fontes de carbono testadas, na faixa entre 5 e 6. No entanto, na faixa de pH entre 3,5 e 7,5, essa atividade manteve-se acima de 80%, quando comparada com o resultado do pH 5,5 (Figuras 6A e 6B). Os melhores resultados para atividade de pectinase foram visualizadas na faixa alcalina, tendo o efeito de maior notoriedade sido em pH 9,0, para as duas condições testadas. Para mananase, o melhor efeito foi observado no tampão acetato de sódio e fosfato de sódio em pH 6, para o cultivo em engaço de bananeira (Figura 6A), confirmando assim que este substrato é relevante na produção hemicelulasas fúngicas. Já em bagaço de cana, os melhores resultados ficaram em pH 7 no tampão fosfato de sódio (Figura 6B). As atividades de CMCase foram mais significativas na faixa mais ácida do tampão acetato de sódio, principalmente em pH 4, cultivo em engaço (Figura 6A). O efeito do pH para celulasas (FPase e avicelase) não foi determinado, pois os resultados para essas duas atividades não mostraram valores significativos, desde o início da experimentação.

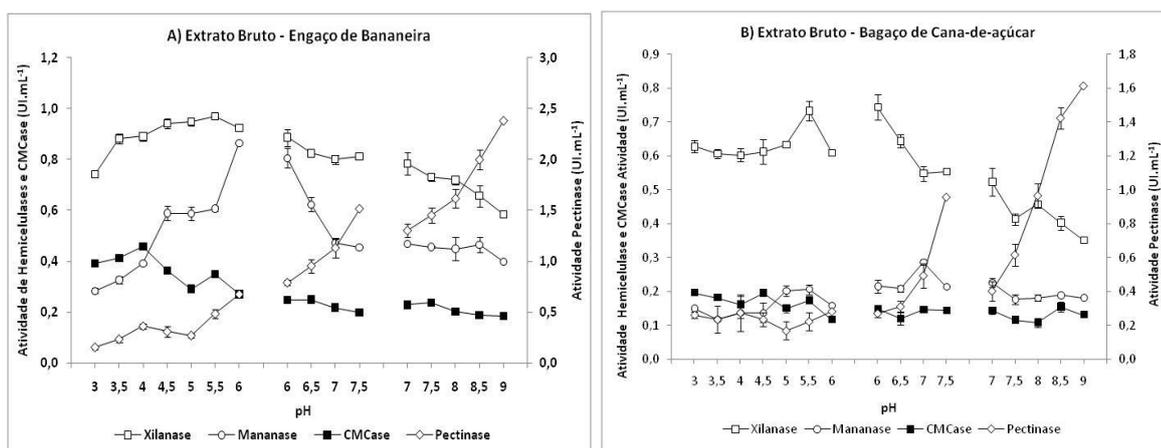


Figura 6. Efeito do pH nas atividades de holocelulasas. A) Extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira em meio submerso (substrato não-tratado); B) extrato bruto de *A. flavus* em bagaço de cana-de-açúcar nas mesmas condições do tratamento anterior.

Kote *et al.* (2009) relataram que endo- β -1,4 mananases de *A. flavus* e *A. niger* apresentaram temperatura ótima entre (60° e 65°C), com estabilidade para as atividades de mananases ao longo de uma ampla faixa de pH. Xilanases e β -xilosidase de *A. flavus*, cultivado em meio líquido com sabugo de milho como fonte de carbono, apresentaram pH ótimo entre 5,5 e 6,0, respectivamente (Souza *et al.*, 1999), porém, exibiram alta atividade e estabilidade para estas enzimas em condições alcalina. O *A. flavus* produz várias pectinases quando cultivado com capulhos de algodão (Mellon *et al.*, 2007). Cotty *et al.* (1990) relataram que isolados de *A. flavus* apresentaram atividades de poligacturonases na faixa de pH entre 3,9 e 4,6.

3.5 Purificação parcial das holocelulases – cromatografia em filtração em gel

A cromatografia em filtração em gel S-400 para cada extrato bruto de *A. flavus* concentrado em PM 300 mostrou picos de proteína total diferentes para os quatro substratos utilizados como fonte de carbono (Figura 7). As fontes de carbono lignocelulósicas apresentaram, no volume vazio (frações 20 a 30), uma característica comum, que foi uma coloração branca “leitosa” no material eluído (Figura 7). Essa coloração foi mais intensa na eluição das frações em engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar. A eluição do concentrado de engaço de bananeira foi a que causou maior manchamento da coluna cromatográfica e também a que teve maior quantidade material retido no topo da coluna (Figuras 7A-B). Essa coloração, provavelmente, deve-se à alta pigmentação desse material, que provém dos extrativos totais da bananeira, material rico em polifenóis, que causam manchas em roupas, pele, etc. O perfil proteico de bagaço de cana-de-açúcar (Figuras 7C-D) apresentou, na mesma região observada para os tratamentos de engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo, um segundo pico de proteína total discreto, enquanto o tratamento com celulose microcristalina (Figuras 7G-H) não apresentou o segundo pico pelo método testado.

As atividades de holocelulases dos quatro extratos brutos testados na cromatografia S-400 foram observadas, principalmente, no segundo pico proteico, ou seja, entre as frações 50 e 70 (Figuras 7A-H). Porém, traços de atividades de celulasas, hemicelulasas e pectinases são

observados nas frações do primeiro pico proteico (20 a 30). As atividades enzimáticas apresentadas no segundo pico proteico demonstram que as enzimas coeluíram, tanto entre as hemicelulases e as celulases, quanto entre as pectinases, pois todas as atividades têm maior expressividade nesta região proteica. As atividades de xilanase têm maior significância no pico dois de proteína total dos cultivos com engajo de bananeira e piolho-de-algodão-sujo (Figuras 7A-E). As xilanases em engajo de bananeira tiveram uma perda de atividade de 47%, na comparação com as atividades do extrato bruto (Figura 3). No cultivo com piolho-de-algodão-sujo, a perda foi de 70%, enquanto que, em bagaço de cana-de-açúcar, o valor da perda foi de 95% e, no cultivo em celulose, as atividades de xilanase foram apenas basais. A outra hemicelulase avaliada foi a mananase, que mostrou melhor resultado em engajo de bananeira (Figura 7A), que também apresentou os melhores resultados para as celulases, CMCase e FPase (Figura 7B). A atividade de pectinase mostrou maior multiplicidade no cultivo em bagaço de cana e piolho-de-algodão-sujo (figuras 7C e 7E, respectivamente). A atividade de avicelase não apresentou resultados relevantes em nenhuma das cromatografias de filtração em gel S-400 realizada (7A-H).

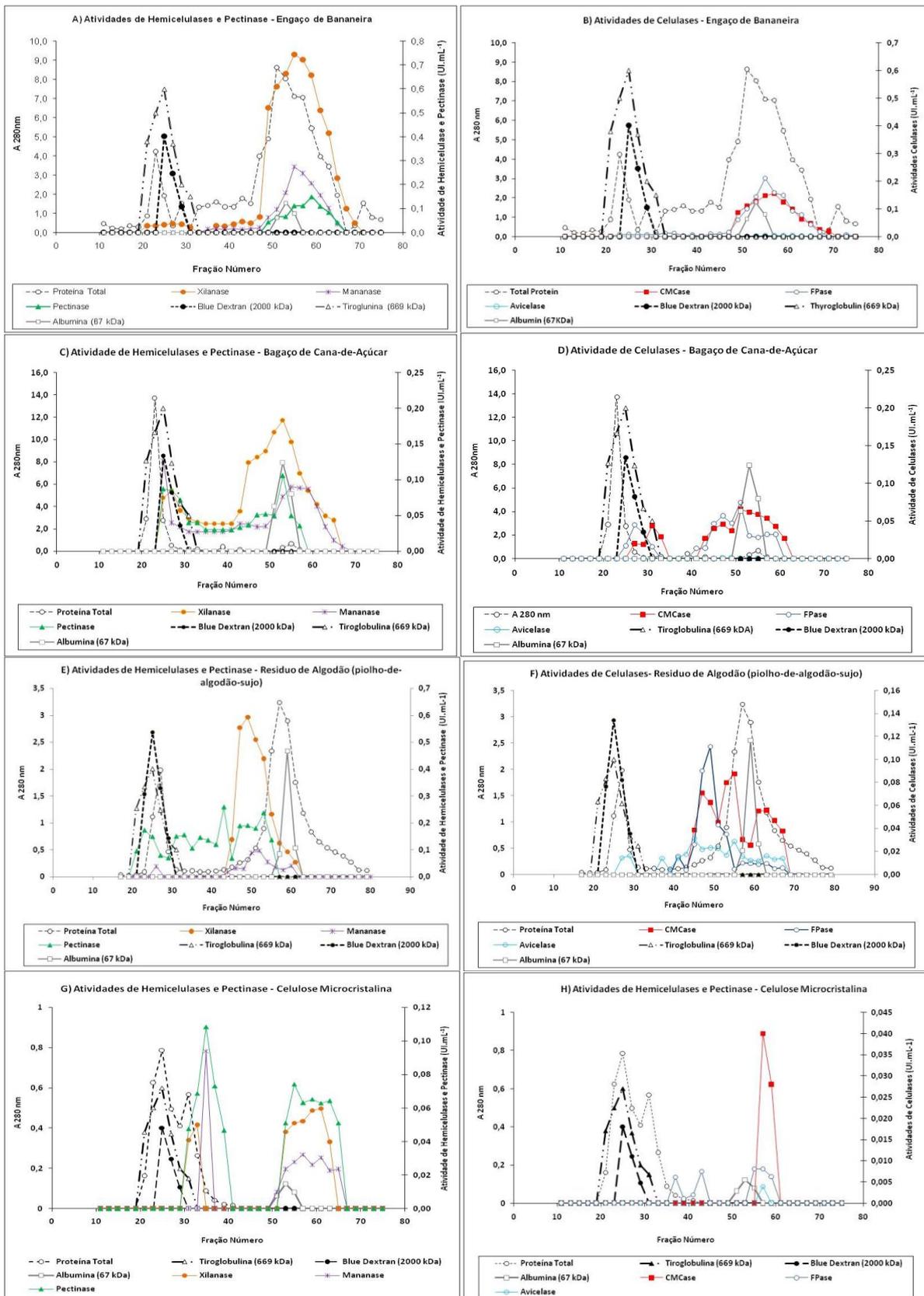


Figura 7. Holocelulases dos concentrados em PM 300 provenientes de extratos brutos de *A. flavus* após cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-400, que utilizou marcadores moleculares. A e B – Hemicelulases, pectinases e celulases (engaço de bananeira); C e D – hemicelulases, pectinases e celulases (bagaço de cana-de-açúcar); E e F – hemicelulases, pectinases e celulases (piolho-de-algodão-sujo); G e H – hemicelulases, celulases e celulases (celulose microcristalina).

3.6 Cromatografia de troca iônica: CM-Sepharose-catiônica e Q-Sepharose-aniônica

As frações entre 50 e 60 da cromatografia S-400 do concentrado do extrato bruto de engaço de bananeira foram agrupadas por apresentarem coeluição das holocelulases (Figuras 7A e 7B). Esse material agrupado foi aplicado em colunas de cromatografia de troca iônica CM-Sepharose e Q-Sepharose (Figuras 8A e B), na tentativa de aumentar o grau de purificação das holocelulases, porém, as enzimas continuaram a coeluir. As atividades enzimáticas em CM-Sepharose demonstraram que as enzimas não aderiram ao gel, saindo todas no gradiente de sal, mostrando assim terem características de carga negativa (Figura 8A). Do mesmo modo, procedeu-se em Q-Sepharose, tendo a maioria das atividades enzimáticas sido detectada após o gradiente salino, havendo um pico com a maioria das atividades enzimáticas e separação de alguns picos de pectinases (Figura 8B). As enzimas ficaram aderidas na CM (pH 5) antes do gradiente salino e liberadas após este gradiente na Q (pH 7), assim pode-se concluir que holocelulases de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira em cultivo submerso são de caráter positivo.

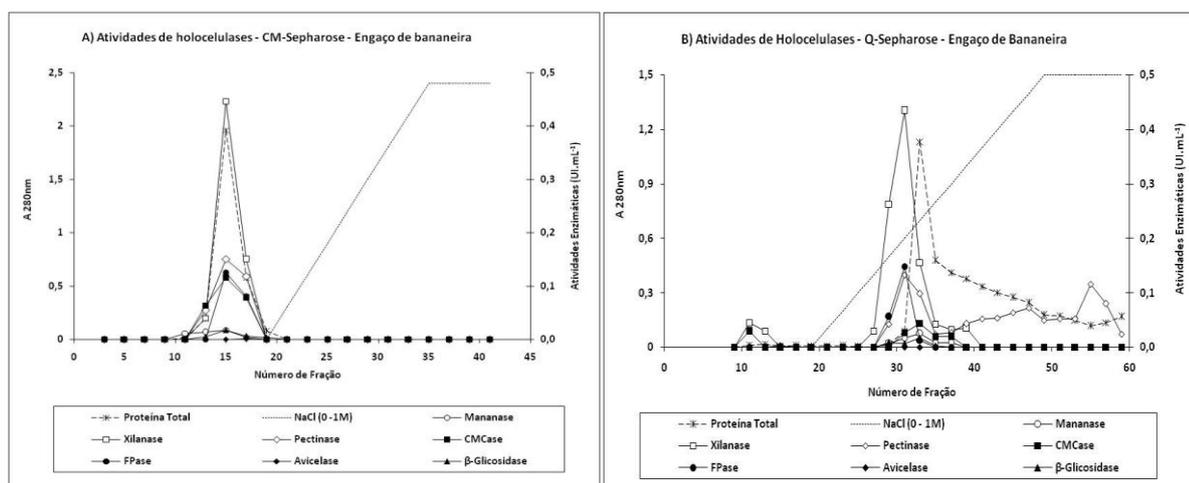


Figura 8. Atividades enzimáticas de holocelulases em cromatografia de troca iônica CM-Sepharose (A) e Q-Sepharose (B) da amostra do concentrado do extrato bruto de engaço de bananeira submetido à filtração em gel (Sephacryl S-400).

3.7 Eletroforese – SDS-PAGE

Os picos das holocelulases que coeluíram na cromatografia de troca iônica CM-Sepharose e Q-Sepharose foram submetidos à eletroforese desnaturante SDS-PAGE (Figura 9). A multiplicidade de proteínas das amostras que coeluíram nas diferentes cromatografias foi evidenciada com várias bandas formadas no gel de eletroforese (Figura 9) das amostras provenientes de CM-Sepharose, principalmente no maior valor aplicado (20 μ L). As mesmas amostras submetidas à eletroforese da figura 9 foram submetidas ao sistema de eletroforese SDS-PAGE *Gel PhastSystem da Amrsham Pharmacia*, revelando-os com *Coomassie Blue* (dados não apresentados). Porém, não foi obtido sucesso com maior nitidez de bandas proteicas, provavelmente devido à quantidade de pigmentos do engaço de bananeira que ainda permanecem em solução, mesmo após as sucessivas cromatografias.

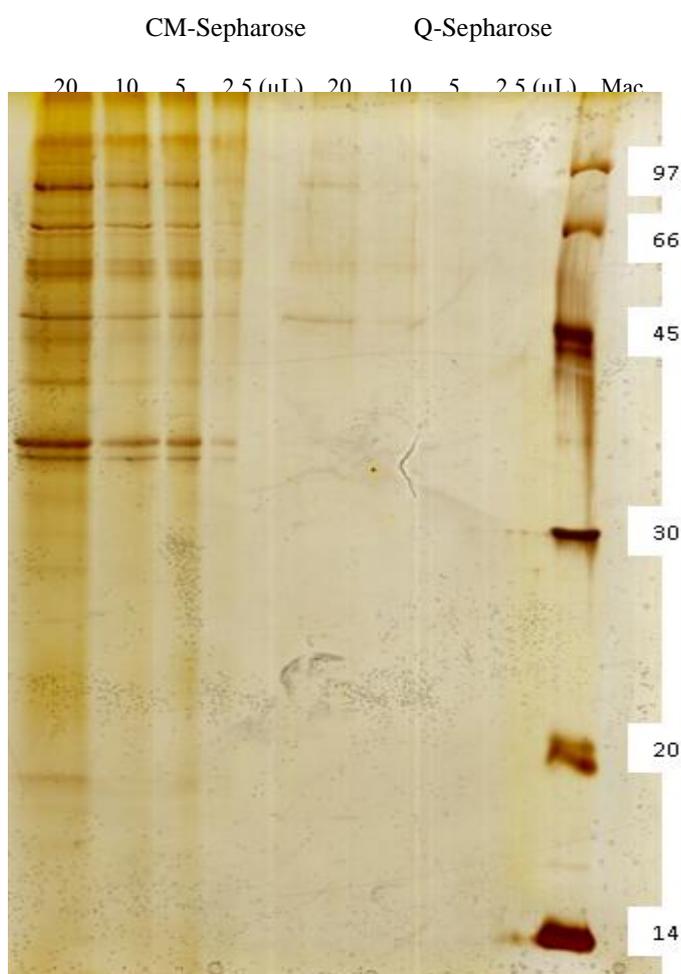


Figura 9. Gel de eletroforese SDS-PAGE. Amostras de holocelulases que coeluíram nas cromatografias de troca iônica CM-Sepharose (A) e Q-Sepharose (B). Mac (marcadores moleculares em kDa).

3.8 Purificação por ultrafiltração em membranas

Atividades enzimáticas para celulase (CMCase) e hemicelulase (xilanase) das amostras de extratos brutos de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar, como também o conteúdo proteico, foram determinadas pelo método de ultrafiltração por membranas Amicon de vários cortes para separação de moléculas pela massa molecular (Figura 10). Para ambos os extratos brutos ultrafiltrados, observaram-se atividades enzimáticas para as duas enzimas testadas, tanto para os concentrados 10X como os ultrafiltrados.

Os perfis de atividade para CMCase, nos dois tipos de fonte de carbono, foram muito semelhantes, não se observando atividades enzimáticas para engaço de bananeira no concentrado e ultrafiltrado da membrana PM 30 (Figura 10A). Tomando como base os resultados observados para CMCase no extrato bruto obtido da filtração em papel de filtro do cultivo do *A. flavus* em engaço e bagaço (Figura 3), pode-se calcular a melhora da atividade de CMCase durante as ultrafiltrações em série, a partir do extrato bruto inicial. Dessa forma, as atividades de CMCase em engaço de bananeira e bagaço de cana foram semelhantes, chegando a aumentar em 195% e 264% no concentrado da membrana de 300 e ultrafiltrado de 100, respectivamente (Figura 10A).

A atividade de xilanase apresentou 178% de aumento de atividade (Figura 10B) para a amostra concentrada de engaço de bananeira em membrana de 300, enquanto no ultrafiltrado de 300 kDa, no concentrado de 100 kDa e no concentrado de 50 kDa apresentou resultados semelhantes ao observado no extrato bruto original (Figura 3). Os menores resultados observados para atividades de xilanases foram observados para o ultrafiltrado e o concentrado de 100 e 30 kDa, respectivamente (Figura 10B). As atividades de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 10B) foram similares às encontradas em engaço de bananeira, com exceção do concentrado em 300 kDa, que apresentou perda de atividade superior a 50%, quando comparado com o descrito na figura 3. O concentrado em PM 300 foi o que apresentou o maior teor de proteína total para os tipos de substratos testados como fonte de carbono (Figura 10C)

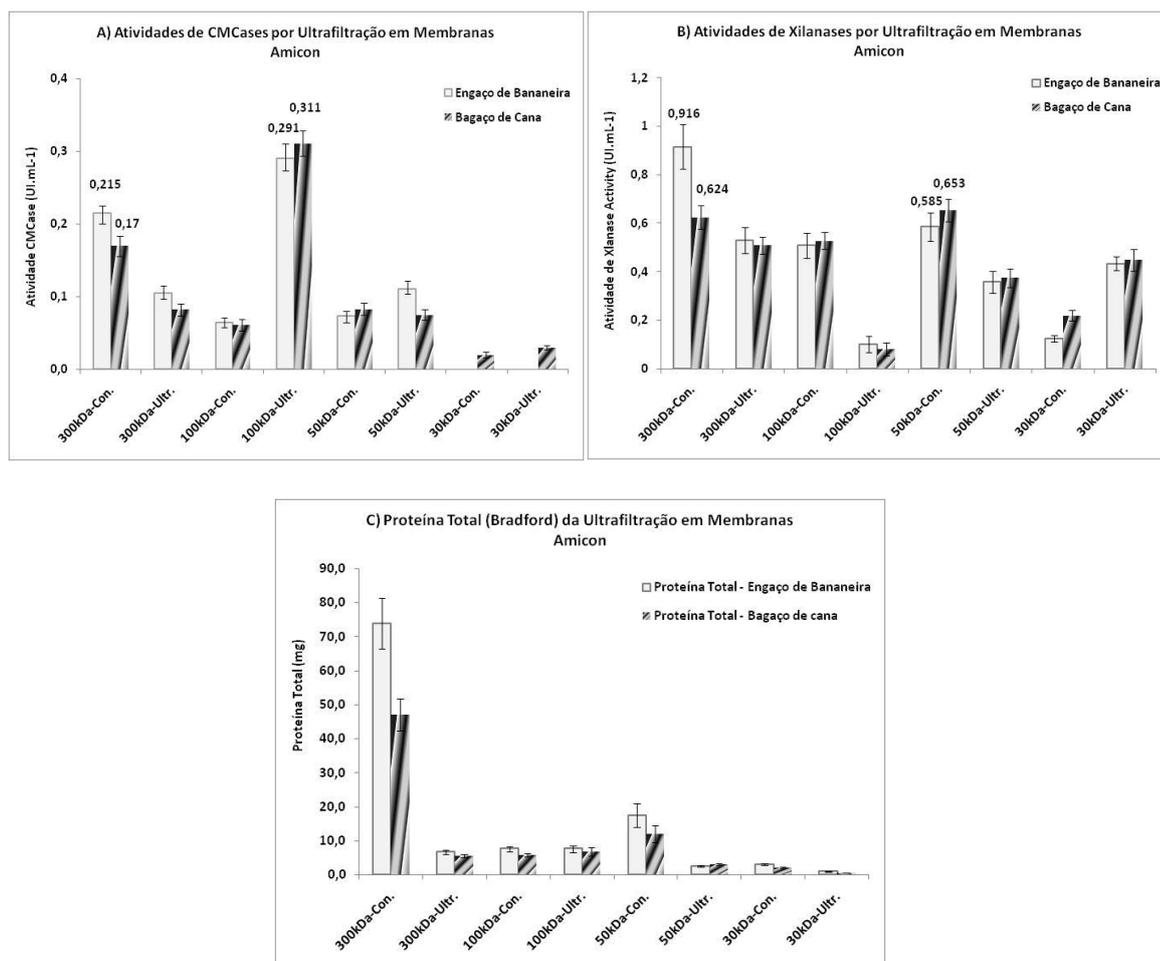


Figura 10. Atividades de CMCases, xilanas e proteína total por ultrafiltração em membranas Amicon de diversos tamanhos (*cut off*) dos extratos brutos de *Aspergillus flavus* crescido em engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar em cultivo submerso (SmF).

3.9 Hidrólise enzimática – Bagaço de cana-de-açúcar

A atividade de pectinase foi superior à das outras holocelulases em todos extratos brutos testados, exceto no extrato bruto de *A. nainiana*, que apresentou a melhor atividade de xilanase (Figura 11). O extrato bruto do fungo selvagem *A. flavus* crescido em engaço de bananeira mostrou que a atividade de pectinase foi muito superior à das demais holocelulases testadas, enquanto o extrato bruto do também fungo selvagem *A. nainiana* teve as atividades de xilanase e pectinase como destaque. O fungo melhorado geneticamente *A. awamori* apresentou atividades relevantes para xilanase, pectinase, mananase e FPase. O também fungo melhorado geneticamente *T. reesei* RUT C30 foi o que teve, para praticamente todas as holocelulases, os melhores resultados, dentre os extratos brutos testados, principalmente para atividade de FPase (Figura 11).

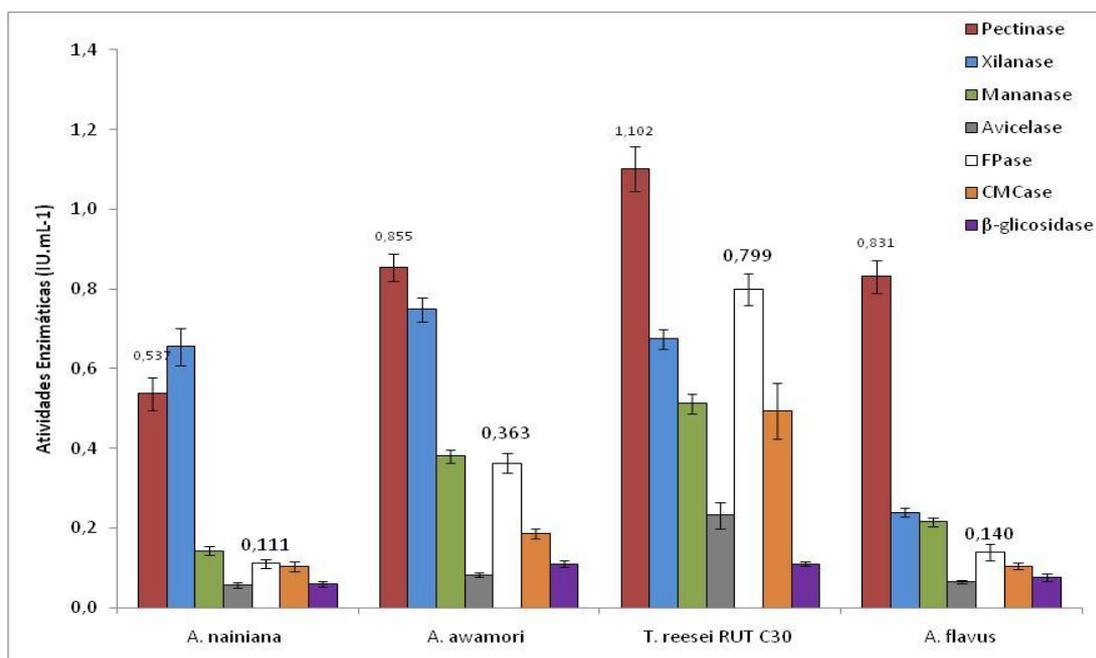


Figura 11. Atividades enzimáticas de celulases, hemicelulases e pectinases dos extratos brutos dos fungos utilizados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar não-tratado e pré-tratado.

O propósito do pré-tratamento foi causar a desconstrução da parede celular dos resíduos lignocelulósicos testados, liberando parte da hemicelulose solúvel e deixando, assim, a celulose mais disponível à ação das enzimas e, ainda, retirar o excesso de pigmentos (extrativos totais) do substrato utilizado no processo de hidrólise. Mesmo com a desconstrução da parede celular da planta pré-tratada, ainda é necessário utilizar um arsenal de enzimas, pois a constituição lignocelulósica desta parede exige um trabalho sinérgico entre diversas enzimas (Siqueira & Ferreira-Filho, 2010). Desse modo, os quatro extratos brutos utilizados neste experimento apresentam os principais grupos de enzimas necessárias para hidrólise dos polissacarídeos em solução após o pré-tratamento.

Na hidrólise do bagaço não-tratado, o extrato bruto da amostra *A. awamori* (proteína concentração de 10 mg) apresentou melhor hidrólise, igual a 30%, após 24 horas de incubação, atingindo o valor de 2,5 g.L⁻¹ de glicose. A liberação de açúcares redutores foi de 5,4 g.L⁻¹, após 96 horas. Na hidrólise do bagaço pré-tratado, o extrato bruto de *T. reesei* RUT C30 apresentou o

melhor rendimento, 25% e *A. awamori* produziu 12%, ambos após 48 horas de incubação. Extratos brutos de *A. flavus* e *A. nainiana* tiveram comportamento semelhante, com a melhor recuperação de proteína nas concentrações mais baixas. No entanto, mostraram rendimento na hidrólise inferior a 5%. Estes resultados podem ser explicados devido à presença de inibidores em cultivo com engaço de bananeira 1%, que foi a fonte de cultivo *A. flavus* e *A. nainiana*. Assim, pode-se inferir que, devido à menor diluição, apresentaram maior inibição para ambos na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (dados não apresentados). Estes dois fungos também são cepas selvagens que estão sendo testadas frente a fungos (*A. awamori* e *T. reesei* RUT C30) que já foram melhorados geneticamente para produzir mais celulase total, para processos de hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

Avanços na genética, na biotecnologia, em processos químicos e da engenharia estão conduzindo a um novo conceito para a indústria de conversão da biomassa, que é uma fonte abundante e renovável, valiosa para a produção de combustíveis e outros produtos, geralmente referenciada na literatura como biorrefinarias (Ragauskas *et al.*, 2006). No entanto, a utilização de biomassa para a produção de etanol combustível de resíduos lignocelulósicos ainda está em desenvolvimento (Seungdo & Bruce, 2004). O bioetanol pode ser produzido a partir da fermentação de açúcares produzidos por hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica, que inclui materiais como os resíduos agrícolas (por exemplo, resíduos da colheita do milho e bagaço de cana-de-açúcar), culturas herbáceas (por exemplo, alfafa, *switchgrass*) e resíduos florestais. As principais matérias-primas para etanol no Brasil são provenientes de cana-de-açúcar.

Segundo Bon & Ferrara (2007), a relação entre as condições do crescimento fúngico e a produção de celulases tem sido discutida atualmente entre pesquisadores da área. As autoras citam que pressupostos teóricos têm sido sugerido que, para ser comercialmente bem sucedido, é necessário para produzir 1.100 unidades de filtro de papel (FPU).L⁻¹.h⁻¹, o que requer uma quantidade de enzima numa taxa de 70 g.L⁻¹.h⁻¹ na cultura de crescimento. Nos termos mais

favoráveis, condições de culturas fúngicas podem produzir $35 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de massa celular. Essa lacuna poderia ser preenchida se os microrganismos escolhidos apresentassem uma ou ambas das seguintes propriedades: (i) maior capacidade de alta produção de celulase e (ii) capacidade de produzir enzimas com alta atividade específica. Estas propriedades desejáveis podem ser alcançadas por uma nova estirpe selecionada e/ou melhorada (Gosh & Gosh, 1992).

3.10 Adsorção de enzimas em avicel

Xilanases e CMCases dos extratos brutos dos fungos da tabela 3 apresentaram consideráveis percentuais de adsorção junto às estruturas da celulose microcristalina, sugerindo a presença de módulo de ligação a carboidratos (CBM) em suas estruturas. O *A. flavus* mostrou, na adsorção de CMCases, um dos melhores índices em conjunto com *A. awamori* e *A. nainiana*, com valores superiores a 80%, enquanto a adsorção de xilanases em avicel apresentou em torno de 35%, tendo *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori* apresentado valores acima de 80%.

Xilanase é relatada por apresentar uma arquitetura modular que inclui um módulo catalítico ligado a um ou mais CBM (Fontes, *et al.*, 2004). Celulases e xilanases exibem uma arquitetura modular que inclui um módulo catalítico ligado a uma ou mais CBMs não-catalíticas. CBMs foram classificadas em 52 famílias diferentes, com base na similaridade da estrutura primária. Esses módulos não-catalíticos mediam um contato íntimo e prolongado da enzima com o substrato alvo para obter a hidrólise eficiente dos polissacarídeos alvos (Guerreiro *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2008).

Tabela 3. Módulo de ligação a carboidratos (CBM) de CMCase e xilanase em avicel (celulose microcristalina) por alguns fungos cultivados em diferentes fontes de carbono lignocelulósica.

Substrato	Extrato bruto (fungo)	Controle (UI.mL ⁻¹)	Ensaio (UI.mL ⁻¹)	Controle (%)	Ensaio (%)
CMC	<i>A. nainiana</i> (engaço de bananeira 1%)	0,32	0,26	100	81,25
	<i>A. nainiana</i> (farelo de trigo 1%)	0,31	0,23	100	74,19
	<i>T. reesei</i> RUT C30 (lactose 3%)	0,79	0,48	100	60,76
	<i>A. awamori</i> (farelo de trigo 3%)	0,40	0,34	100	85,00
	<i>A. flavus</i> (engaço de bananeira 1%)	0,30	0,25	100	83,33
XIL	<i>A. nainiana</i> (engaço de bananeira 1%)	0,55	0,14	100	25,45
	<i>A. nainiana</i> (farelo de trigo 1%)	0,52	0,14	100	26,92
	<i>T. reesei</i> RUT C30 (lactose 3%)	1,00	0,86	100	86,00
	<i>A. awamori</i> (farelo de trigo 3%)	1,18	0,99	100	83,90
	<i>A. flavus</i> (engaço de bananeira 1%)	0,51	0,18	100	35,29

4. Conclusões

O fungo *Aspergillus flavus* mostrou eficiência na produção de holocelulases, quando cultivado em resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, como engaço de bananeira, piolho- algodão-sujo e bagaço de cana-de-açúcar. Pectinase (poligalacturonase) e xilanase foram as enzimas que tiveram atividades de maior relevância. A atividade de pectinase apresentou melhores resultados a 60°C e em pH alcalino (9,0). As cromatografias em filtração em gel S-400 e de troca iônica (CM-Sepharose e Q-Sepharose) do extrato bruto de engaço de bananeira concentrado em PM 300 não se separaram, configurando uma coeluição destas holocelulases, que mostraram diversas bandas proteicas com variadas massas moleculares em gel de eletroforese. A purificação parcial das holocelulases por meio de ultrafiltração em membranas com diferentes tamanhos de poros mostraram que as atividades de xilanase e CMCase podem aumentar até 200%, na comparação com

o extrato bruto filtrado em papel filtro. A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado teve resultado relevante, levando-se em conta que o *A. flavus* utilizado é fungo selvagem, apresentando índice de conversão de carboidratos em açúcares redutores de 5%, cinco vezes menos que o *Trichoderma reesei* RUT C30 (melhorado geneticamente), apontado pela literatura como um dos melhores produtores de celulasas para o processo de hidrólise enzimática. O cultivo de *A. flavus* em engaço de bananeira apresentou índices significativos para xilanase e CMCase para módulos de ligações a carboidratos (CBM).

Como perspectiva de trabalho futuro, tem-se a purificação de uma poligalacturonase e xilanase em piolho-de-algodão-sujo, por apresentar menos pigmentos que o engaço de bananeira, causando menores interferências nos géis de eletroforese e também formulações de misturas enzimáticas de extratos brutos de outros fungos com os extratos brutos de *A. flavus* crescidos em engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo, para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados.

5. Referências

- ABDEL-SATER, M.A.; EL-SAID, A.H.M. 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 47:15-21.
- ANDREAUS, J.; FILHO, E.X.F.; BON, E.P.S. 2009. Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In: **Biocatalysis and Bioenergy**. John Willey & Sons, USA pp.197-229.
- AROTUPIN, D.J. 2007. Effect of different carbon sources on the growth and polygalacturonase activity of *Aspergillus flavus* isolated from cropped soils. **Research Journal of Microbiology**, 2(4):362-368.
- BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* **Bioresource Technology**, 98, 504.
- BAILEY, M.J.; BUCHERT, J.; VIHKARI, L. 1993. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 40 (2/3):224-229.

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, B. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-99.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. 2007. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. Document prepared for "**The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries**", an FAO seminar held in Rome on 12 October 2007, <http://www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm>.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.
- CARMONA, E.C.; PIZZIRONI-KLEINER, A.A.; MONTEIRO, R.T.R.; JORGE, J.A.; 1997. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**. 38(6): 387-394.
- CLEVELAND, T.E.; COTTY, P.J. 1991. Invasiveness of *Aspergillus flavus* isolates in wounded cotton bolls is associated with production of a specific fungal polygalacturonase. **Phytopathology**, 81:155-158.
- COTTY, P.J.; CLEVELAND, T.E.; BROWN, R.L.; MELLON, J.E. 1990. Variation in Polygalacturonase Production among *Aspergillus flavus* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(12).
- de VRIES, R.P.; VISSER, J. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 65(4):497-522.
- FONTES, C.M.G.A.; PONTE, P.I.P.; REIS, T.C.; SOARES, M.C.; GAMA, L.T.; DIAS, F.M.V.; FERREIRA, L.M.A. 2004. A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of a recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. **British Poultry Science**, 45:648.
- FREER, S.N.; SKORY, C.D.; BOTHAST, R.J. 1998. Production of fuel alcohol from cellulosic biomass. In PANALAI, S.G. (Ed.) **Recent Research Developments in Microbiology**, pp.201-210, Trivandrum: Research Signpost.
- GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y.; 1999. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, 87:511-519.
- GOSH, B.K.; GOSH, A. 1992. Degradation of Cellulose by Fungal Cellulase. In **Microbial Degradation of Natural Products**, ed. G. Winkelmann, VCH Publishers, Inc., New York, pp.84-126.
- GUERREIRO, C.I.P.D.; RIBEIRO, T.; PONTE, P.I.P.; LORDELO, M.M.S.; FALCÃO, L.; FREIRE, J.P.B.; FERREIRA, L.M.A.; PRATES, J.A.M.; FONTES, C.M.G.A. 2008. Role of a family 11 carbohydrate-binding module in the function of a recombinant cellulase used to supplement a barley-based diet for broiler chickens. **British Poultry Science**, 49(4):446-454.

- HOLTZ, M.; SILVEIRA, M.L.L.; WISBECK, E. 2007. Caracterização e utilização do resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de corpos frutíferos de *Pleurotus Ostreatus*. In: **VI Congresso Brasileiro do Algodão, 2007**, Uberlândia - MG. VI Congresso Brasileiro do Algodão. Campinas - SP : Editora Esphera, 2007. v. VI. p. 13-13.
- IEMBO, I.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH, JR, C.; FILHO, E.X.F.. Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22(5):475-479.
- KOTE, N.V.; PATIL, A.G.G.; MULIMANI, V.H. 2009. Optimization of the Production of Thermostable endo- β -1,4 Mannanases from a Newly Isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 152(2):213-223.
- KIM, Y.; HENDRICKSON, R.; MOSIER, N.S.; LADISCH, M.R. 2009. Liquid Hot Water Pretreatment of Cellulosic Biomass. **Biofuels Methods and Protocols**, MIELENS, J.R. Humana Press, 581, 93-102.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
- MELLON, J.E.; COTTY, P.J. 2007. Preliminary purification and characterization of a xylanase activity from *Aspergillus flavus*. **Proceedings of the belt wide cotton conferences**, p.147–152.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426–428.
- MOREIRA, L.R.S.; MATTOS, I.; MONCLARO, A.V.; SANTOS, S.S.T.; JENSEN, A.T.; SIQUEIRA, F.G.; FILHO, E.X.F. 2008. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, 10(2):35-45.
- MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, 96(18), 1986-1993.
- MURPHY, R.A.; HORGAN, K.A. 2005. Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi. In KAVANAGH, K. Fungi: **Biology and Applications**, chapter 5, pp.113-143.
- NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R.R.R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.M.; BON, E.P.S.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme Microbiology Technology**, 31:549-555.
- RAGAUSKAS, A.J.; WILLIAMS, C.H.; DAVISON, B.H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C.A.; FREDERICK, W.J.JR.; HALLETT, J.P.; LEAK, D.J.; LIOTTA, C.L.; MIELENZ, J.R.; MURPHY, R.M.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. 2006. The Path

Forward for Biofuels and Biomaterials. *Industrial Crops and Products*. **Science**, 311(5760):484-489.

SALLES, B.C.; CUNHA, R.B.; FONTES, W.; SOUSA, M.V.; FILHO, E.X.F.. 2000. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**. 81(2-3):199205.

SEUNGDO, K.; BRUCE, E.D. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**. Volume 26, pag. 361–375, 2004.

SILVA, A.S.; KNOPP, F.M.; GOTTSCHALK, L.M.F.; PERRONE, C.C.; ZACCHI, Z.; BON, E.P.S. 2008. Sugar cane bagasse enzymatic hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases. **30° Symposium Biotechnology for Fuel and Chemicals**. New Orleans, USA, 2008.

SIQUEIRA, F.G.; DIAS, E.S.; SILVA, R.; MARTOS, E.T. Biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* cultivation in banana stalk- and Bahia grass-based substrates. **Horticultura Brasileira**, 2009 (in press).

SIQUEIRA, F.G.; FERREIRA-FILHO, E.X. 2010. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, 7, 54-60.

SOUZA, C.G.M.; GIRARDO, N.S.; COSTA, M.A.F.; PERALTA, R.M. 1999. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus flavus*. **Journal of Basic Microbiology**, 39(3):155-160.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SUN, Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**. 56(2):195-204.

VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA; V.J.W.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2007. Detection of α -amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic PhastGels. **Analytical Biochemistry**, 366(1):113-115.

ZHANG, Y.-H.P. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocelluloses biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35(5):367-375.

Capítulo IV

Avaliação de Extratos Enzimáticos Fúngicos em Aplicações Têxteis - Biopurga, Biopolimento e Bioestonagem

Félix Gonçalves de Siqueira¹; Martinho Rau²; Aldo José Pinheiro Dillon³; Edivaldo Ximenes

Ferreira Filho¹; Jürgen Andreaus²

¹Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular – Universidade de Brasília – UnB; ²Laboratório de Química Têxtil do Departamento de Química – Universidade Regional de Blumenau – FURB; ³Laboratório de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul – UCS.

RESUMO

O emprego de enzimas na indústria têxtil já é uma realidade, pois são vários os processos que utilizam essas moléculas para beneficiamento de tecidos, tanto de origem vegetal como animal. Neste trabalho, utilizaram-se enzimas do extrato bruto de *Aspegillus flavus* crescido em engaço de bananeira como fonte de carbono, em comparação com outro extrato bruto de *Penicillium echinulatum* e enzimas comerciais para os processos de biopolimento, biopurga e bioestonagem. *A. flavus* mostrou valores significativos de atividade de pectinase nesta fonte de carbono lignocelulósica, sendo este grupo de enzimas importante para o proceso de biopurga, mostrando resultados significativos para testes de umectabilidade. Porém, não apresentou valores relevantes para atividade de CMC_{ase}. Dessa forma, o extrato bruto desse fungo mostrou resultados relativos quanto à liberação de açúcares redutores para os ensaios de biopolimento. No ensaio para bioestonagem, os resultados foram similares aos dos demais tratamentos, quanto à leitura espectral de K/S, no entanto, com os menores valores de açúcares redutores, em função da baixa atividade de CMC_{ase}. De modo geral, o extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira apresentou

alguns resultados significativos para os processos têxteis, porém, a coloração do meio, causada pelos extrativos totais, provocou manchamento dos tecidos. Desse modo, há a necessidade de retirar esses pigmentos do meio ou, até mesmo, utilizar esta propriedade para a elaboração de um corante natural.

1. Introdução

A composição típica de fibras de algodão cru é de, aproximadamente, 90% de celulose, 1,5% de proteína, 1,0% de substâncias pécicas, 1,0% de cinzas, 0,5% de graxas, 0,5% de açúcares totais e, ainda, traços de pigmentos naturais. Essas quantidades dependem da maturidade, da variedade de algodão e de condições climáticas. Os componentes não-celulósicos estão presentes na cutícula e no lúmen (Wakelyn, 2007).

O algodão pode conter de 4% a 12% de impurezas, na forma de graxas, proteínas, pectinas, cinzas, hemiceluloses, açúcares redutores, pigmentos e cinzas (Guillén & Garrido, 1987; Hardin *et al.*, 1998). Pectinas e proteínas de alta massa molar, ceras e graxas são os principais responsáveis pela hidrofobicidade ou pela baixa umectação das fibras de algodão cru com água. São removidas a quente em meio alcalino ou com tratamentos enzimáticos apropriados. A maior parte dos compostos não poliméricos pode ser removida com água (Hsieh, 2007; Wakelyn, 2007).

A palavra “têxtil” vem do latim *texere*, que significa tecer e era originalmente aplicada apenas para tecidos. A indústria têxtil é um dos maiores segmentos industriais em todo o mundo e, modernamente, abrange diferentes setores de consumo, como têxteis de vestuário, têxteis do lar, têxteis de medicamentos e têxteis técnicos. A produção de tecidos inclui várias etapas a partir do beneficiamento do algodão cru, como apresentado na figura 1, que retrata a jornada do algodão desde o campo até o consumidor final.

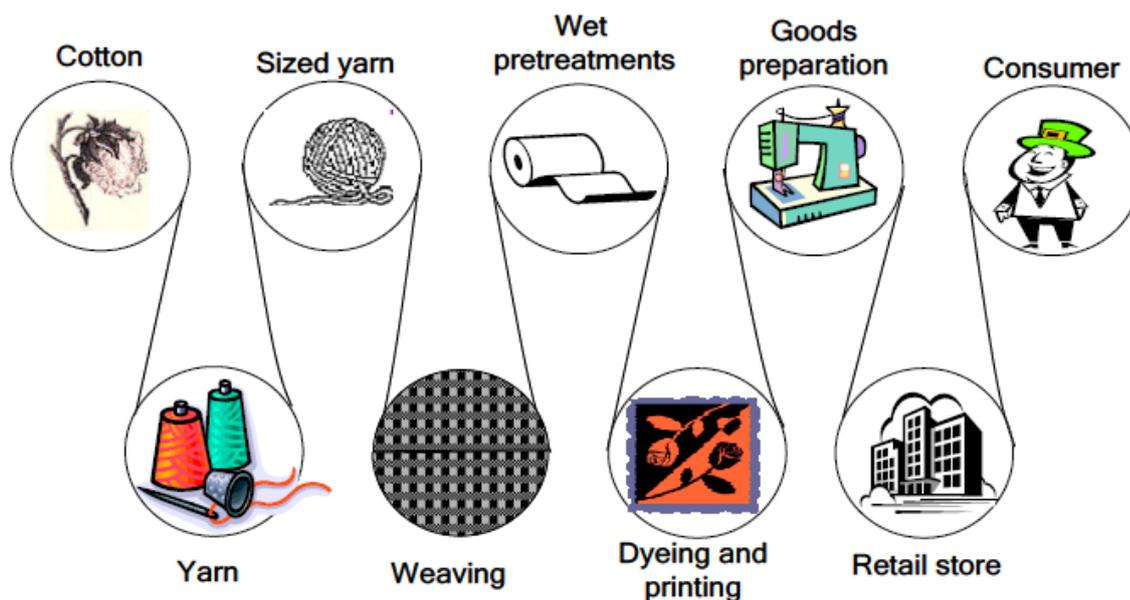


Figura 1. Representação esquemática da cadeia de processamento de algodão, desde a preparação da fibra até o consumidor (Fonte: P.B. Agrawal *The Performance of Cutinase and Pectinase in Cotton Scouring. Thesis, University of Twente, the Netherlands ISBN 90-365-2243-9*).

Os processos de preparação dos materiais têxteis são necessários para remover impurezas das fibras, melhorar a aparência estética e facilitar o processamento uniforme das fibras para o tingimento, estamparia e/ou acabamentos mecânicos e funcionais (Vigo, 1994; Buschle-Diller *et al.*, 1998; Andreus & Cavaco-Paulo, 2008).

Celulases e hemicelulases são produzidas por grande quantidade de microrganismos, como bactérias, actinomicetos, fungos e leveduras. Entretanto, os fungos filamentosos são os microrganismos produtores mais eficientes de enzimas extracelulares (Warren, 1996; Jørgensen *et al.*, 2003; Shallom & Shoham, 2003; Guimarães *et al.*, 2006).

As celulases são aplicadas na indústria de alimentos (extração e/ou clarificação de sucos de frutos e vegetais; tratamento de vinhos e cervejas, com aumento na quantidade de aromas devido à ação de β -glicosidasases; extração de óleos; melhoramento na qualidade de produtos de panificação), na indústria têxtil (bioestonagem, biopolimento), na indústria de papel e celulose (reprocessamento do papel, reuso da água de tratamento), na bioconversão de produtos lignocelulósicos em

biocombustíveis e outros bioprodutos e como suplemento na ração animal (para aumentar a digestibilidade de ingredientes lignocelulósicos, como silagens) (Bhat, 2000; Duran & Durán, 2000; Dillon, 2004; Kamm & Kamm, 2004; Szakacs *et al.*, 2006; Lopez-Casado *et al.*, 2008).

As pectinases são aplicadas no processamento de vinhos e sucos (aumentando o rendimento de extração e de clarificação) e na extração de óleo vegetal, em especial do azeite de oliva. Podem ser aplicadas também na maceração de fibras de origem vegetal, como linho, cânhamo e juta, e na purga do algodão, visando à remoção da pectina presente nessas fibras (Ferreira-Filho, 2004; Favela-Torres, 2006).

A aplicação da biotecnologia está crescendo na indústria têxtil, devido a vantagens como a realização de processos em condições mais moderadas, menor consumo de energia e de produtos auxiliares têxteis, redução da carga poluente e do volume de efluentes. Os processos têxteis que envolvem a aplicação de enzimas incluem desengomagem (amilases, lipases), purga (pectinases, proteases, celulases), alvejamento (lacases, peroxidases, catalases), tingimento (catalases, fenol oxidases, peroxidases, azoredutases) e acabamentos (celulases, proteases) (Andreus & Cavaco-Paulo, 2008).

A história do processamento e a estrutura do material têxtil e as condições processuais, como a intensidade da agitação mecânica, podem ser tão importantes quanto a escolha da composição e da concentração das enzimas nos resultados desejados dos materiais (Buschle-Diller *et al.*, 1998; Cavaco-Paulo, 1998; Rousselle *et al.*, 2003).

O peloteamento das fibras têxteis, também denominado *pilling*, é um problema perene dos materiais têxteis. A formação de *pilling* inicia-se com a presença de “penugem” (*fuzz*) ou das fibras (principalmente fibras mais curtas) que emergem da superfície dos fios. Fatores externos, como a abrasão/fricção durante o uso da roupa ou durante o processo de lavagem, favorecem a formação de *pilling* (Hearle & Wilkins, 2006).

O biopolimento é um processo para a remoção de “penugem” e *pilling* da superfície dos tecidos e roupas, envolvendo a ação de celulases e alta agitação mecânica (Cavaco-Paulo & Gübitz, 2003). O ataque das celulases ocorre, preferencialmente, na estrutura amorfa das fibras, quebrando as saliências das fibras superficiais. Os parâmetros que influenciam nos efeitos desejados são praticamente os mesmos da bioestonagem. Esse tratamento, realizado após o tingimento, pode resultar em uma remoção parcial de corantes e a mudança da cor depende do tipo de corante utilizado. Como resultado deste processo, têm-se maior resistência à formação de *pilling*, maior brilho das cores, superfícies “mais limpas”, aumento da maciez do material e redução da quantidade de algodão morto e imaturo (Nierstrasz & Warmoeskerken, 2003).

A bioestonagem é um processo que envolve a remoção de corantes por ação enzimática aliada à agitação mecânica e ao efeito de abrasão (fricção), devido ao rompimento das microfibrilas da superfície das fibras. Em tecidos denim, a remoção do corante provoca um contraste dos fios tingidos com os fios não tingidos. A principal vantagem da bioestonagem é a menor abrasão dos materiais têxteis, quando comparada com o processo envolvendo pedras-pomes (Andreaus, 2001; Cavaco-Paulo & Gübitz, 2003). A dosagem das enzimas depende do tipo, da densidade, da porosidade e da hidrofiliabilidade do material têxtil, assim como do tempo de tratamento (15 a 60 minutos), pH (4,5 a 7,0), temperatura (45° a 65°C), relação de banho (1:3 a 1:20), auxiliares químicos (em geral, a presença de surfactante não-iônico e agentes dispersantes são recomendadas) e o tipo de equipamento utilizado (Andreaus, 2001; Nierstrasz & Warmoeskerken, 2003). As principais formulações comercialmente disponíveis são produzidas pelos fungos *T. reesei* (maior atividade em pH 5) e *Humicola insolens* (maior atividade em pH 7) (Cavaco-Paulo & Gübitz, 2003; Nierstrasz & Warmoeskerken, 2003). As celulases, preferencialmente neutras e ricas em endoglicanases, são indicadas para a remoção de excesso de corante de artigos denim e amaciamento de tecidos de algodão (Figura 2), sem danos significativos às fibras (Bhat, 2000).

A biopurga é um pré-tratamento dos tecidos têxteis anterior ao processo de tingimento. A remoção de pectina da parede celular do algodão objetiva promover o aumento da hidrofiliabilidade das fibras, facilitando a penetração de água, corantes e produtos auxiliares, contribuindo para a diminuição do consumo de água, quando comparado com processos alcalinos de purga convencional (Cavaco-Paulo & Gübitz, 2003; Andraus & Cavaco Paulo, 2008). A remoção enzimática de substâncias hidrofóbicas pode ser feita com o auxílio de celulases, pectinases, proteases, pectina liases, poligalacturonases e as lípases, de maneira isolada ou em conjunto. As vantagens incluem menores temperaturas, maior faixa de pH, próximo do neutro, ficando entre 5 e 9 (mas não em pHs extremos), aumento da umectabilidade, brilho, maciez dos fios e grau de branqueamento dos materiais celulósicos (Buschle-Diller *et al.*, 1998; Hartzell & Hsieh, 1998). A desativação das enzimas pode ser feita facilmente com o aumento da temperatura ou a mudança de pH (Buschle-Diller *et al.*, 1998).

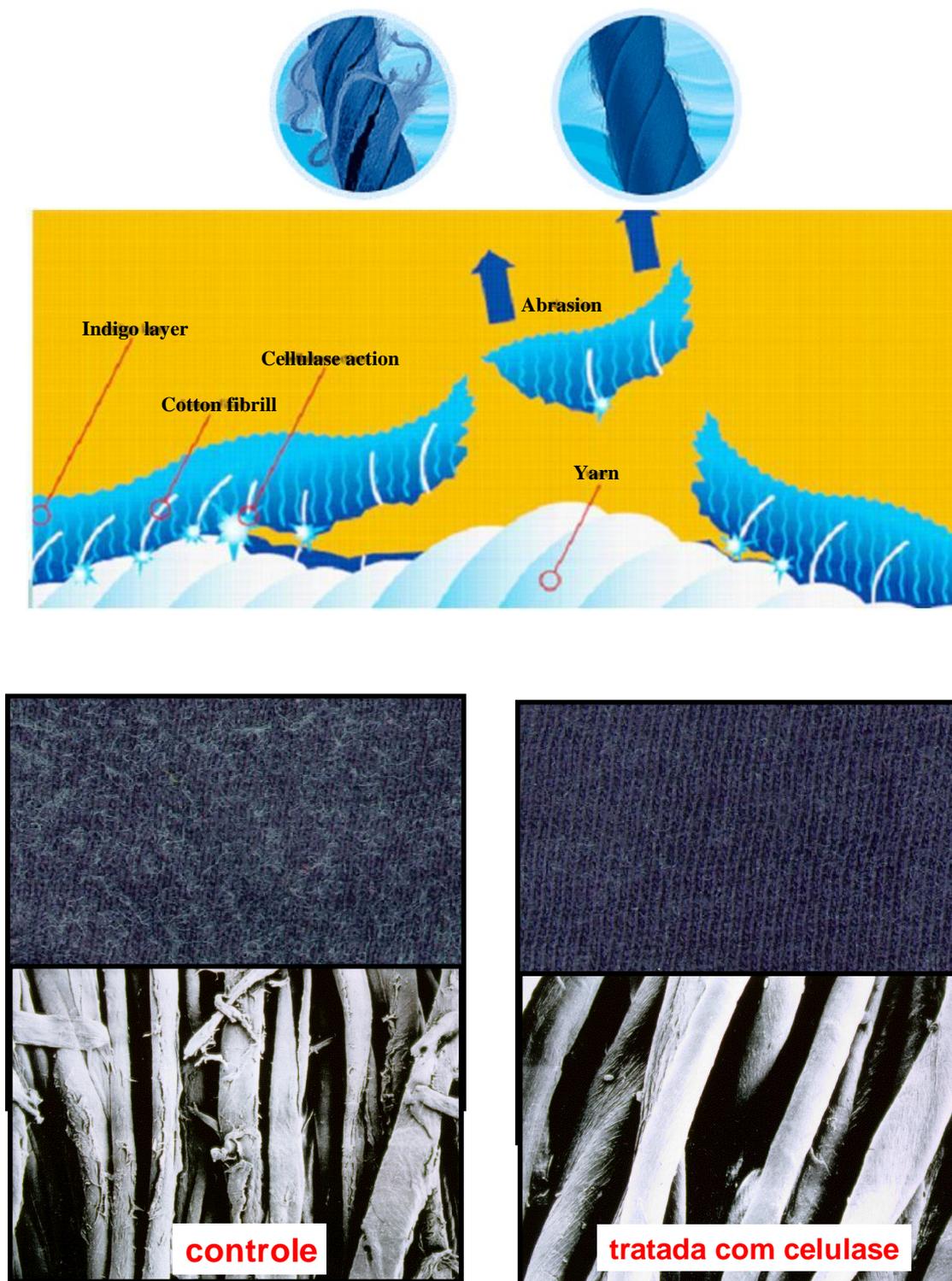


Figura 2. Aplicações de celulases na indústria têxtil. A primeira imagem representa o efeito de sucessivas lavagens com e sem celulases; a segunda representa o esquema da ação das celulases em conjunto com agentes que causam abrasão (moedas metálicas, por exemplo) produzindo a desbotagem de tecidos denim; a terceira refere-se à comparação macro e microscópica da ação com e sem celulases no biopolimento (Fonte: Imagens adaptadas da Biotech-based word leader in Textile Industry, Novozyme. *The Industrial Enzymologist*, Blog de l'assignatura d'Enzimologia Industrial Enzims aplicats a processos de la indústria del paper, E.R. Freire. Curs 2009-2010).

Um pré-tratamento com água quente (próximo à ebulição) aumenta a eficiência da ação das enzimas em algodão cru (Buschle-Diller *et al.*, 1998; Hartzell & Hsieh, 1998). A presença de surfactante auxilia na solubilização de ceras e, conseqüentemente, facilita o ataque das enzimas sobre a pectina, assim como sobre a hemicelulose e a celulose (Li & Hardin, 1998).

O tratamento com pectinases promove o aumento da umectabilidade com menor perda de massa e com maior estabilidade dimensional. O tratamento com celulases promove maior umectabilidade e brilho, mas provoca significativa perda de massa e de resistência dos fios ou de tecidos. Períodos longos, duas horas ou mais, de tratamento ou concentrações elevadas de enzimas são necessários para a obtenção de efeitos desejáveis (Hartzell & Hsieh, 1998; Lin & Hsieh, 2001).

Tratamentos com diferentes combinações de enzimas (celulase, pectinase e protease) mostraram que as combinações celulase/pectinase e celulase/pectinase/protease apresentaram melhores resultados, quando comparados com os tratamentos com as enzimas de maneira isolada (Karapinar & Sariisik, 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar os efeitos do extrato bruto enzimático de *Aspergillus flavus* crescido em engaço de bananeira como fonte de carbono com outros complexos enzimáticos de origem fúngica, com e sem produtos auxiliares (surfactante não-iônico e agente complexante), nos processos têxteis de biopolimento, biopurga e bioestonagem.

2. Materiais e Métodos

2.1 Extratos brutos e enzimas

O extrato bruto enzimático de *Aspergillus flavus*, obtido do cultivo em meio líquido com o engaço de bananeira como fonte de carbono, após 5 dias de cultivo a 28°C e com agitação de 120 rpm, foi centrifugado e filtrado. O meio de cultura suplementado para o cultivo deste fungo foi feito em erlenmyer de dois litros, no volume de 500 mL tendo a seguinte composição (m/v): 0,7%

KH₂PO₄, 0,2% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,1% (NH₄)₂SO₄, e 0,06% de extrato de levedura, pH 7,0. A incubação foi feita com suspensão de esporos de 10⁸ esporos/mL.

O extrato bruto de *Penicillium echinulatum* oriundo do cultivo submerso com celulose microcristalina (Sigmacell) como fonte de carbono foi utilizado para os ensaios de biopolimento. Esse material foi produzido no Instituto de Biotecnologia, da Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul, RS).

Denimax Acid L (Novozymes) é uma preparação enzimática comercial, produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, composta de celulases de perfil ácido para tratamentos de estonagem de denim (desbotamento) e biopolimento (Szakacs et al., 2006).

Viscozyme L (Novo Nordisk A/S) é uma preparação enzimática comercial, produzida pelo fungo *Aspergillus aculeatus*, composta de celulases, hemicelulases e pectinases, com atividade em pH ácido para tratamentos de materiais vegetais (Szakacs et al., 2006) e biopurga de algodão.

2.2 Reagentes e atividades enzimáticas

Todos os ensaios enzimáticos para a determinação de proteína total, açúcares redutores solúveis e atividades enzimáticas foram realizados por, pelo menos, três vezes.

2.2.1 Atividades enzimáticas e proteína total

Foram determinadas as atividades enzimáticas dos extratos brutos para celulases, hemicelulases e pectinases. A quantidade de açúcares redutores foi determinada segundo o método do DNS (Miller, 1959), conforme descrito nos Capítulos II e III, como também o valores de proteína total (Bradford, 1976).

Uma unidade internacional (UI) é definida como a atividade enzimática necessária para a liberação de 1 μmol de equivalentes de monômero (glicose, xilose, manose, ácido galacturônico) por unidade de volume e por minuto de reação, obtida nessas condições de análise (Martins, 2005).

As atividades (UI: $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) foram calculadas conforme a equação 01:

[Eq 01]

$$\text{Atividade} = \frac{\text{diluição} \times \text{AR formados} (\mu\text{mol/mL}) \times \text{Vol total da mistura reacional (mL)}}{\text{Tempo (min)}}$$

A concentração enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi calculada conforme a equação 02.

[Eq 02]

$$\text{C. E.} = \frac{\text{diluição} \times \text{AR formados} (\mu\text{mol/mL}) \times \text{Vol total da mistura reacional (mL)}}{\text{Tempo (min)} \times \text{Vol do sobrenadante (mL)}}$$

2.3 Determinação do efeito da temperatura e pH nas atividades enzimáticas

O efeito da temperatura e do pH foi determinado conforme descrito no Capítulo III desta tese.

2.4 Ensaios de biopolimento

Para o biopolimento, foi utilizado um tecido de meia malha (jersey) de algodão (100%), alvejado industrialmente sem branqueador ótico, do fabricante KaTêxtil (Pomerode, SC), com gramatura de $171 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ (do tecido cru), densidade de $20\text{-}22 \text{ fios}\cdot\text{cm}^{-1}$ na fileira e $14\text{-}15 \text{ laçadas}\cdot\text{cm}^{-1}$ na coluna.

Os tecidos foram cortados em tamanhos 13x13 cm e costurados com fio de poliéster ao redor, para evitar que desfiassem durante as lavagens e no tratamento, evitando, assim, a perda de massa. Cada tratamento foi feito em triplicata.

Antes do biopolimento, os tecidos foram lavados em água corrente, para a remoção do carbonato e de sujidades (ceras e graxas) e enxaguados em água destilada, corrigindo-se o pH para neutralidade com solução de ácido acético. Os tecidos foram torcidos para escorrer a água e pendurados em grade, na estufa, a 100°C, por 1 hora, sendo levados, em seguida, para o dessacador contendo solução saturada de cloreto de cobre II (CuCl₂), para manter a umidade relativa do ar em 67% por 48 horas. A massa dos tecidos foi mensurada durante 48 horas (três vezes no período).

O tempo de tratamento para o biopolimento foi de 60 e 120 minutos, à temperatura de 50°C, com relação de banho de 1:20 (4 g de tecido em volume final de 80 mL), pH 5,0 (HAc/NaOH 0,1 mol.L⁻¹), utilizando máquina Washtester Kimak (40 rpm, agitação vertical).

Durante os ensaios, analisaram-se a proteína total em solução, antes e depois do tratamento e a quantidade de açúcares redutores formados. Os açúcares solúveis formados foram analisados reagindo-se alíquotas de 0,5 mL da solução com 0,5 mL de DNS à fervura e diluindo com 6,5 mL de água destilada. Os açúcares redutores nos tecidos foram analisados reagindo-se um pedaço do tecido de 100±1mg com 3,0 mL de DNS à fervura e, depois, diluindo com 8,0 mL de água destilada.

Os ensaios de resistência ao estouro das amostras tratadas e não tratadas foram realizados em uma máquina de ensaios *Mullen Tester*, modelo DL-500 EMIC, capacidade máxima de 5KN, segundo normas técnicas NBR 13384, 1995.

O grau de *pilling* (peloteamento), que considera a tendência do tecido de formar “bolinhas” superficiais, devido ao desfibrilamento, analisado para todas as amostras tratadas e não tratadas foi determinado em aparelho *Pilling Tester*, da Mathis, segundo normas técnica NBR 1076, 1978.

2.5 Ensaios de biopurga

Para a biopurga, utilizou-se tecido cru, 100% algodão, meia malha (jersey), com gramatura 171 g.m², densidade de 20-22 fios.cm⁻¹ na fileira e 14-15 laçadas.cm⁻¹ na coluna (Fabricante KaTêxtil, Pomerode, SC). As dimensões das amostras foram de 12x12 cm. Os tecidos foram costurados com fio de poliéster ao redor, para evitar que desfiassem durante as lavagens e o tratamento.

As análises de açúcares redutores e a determinação das atividades foram realizadas conforme descrito no item 2.2, tendo as leituras de absorbâncias sido feitas, no mínimo, em triplicata, em espectrofotômetro UV-Vis PC1601 (Shimadzu).

O preparo dos tecidos para biopurga iniciou-se com lavagem em água quente (90°-95°C), por 2 minutos, com três repetições, que tem o objetivo de remover impurezas solúveis, sendo colocados, depois, em água destilada, por 15 minutos. O próximo passo foi a secagem, a 80°C, por 120 minutos, condicionando-se em dessecador, por 3 horas, para a obtenção da massa constante. Após os tratamentos de biopurga, a ação das enzimas nos tecidos foi desativada, mergulhando-os em água quente (90°-95°C) e resfriando-os em água destilada (temperatura ambiente). A secagem e o condicionamento foram realizados da mesma maneira descrita para o biopolimento.

Os tecidos previamente preparados foram colocados, juntamente com a solução enzimática, em canecos de aço (capacidade 500 mL), em “washtester” Kimak (Brusque, SC), com agitação vertical de 40 rpm, por 60 minutos, a 50°C em pH 5,0 (HAc/NaOH, 100 mmol.L⁻¹), com relação de banho 1:20 (volume final 60 mL).

Produtos auxiliares foram utilizados para avaliar se adição deles tem efeito positivo no tratamento da biopurga. Produtos como ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), que complexa íons metálicos (íons cálcio, magnésio e ferro, entre outros) presentes no tecido cru que podem estar complexados com a pectina. Esses íons proporcionam uma estrutura mais rígida à pectina e sua

remoção ocasionaria maior mobilidade das cadeias pectínicas, facilitando o ataque de enzimas (Calafell *et al.*, 2005). O surfactante não-iônico Sandoclean PCJ líquido (Clariant S.A, lote CHAA091670 - composto sinérgico de alcoxilatos de álcool graxo) também foi utilizado porque auxilia na remoção dos produtos de hidrólise. Para simular uma purga industrial, porém, em menor temperatura, foram realizados tratamentos com NaOH 0,75% (m/v), EDTA 0,2 g.L⁻¹ e surfactante não-iônico 0,1% (m/v), a 50°C.

As quantificações dos açúcares redutores solúveis (ARs) deu-se com a retirada de 0,5 mL do banho, adicionado-se 0,5 mL de reagente DNS, colocando para reagir em água fervente, por 5 minutos e, posteriormente, adicionando-se 6,5 mL de água destilada, sendo, em seguida, feita a leitura de absorbância, a 540 nm. Já a perda da massa foi determinada pela diferença entre a massa antes e após o tratamento, conforme equação 03:

[Eq 03]

$$\text{Perda de massa} = (M1 - M2)/(M1) * 100$$

M1: Massa seca antes do tratamento; M2: Massa seca após o tratamento

Os tecidos foram tingidos com azul de metileno (C.I. Basic Blue 9), que indica a presença de grupos aniônicos, principalmente grupos carboxílicos provenientes da pectina que possam estar presentes. O tingimento foi realizado com amostras de 6x6 cm (aproximadamente 0,62 g), em pH 8,5 (tampão tris/HCl, 100 mmol.L⁻¹), numa relação de banho 1:40, utilizando-se 0,25% de corante azul de metileno sobre peso material. Após o tingimento, as amostras foram mergulhadas em água destilada, na temperatura ambiente e sem agitação mecânica, para a remoção de corante não fixado. Também foi realizado o esgotamento do banho, que foi obtido por meio da análise do banho após o tingimento pela leitura da absorbância do mesmo em espectrofotômetro UV-Vis em 664 nm. Para esse procedimento, realizou-se a mesma diluição para todas as amostras, até atingir os valores de absorbância menores que 1,5.

Os valores de reflexão espectral (K/S) do tingimento foram obtidos pelas leituras em espectrofotômetro de remissão Optronik, em 660 e 680 nm. Os valores de grau de branco (Graus Berger) dos tecidos também foram obtidos com espectrofotômetro de remissão Optronik, utilizando-se os iluminantes D65 (luz natural) e A (luz incandescente), com ângulo de abertura de 10°.

A análise de umectabilidade foi determinada por dois métodos, o teste de gota e o teste de tira, tendo o primeiro sido realizado conforme a norma NBR 13.000 (ABNT, 2003), que avalia o tempo necessário para que uma gota de água colocada sobre o tecido seja absorvida completamente pelo mesmo. A distância entre o tecido e a bureta foi de 5 cm. A umectabilidade foi expressa em uma escala de 0 a 10, obtida pela equação 04:

[Eq 04]

$$\text{Umectabilidade} = 10 \times (60 - t)/60$$

O t da equação 4 acima é o tempo (s) necessário para que a gota desapareça no tecido. O tempo de 60 segundos corresponde a nenhuma umectação, enquanto tempo de 1 segundo, ou menor, indica ótima umectação (Calafell *et al.*, 2005).

O segundo teste para umectabilidade foi avaliado pelo teste de tiras (*vertical wicking test*), pelo tempo que uma solução de corante direto (Solophenyl Azul BFF; CIBA Especialidades Químicas Ltda.) necessita para “subir”, por capilaridade, uma distância de 70 mm, numa amostra de tecido fixado perpendicularmente. A presença de corante é somente para melhor visualização da “subida/migração” da solução pela amostra. Uma tira de 3 cm do tecido foi costurada ao redor, para evitar que a tira enrolasse na forma de “charuto”, o que dificultaria a avaliação. O tempo máximo de avaliação foi de 300 segundos.

2.6 Ensaio para desbotamento de tecido tingido com índigo

No desbotamento (bioestonagem) foi utilizado tecido plano Denim tingido com índigo. Os tecidos foram cortados em tamanhos 5x5 cm e costurados com fio de poliéster ao redor, para evitar que desfiassem durante as lavagens e no tratamento, evitando, assim, a perda de peso. Cada tratamento foi feito em triplicata.

A remoção de sujidades e de carbonato de sódio foi feita por meio de lavagens e secagens no mesmo padrão estabelecido para o biopolimento. O tratamento de bioestonagem foi de 60 minutos, à temperatura de 50°C, com relação de banho 1:20 (volume final 80 mL) e pH 5,0 (HAc/NaOH 0,1 mol.L⁻¹), utilizando máquina Washtester Kimak (40 rpm agitação vertical). Os tratamentos foram realizados com e sem discos de metais (6 discos por caneco).

Os teores de proteína total, açúcares solúveis e açúcares dos tecidos foram calculados da mesma forma estabelecida no experimento do biopolimento. Os valores de K/S dos lados direito e avesso dos tecidos denim foram medidos em espectrofotômetro de remissão Optronik, a 600 nm.

3. Resultados e Discussões

3.1 Atividades enzimáticas

O extrato bruto do fungo selvagem *A. flavus* crescido em engaço de bananeira como fonte de carbono apresentou atividades significativas de pectinase e xilanase, 0,8 e 1,2 UI.mL⁻¹, respectivamente (Figura 3A). A atividade endoglicanase (CMCase) de *A. flavus* foi cinco vezes menor do que o preparado comercial Denimax (*T. reesei* – melhorado geneticamente), ou seja, 0,2 e 1,0 UI.mL⁻¹, respectivamente. No entanto, o extrato bruto de *A. flavus* apresentou o dobro de pectinase que o Denimax, 0,8 e 0,4 UI.mL⁻¹ (Figura 3A). A melhor temperatura para a atividade de pectinase de *A. flavus* ficou entre 60° e 70°C, enquanto a atividade CMCase apresentou melhor atividade a 50°C (Figura 3B). Como mostrado na figura 3C, a atividade pectinase do extrato

enzimático de *A. flavus* aumentou com a elevação do pH, apresentando maior atividade em pH neutro a alcalino, enquanto a atividade CMCCase apresentou a maior atividade em pH ácido, na faixa de pH 3,5 a 5,0.

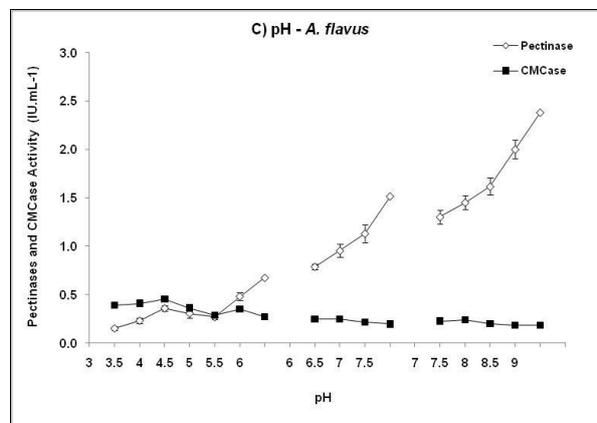
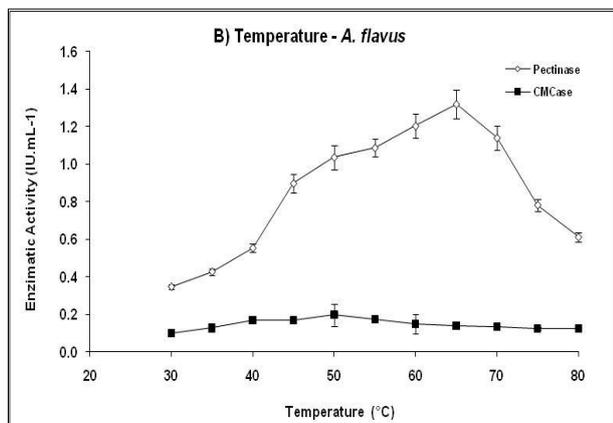
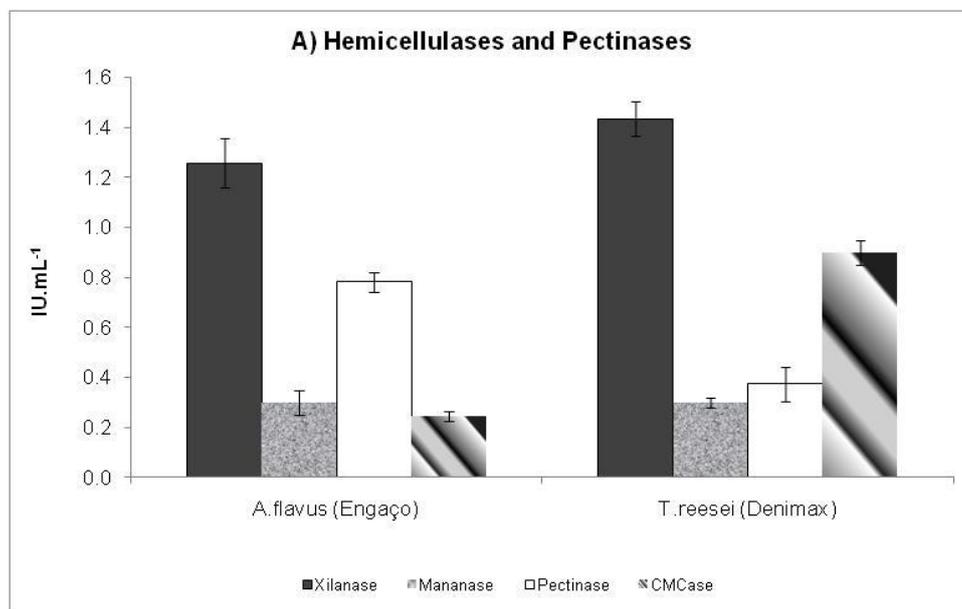


Figura 3. A) Atividades de hemicelulases (xilanase e mananase), pectinase e endoglicanase (CMCase) do extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira como fonte de carbono e Denimax (celulase comercial de *T. Reesei*); B) e C) melhores temperatura e pH para atividades de pectinase e endoglicanase do extrato bruto de *A. flavus*

3.2 Biopolimento

Nos tratamentos com menor quantidade de proteína ($3,25 \pm 0,85$ mg proteína/g tecido), grande quantidade de proteínas adsorve nos tecidos (75%-80%). A adsorção ocorre, principalmente,

nos primeiros 30 minutos. Nos ensaios com, aproximadamente, o dobro da quantidade de proteínas por g tecido ($6,18 \pm 0,25$ mg proteína/g tecido) menos que 20% da proteína adsorveu (Figura 4). Porém, o cálculo da quantidade de proteína absoluta adsorvida por g/tecido, nos dois casos testados ($(3,25 \text{ mg/g}; 75\% \rightarrow 2,43 \text{ mg/g})$; $(6,18 \text{ mg/g}; 15\% \rightarrow 0,927 \text{ mg/g})$, pode indicar uma saturação de proteínas aplicadas ou uma interação da proteína em solução que inibiu ou reduziu a adsorção, como pode ter influência de outros componentes do extrato bruto, como as substâncias coloridas que reduzem a adsorção.

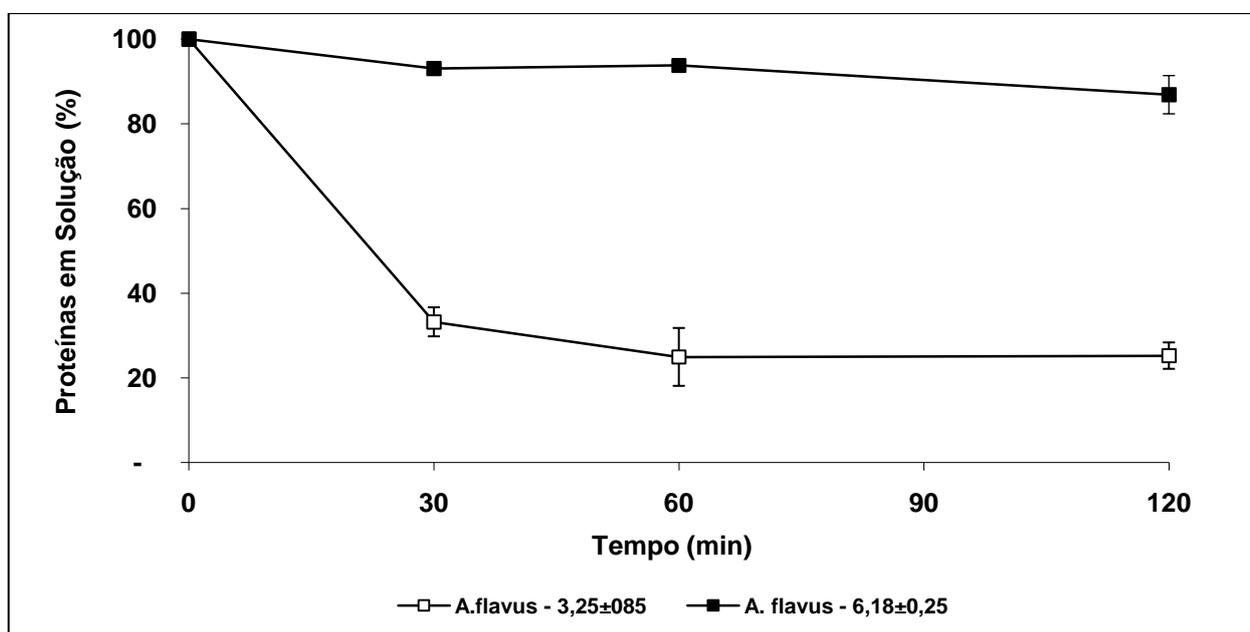


Figura 4. Proteínas em solução (%) de extrato bruto de *A. flavus* crescido em engaço de bananeira usado nos tratamentos de biopolimento a 50°C com agitação vertical (48 rpm). Os valores ao lado do nome dos fungos na legenda referem-se à quantidade de proteínas em mg.g tecido^{-1} .

A adsorção das proteínas dos extratos brutos dos fungos *A. flavus* e *P. echinulatum* foi comparada, o que pode ser observado na figura 5. O baixo percentual de adsorção enzimática em alta concentração proteica e alta adsorção com a baixa concentração de enzimas, em ambos os extratos brutos, pode ter ocorrido pela saturação do tecido, no caso da quantidade alta de enzima. Os teores de extrativos totais (resinas, óleos, graxas e ceras) do engaço de bananeira podem chegar a 47% (Soffner, 2001). Considerando a presença desses extrativos de engaço no tratamento, não é possível afirmar que as proteínas de *A. flavus* possuem, realmente, afinidade com o tecido ou se o

engajo interferiu positiva ou negativamente na adsorção das mesmas no tecido. Comparando-se os tratamentos com alta quantidade de proteína, houve pouca adsorção; quando comparados com quantidades menores, constata-se que houve muita adsorção.

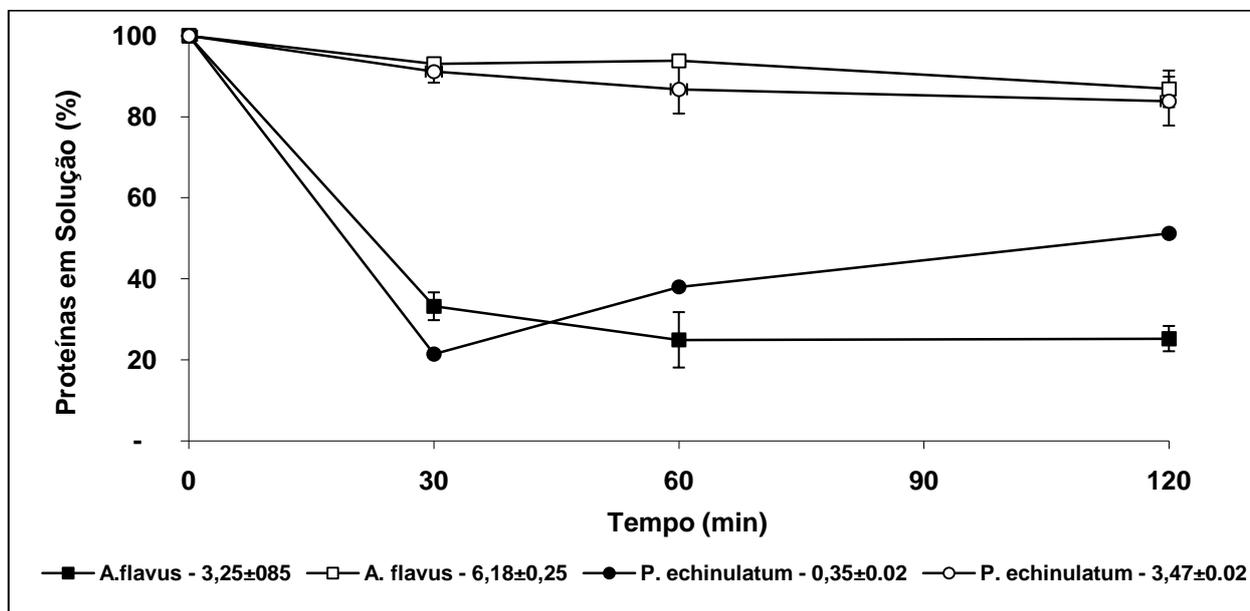


Figura 5. Proteínas em solução (%) de extrato bruto enzimático proveniente de *A. flavus*, comparadas com enzimas de *P. echinulatum* utilizadas nos tratamentos de biopolimento. T: 50°C; agitação vertical: 48 rpm. Os valores ao lado do nome dos fungos na legenda referem-se à quantidade de proteínas em mg.g tecido⁻¹.

A perda de massa nos tecidos (%) foi analisada pela quantidade da atividade de endoglicanase aplicada nos diferentes tratamentos (Figura 6A). Observa-se que o complexo de *P. echinulatum* apresentou maior perda de massa nos tratamentos realizados, independente do tempo de tratamento, mas, principalmente, dependente da quantidade de enzima aplicada. Denimax Acid L apresenta comportamento semelhante ao de *P. echinulatum*, apresentando maior perda de massa, porém, essa perda de massa ocorreu com menor atividade enzimática de endoglicanase. Desse modo, a perda de massa por quantidade de endoglicanase aplicada é maior para *P. echinulatum* e *Denimax L.* do que para *A. flavus*.

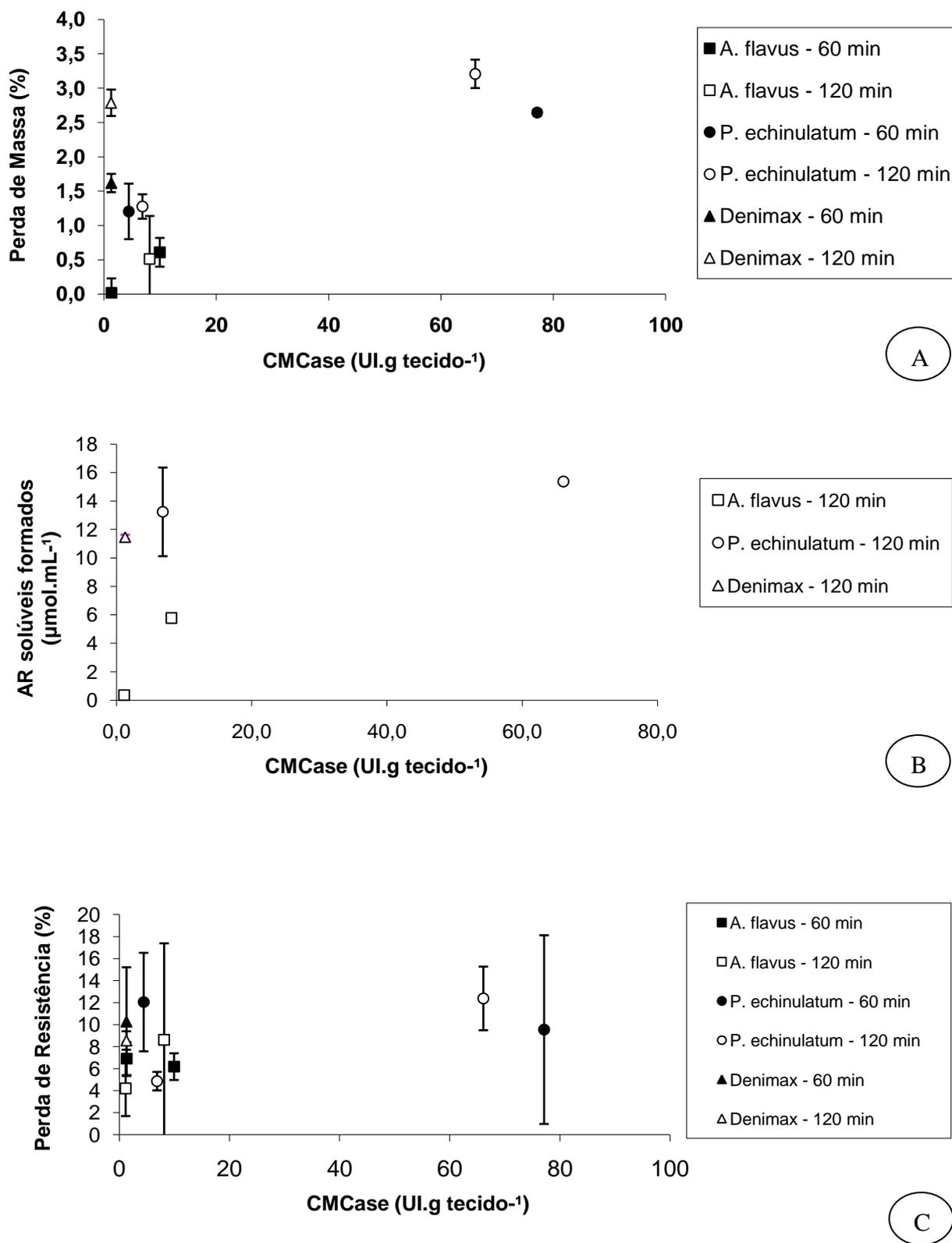


Figura 6. Perda de massa (A) por quantidade de CMCase-endoglicanase (UI.g tecido⁻¹); (B) quantidade de açúcares redutores solúveis (AR) e (C) perda de resistência (teste do estouro) nos tratamentos de biopolimento.

No caso de *A. flavus*, mesmo em quantidades maiores de endoglicanase, não foi observada perda de massa significativa, como nos tratamentos com os outros complexos enzimáticos. Em todos os tratamentos foram descontados os valores encontrados para o tratamento apenas com tampão. Mesmo quantidades maiores de endoglicanase aplicadas não resultaram em perda de massa significativa. Inclusive, para quantidades menores de enzimas, houve aumento da massa do tecido após o tratamento. Isso pode ser explicado pela adsorção de componentes coloridos do engaço de bananeira no tecido, que não foram removidos na lavagem posterior, contribuindo, assim, para o aumento da massa dos mesmos.

A mesma explicação poderia ser utilizada para os tratamentos com maiores quantidades da atividade de endoglicanase e também de proteínas de *A. flavus*, em que, mesmo com maior perda de massa, a adsorção e a permanência no tecido após lavagem de componentes do engaço de bananeira (que está em quantidades maiores nos tratamentos com maiores quantidades de proteínas) podem ter camuflado o resultado final. O efeito do machamento pelos extrativos de engaço de bananeira em tecidos tratados com extratos enzimáticos oriundos desse material é pouco conhecido. Desse modo, tem-se, como perspectiva, a continuidade dos estudos sobre este material, talvez como um corante natural em potencial. A quantidade dos componentes de engaço de bananeira presentes no tecido após o tratamento diminuiu a diferença entre a massa do tecido e a massa realmente removida pela ação das enzimas.

A mesma explicação pode ser dada para a baixa quantidade de açúcares redutores solúveis produzidos pelo extrato bruto enzimático de *A. flavus* (Figura 6B). A atividade endoglicanase deste extrato bruto é muito menor do que a das demais enzimas (Figura 4). A presença de componentes dos extrativos totais do engaço de bananeira no tecido poderia dificultar o contato enzima-fibra, o que resultaria em menos reação e menos produção de AR. Em relação à perda de resistência ao estouro (Figura 6C), o próprio tecido não tratado, ou seja, o tecido utilizado como padrão, apresentou uma variação considerável e todos os tecidos tratados apresentaram perda de resistência

na mesma faixa (3%-8%), e alguns tiveram desvios padrões elevados. Os resultados obtidos indicam que a ação das enzimas não produziu efeito significativo na perda de resistência do tecido, o que é desejável. Entretanto, a quantidade de proteínas-enzimas aplicada provavelmente não foi suficiente para provocar um efeito mais significativo na perda de massa e de resistência dos tecidos.

A quantidade de grupos redutores formados ($\mu\text{mol.g tecido}^{-1}$) no tecido tratado é apresentada na figura 7, tendo sido descontada a quantidade de AR no tecido não tratado. Observa-se que praticamente não há diferença entre os tratamentos com os diferentes complexos enzimáticos, nas diferentes condições (quantidade de proteína; tempo de tratamento). Apesar de o extrato bruto de *A. flavus* ter apresentado baixa perda de massa e pouca quantidade de açúcares redutores solúveis, os valores de AR no tecido situaram-se entre os maiores dos diferentes tratamentos, para o que pode haver duas explicações: 1) as enzimas formaram muitos finais redutores nos tecidos (açúcares redutores insolúveis) sem provocar perda de massa e quantidade de açúcares redutores solúveis. A atividade responsável por este comportamento teria que ser, principalmente, de exoglicanase (EG), pois atividade desse grupo de enzimas resultaria em açúcares redutores solúveis. Curiosamente, as rupturas provocadas pelas EGs não resultaram, junto com a agitação mecânica do tratamento, em desprendimento de fibrilas (perda de massa) e 2) a quantidade de grupos redutores encontrados no tecido pode ser também devido a compostos redutores do engaço de bananeira presente no extrato de *A. flavus*, que apresentou teores de ARs significativos (dados apresentados no capítulo III sobre *A. flavus*). Tal efeito pode ser observado na relação perda de massa/grupos redutores formados pela quantidade de endoglicanase e/ou proteínas aplicada, que não reflete em resultados significativos para *A. flavus*, como observado para os outros complexos enzimáticos.

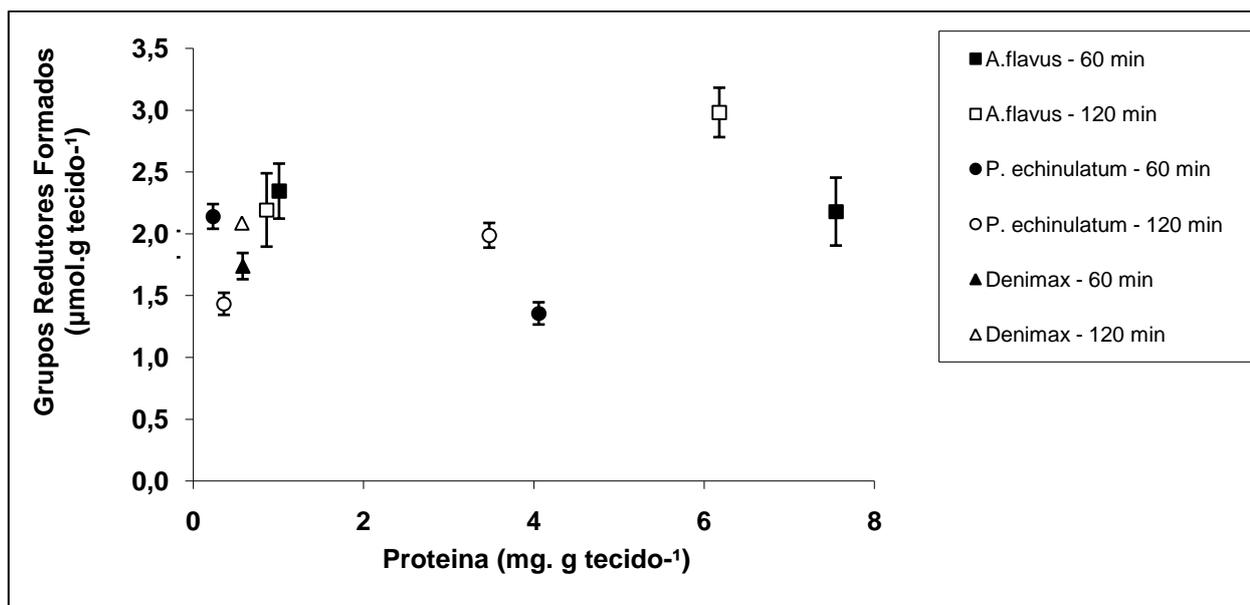


Figura 7. Grupos redutores formados no tecido ($\mu\text{mol.g tecido}^{-1}$), por quantidade de proteína ($\text{mg proteína.g tecido}^{-1}$), para os diferentes tempos.

Na avaliação de formação de *pilling*, são atribuídas notas em uma escala de 1 (muito *pilling*) a 5 (pouco-nenhum *pilling*), conforme Norma *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Os tecidos não tratados, tecido alvejado industrialmente e tecidos tratados com tampão obtiveram nota 1 (muito *pilling*). Os tratamentos com *P. echinulatum* e Denimax Acid L apresentaram resultados mais significativos para nota de *pilling* (Figura 8). A explicação para isso é que, embora a quantidade de enzima seja baixa, a atividade aplicada (atividade baseada em CMC_{case}) foi bastante alta, correspondendo a 4 UI e 81 UI.g tecido⁻¹, para *P. echinulatum* (19 UI.mg proteína⁻¹) e aproximadamente 200 UI.g tecido, para Denimax Acid L (327 UI.mg proteína⁻¹). Para o tratamento com *A. flavus*, praticamente não houve melhora na nota de *pilling*. Os fatores que podem ter afetado o resultado foram a) a presença dos extrativos totais do engaço de bananeira, que pode inibir a adsorção e a ação das enzimas, pois o mesmo adsorve sobre o tecido e pode ter impedido o contato efetivo enzima-fibra e b) apesar de alta quantidade de proteína aplicada, a atividade CMC_{case} foi baixa (1 a 10 UI.g tecido⁻¹), o que aparentemente não foi suficiente para proporcionar uma remoção

significativa da quantidade de fibrilas superficiais (e perda de massa) e, conseqüentemente, uma melhora na nota de *pilling*.

Rau *et al.* (2008) traçaram uma equação linear entre a perda de massa e o grau de *pilling* de tecidos tratados com extratos brutos de *P. echinulatum* e *Acrophialophora nainina*, observando que quanto maior for a perda de massa no biopolimento melhor será a nota de *pilling* atribuída ao tecido tratado. Os mesmos autores mencionaram que quanto maior for o grau de pureza das celulases, melhor será a nota do *pilling*, ou seja, um tecido sem muitas microfibrilas.

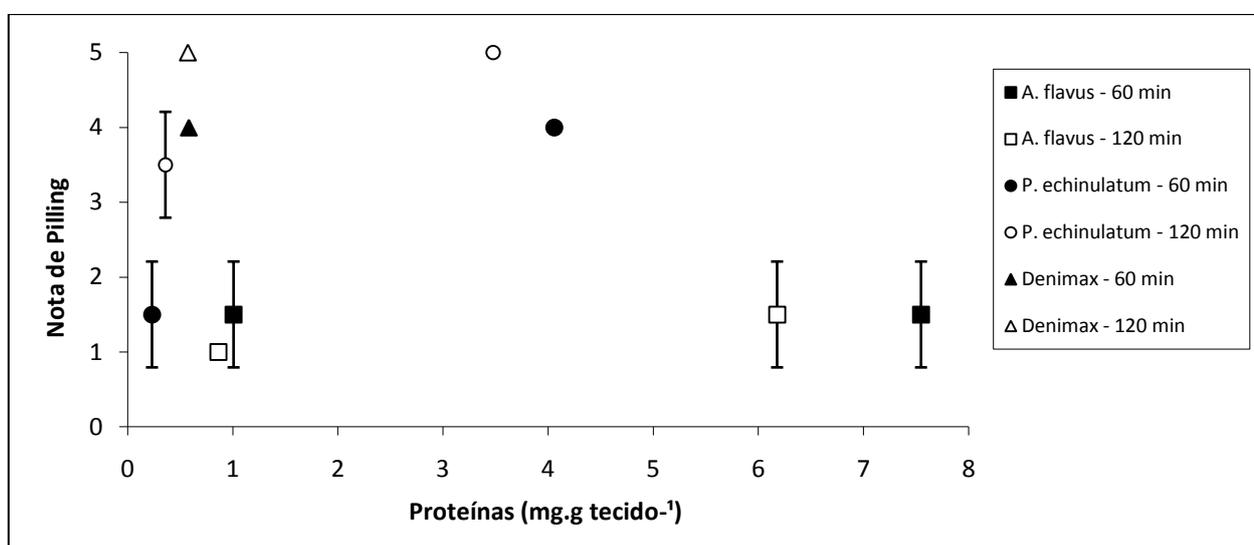


Figura 8. Nota de *pilling* dos tecidos tratados no biopolimento.

O biopolimento de tecidos de algodão com celulases reduz os problemas relacionados com substâncias presentes nas fibras de algodão que não absorvem corantes na etapa de tingimento (Diller *et al.*, 1999; Klahorst *et al.*, 1994), desagregando as moléculas que estão agregadas na estrutura de celulose e, conseqüentemente, desenvolvendo regiões mais “limpas” de celulose e melhorando a afinidade com os corantes, embora, em alguns casos, diminua a afinidade para os corantes com a hidrólise, inicialmente, devido à diminuição de regiões acessíveis às endoglicanases. A afinidade dos corantes aumenta e, depois, diminui nos tecidos que sofreram biopolimento durante hidrólise prolongada, indicando, além da redução, o desenvolvimento de

regiões mais acessíveis (Mori *et al.*, 1997; Kanchagar, 2003). Os valores de K/S de tecidos tingidos após bio-tratamento com celulases apresentaram melhor afinidade, de 16%-19%, no caso dos corantes reativos, talvez devido à remoção de fibras salientes que, de outra forma, reduziriam o coeficiente de dispersão da luz que depende do grau de polimerização, da taxa de inchamento (*swallow*) das regiões amorfas para regiões cristalinas, da acessibilidade, da reatividade química, da morfologia da superfície e da afinidade para corantes (Saravanan *et al.*, 2009).

3.3 Biopurga

O esgotamento do banho (%) de tingimento com azul de metileno (*Basic Blue 9*) dos tecidos de algodão cru (tecido de malha), após os diferentes tratamentos de biopurga, está demonstrado na figura 9. Esse esgotamento indica que o corante presente no banho adsorveu no tecido devido à afinidade (substantividade; diferenças de potencial química do corante em solução e na fibra) do corante pela fibra, principalmente por causa de interações eletrostáticas entre o corante e a fibra. O esgotamento não necessariamente significa que o corante se fixou no tecido realmente de forma permanente, podendo ser removido por lavagens posteriores. O azul de metileno é um corante básico (C.I. Basic Blue 9) que interage com grupos carboxílicos. Quanto maior o esgotamento, maior a interação corante-fibra e, conseqüentemente, mais grupos carboxílicos ou grupos que possuem cargas negativas estão presentes no tecido.

Em relação aos tratamentos (Figura 9), observou-se similaridade no esgotamento do banho para os diferentes tecidos tratados. Os maiores percentuais de esgotamento foram observados nos tratamentos com *P. echinulatum* e no tecido cru, indicando que estes possuem mais grupos com carga negativa presentes. Já o tratamento com *A. flavus* apresentou, ao longo de duas lavagens para verificar se ocorreu a fixação permanente, como os demais tratamentos, valores de esgotamento menores e praticamente constantes, mesmo com a adição de surfactantes. Isso, provavelmente, ocorreu em função de uma maior remoção total da pectina da estrutura do tecido cru.

O tratamento com pectinases resulta na remoção da pectina e remoção dos grupos aniônicos, ou seja, quanto menor o esgotamento, melhor seria o resultado. A remoção de pectina da parede celular do algodão objetiva o aumento da hidrofiliabilidade das fibras, facilitando a penetração de água, corantes e produtos auxiliares, contribuindo para a diminuição do consumo de água, em relação a processos alcalinos de purga convencionais (Cavaco Paulo & Gübitz, 2003).

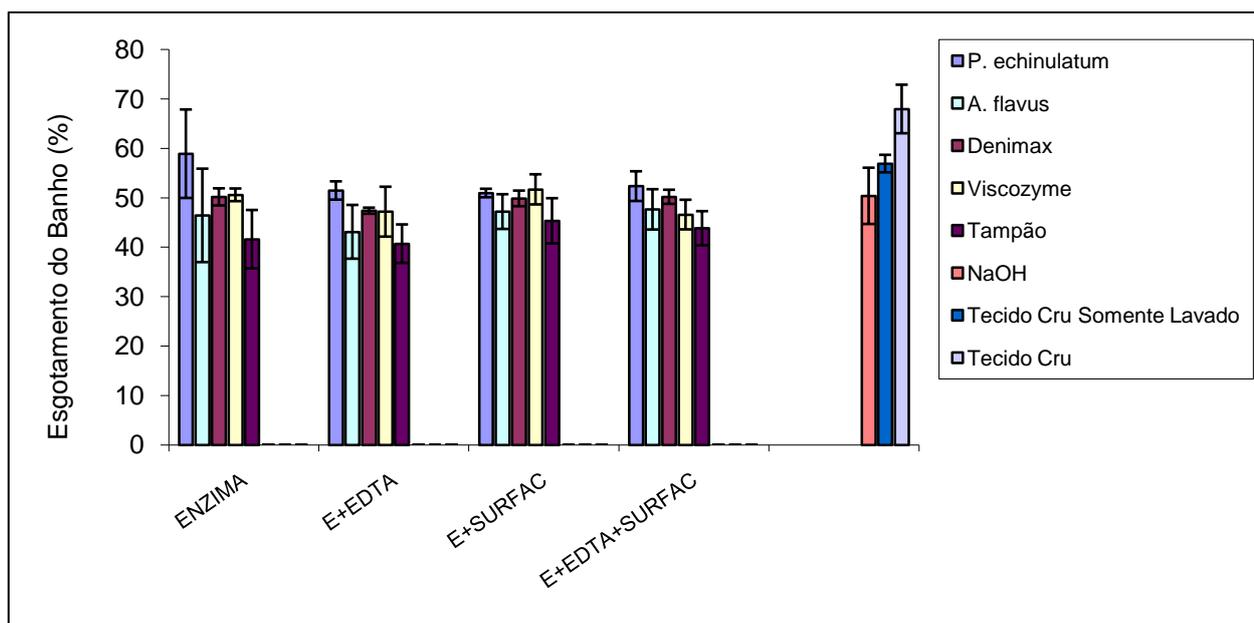


Figura 9. Esgotamento do banho de azul de metileno para os diferentes tratamentos com os diferentes complexos enzimáticos.

O valor de K/S está relacionado com a reflexão espectral do corante presente no tecido. Quanto maior a quantidade de corante, mais intensa a cor, menor a reflexão ou remissão e maior o valor do K/S. Os menores valores de K/S após tingimento com azul de metileno foram observados para os tratamentos somente com enzimas e foram menores para *P. echinulatum* e Viscozyme. Isso indica menor quantidade de corante presente no tecido e, conseqüentemente, menor quantidade de grupos com carga negativa presentes, o que significa menor quantidade de pectina presente (Figura 10).

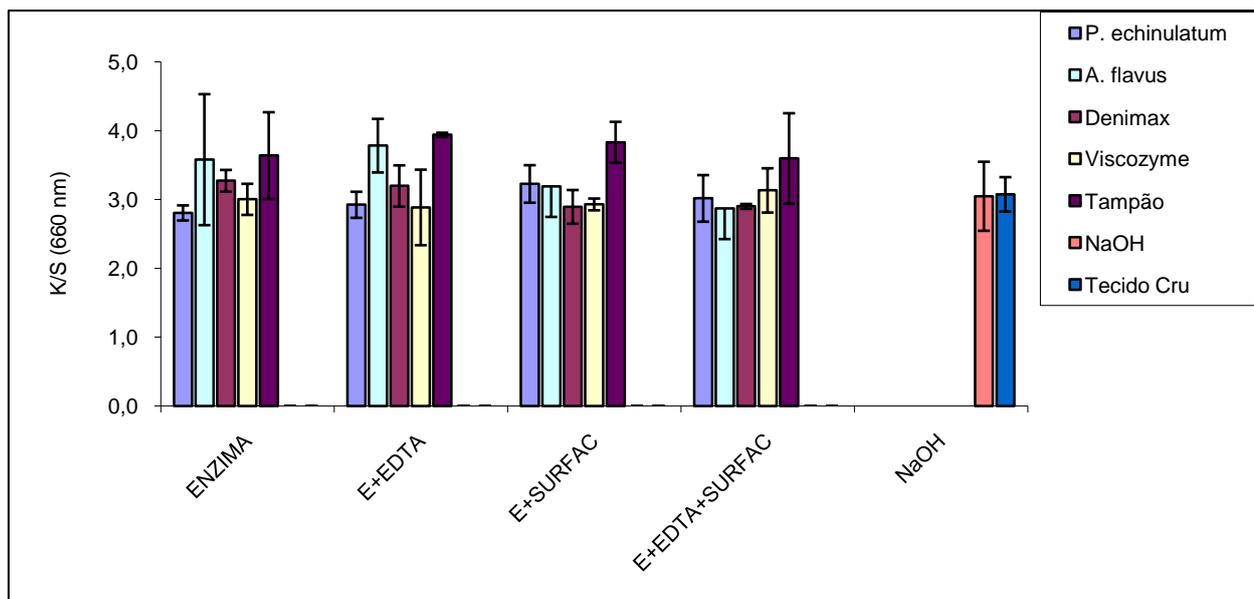


Figura 10. Valores de reflexão espectral dos tecidos tingidos com azul de metileno. Tempo: 60 minutos, temperatura 50°C.

O complexo de *P. echinulatum* tem alta atividade de pectinase (Rau, 2008), o que explica o resultado com menor reflexão espectral (Figura 10). A presença de auxiliares parece não influenciar a remoção de pectina para os tratamentos com *P. echinulatum*.

Viscozyme é uma preparação comercial (Novozymes) com alta atividade de pectinase. Geralmente, uma lavagem final com detergente ou dispersante para a remoção dos fragmentos (após hidrólise) da pectina e dos triglicerídeos ajuda a melhorar os resultados e, talvez, proporcionasse mais diferença entre os diferentes tratamentos.

Os maiores valores K/S foram observados para *A. flavus* e tecido tratado somente com tampão, indicando maior quantidade de grupos aniônicos que interagem com o corante (Figura 10). Entretanto, para *A. flavus*, constatou-se que o desvio padrão é alto, como também para outros tratamentos, o que pode ter duas razões: ou este complexo enzimático não removeu com eficiência, como nos demais tratamentos, a pectina presente no tecido ou, o que é mais provável, pela atividade de pectinase da *A. flavus*, que os componentes do engaço de bananeira presentes no extrato enzimático interferiram nos resultados, assim como observado nos tratamentos de biopolimento.

Não há diferença significativa entre os diferentes tratamentos com as enzimas, mesmo entre *A. flavus* e *P. echinulatum*, em função dos altos valores de desvio padrão (Figura 10). Os melhores resultados no teste de K/S para *A. flavus* são observados na presença de surfactante. O surfactante pode ter promovido a “solubilização” dos componentes do engajo (mantendo-as em solução), tornando possível a interação enzima-tecido. A presença de EDTA (complexante de metais alcalinos e de transição) não apresentou efeito auxiliar (adicional) na remoção de pectina nas condições estudadas.

A quantidade de açúcares redutores solúveis produzidos nos diferentes tratamentos da biopurga em diferentes tempos é apresentada na figura 11. Observa-se pouca formação de açúcares para o extrato bruto de *A. flavus*, o que indica pouca ação das enzimas nos tecidos, devido, possivelmente, à adsorção do engajo (extrativos totais) no tecido ou à mais baixa atividade do extrato do que nas outras enzimas. Quantidades maiores de açúcares redutores solúveis são observadas na presença de surfactante e de EDTA. O EDTA complexa o Ca^{2+} e ajuda na solubilização da pectina (Csiszar *et al.*, 2001; Losonczi *et al.*, 2005). O efeito sinérgico (ou cooperativo) entre surfactante e EDTA não é muito grande; basta um dos dois auxiliares para aumentar a solubilidade da pectina hidrolisada. O maior efeito foi do surfactante, especialmente após apenas 30 minutos de tratamento com o extrato bruto de *A. flavus*. Maior liberação de açúcares redutores solúveis é observada para as demais enzimas, o que pode ser explicado pela maior remoção de pectina (devido à ação das pectinases) e, conseqüentemente, a ação das celulases, que conseguem atacar somente depois que a camada hidrofóbica externa for removida, pois a celulose está presente em maior quantidade na parede celular secundária. As maiores quantidades de açúcares redutores solúveis foram observadas nos tratamentos com *P. echinulatum* e Denimax Acid L (Figura 11). Para Viscozyme, praticamente não houve variação na quantidade de açúcares liberados nos diferentes tempos de tratamentos. O aumento da quantidade de AR com o tempo pode ser devido à ação de celulases e a Viscozyme não tem celulase ou tem em pouca quantidade, o que

poderia explicar que ela não atacaria a celulose da parede secundária e, conseqüentemente, produz menos AR solúveis que os outros extratos com atividade celulásica.

A umectabilidade pelo teste da gota foi avaliada em uma escala de 0 a 10 (Figura 12). Quanto menor o tempo de umectação, maior a nota (Norma NBR 13.000, ABNT, 2003). O tempo de 60 segundos corresponde a nenhuma umectação, enquanto o tempo de 1 segundo, ou menor, indica ótima umectação (Calafell *et al.*, 2005). Observou-se que os melhores resultados foram obtidos com *P. echinulatum*, nos diversos tipos de tratamentos. A presença de auxiliares não teve influência significativa nos resultados. Para Denimax Acid L e *A. flavus*, a presença de auxiliares proporcionou um aumento significativo da umectação. Para *A. flavus*, deve-se mencionar que a presença de compostos coloridos (extrativos totais), originados do engaço de bananeira utilizado no cultivo do fungo, poderia “camuflar” ou influenciar o resultado. Outros ensaios serão necessários para avaliar a influência desses componentes do engaço de bananeira.

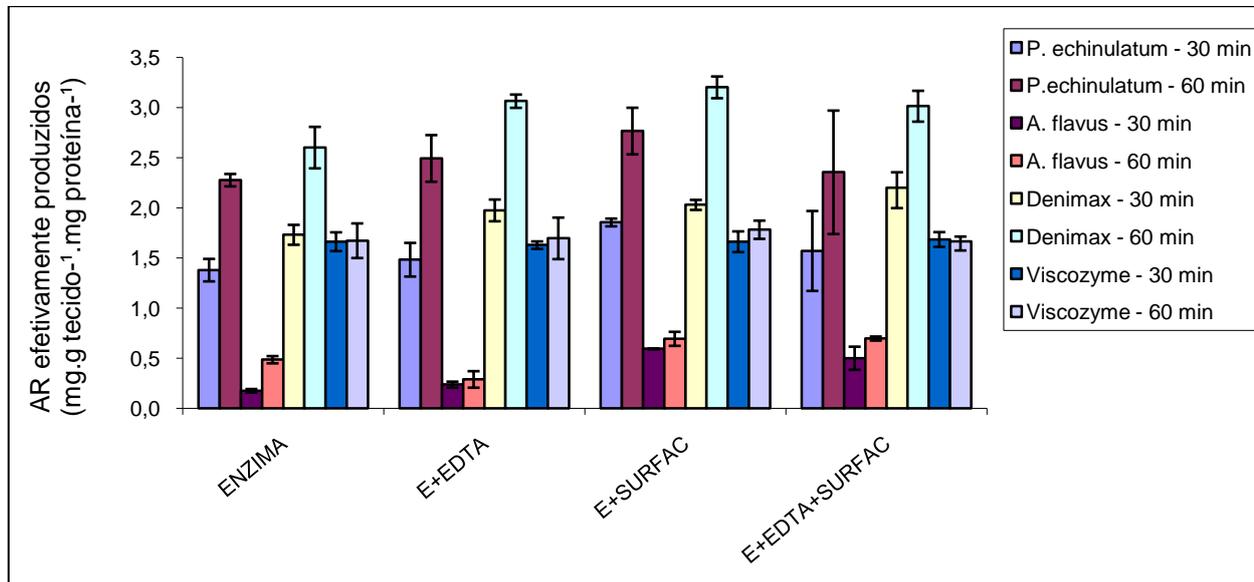


Figura 11. Açúcares redutores solúveis produzidos (mg de açúcares redutores por grama tecido por mg de proteína) nos diferentes tratamentos com diferentes complexos enzimáticos descontando o tampão.

O tecido tratado com NaOH apresentou resultado semelhante ao das enzimas, enquanto o tecido purgado industrialmente revelou pouca umectabilidade. O tecido purgado industrialmente pode ter sofrido alguma alteração na secagem, pois grupos hidrofóbicos poderiam, eventualmente, ter se acumulado na superfície, por meio de difusão.

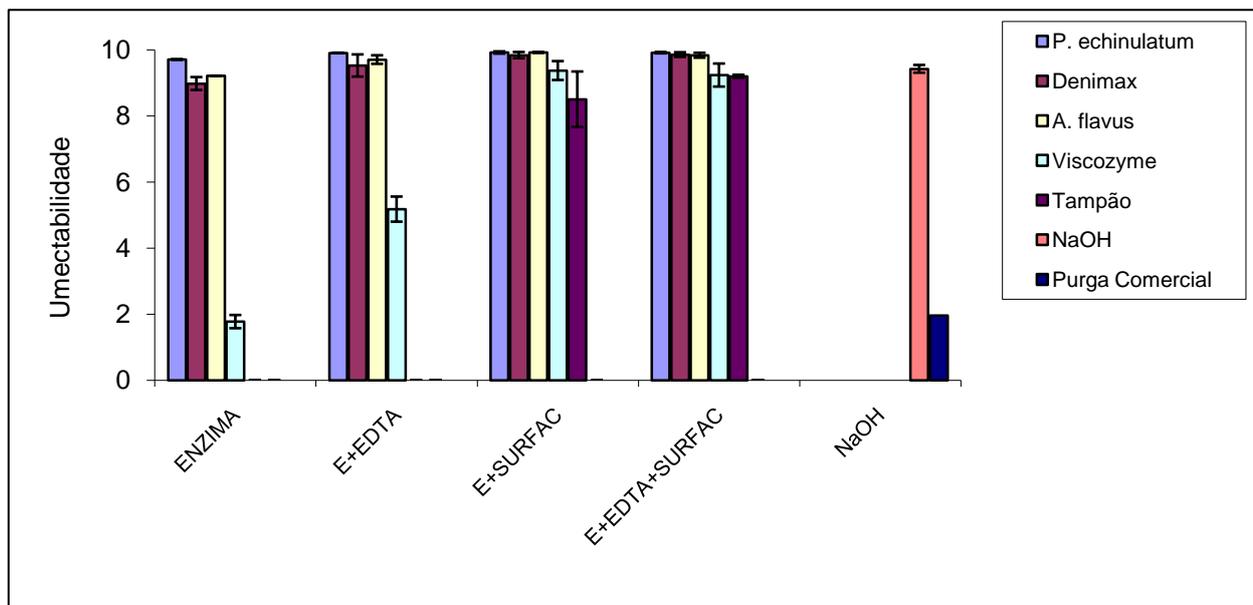


Figura 12. Umectabilidade dos tecidos tratados, avaliada no teste da gota.

Com Viscozyme, observou-se melhora significativa na aplicação com EDTA ou surfactante. A aplicação dos dois auxiliares em conjunto não melhorou mais a nota do que com apenas um surfactante. Para Viscozyme e tampão, os tratamentos com surfactante permitiram obter as melhores notas, o que indica que a presença de surfactante é essencial nos tratamentos para se obter melhora na umectabilidade pelo teste da gota. Entretanto, o surfactante pode estar presente no tecido, mesmo após a lavagem e, assim, influenciar o resultado final, visto que não foram realizados testes para identificar a presença do mesmo no tecido. O surfactante, neste caso, poderia atuar como um umectante, facilitando a re-umectação, ou seja, o contato entre água e tecido.

No teste de absorção por capilaridade (Figura 13), observou-se que os melhores resultados foram obtidos com *P. echinulatum*, havendo pouca diferença entre os tratamentos sem e com

auxiliares (surfactante, EDTA). Esse desempenho pode ser atribuído à presença de pectinases e celulases no complexo enzimático, favorecendo o melhor desempenho. Para *A. flavus*, Denimax Acid L e Viscozyme, os resultados melhoraram na presença de surfactante, mas o mesmo comportamento foi observado para os tecidos tratados com tampão e surfactante. No caso da Viscozyme e tampão, nos tratamentos somente com enzima, tampão e na presença de EDTA, as distâncias percorridas foram, respectivamente, somente de 52, 54, 47 e 47,5 mm, para um intervalo de 300 segundos. Isso sugere que o principal responsável pelo efeito obtido seja o surfactante. No tratamento com NaOH (com a presença de surfactante), o resultado foi semelhante, reforçando a ideia de que o surfactante, nestes casos, é o principal responsável pelos resultados obtidos. O surfactante auxiliaria na solubilização dos produtos de degradação, mantendo-os em solução, facilitando, assim, o ataque das enzimas ao tecido (Lenting *et al.*, 2002).

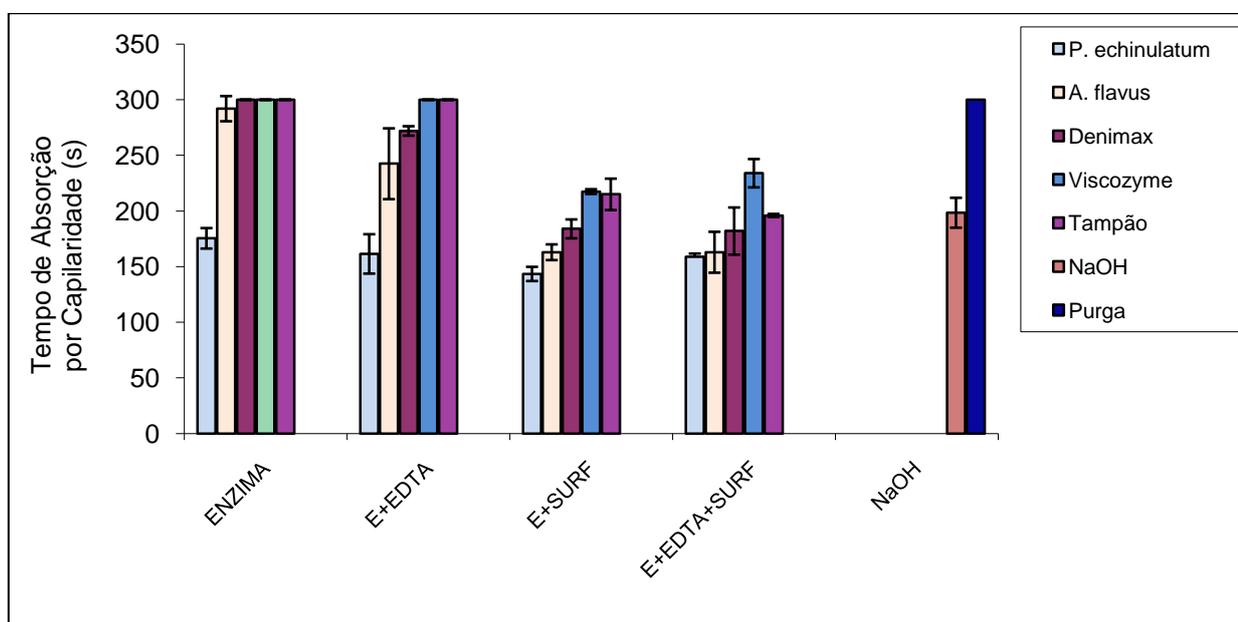


Figura 13. Tempo de umectação (s) determinado por capilaridade para os diferentes tratamentos.

O gráfico da figura 14 demonstra os resultados do grau de branco dos tecidos tratados, utilizando o iluminante D65 (luz natural), enquanto na figura 15 são mostrados os resultados do

grau de branco dos tecidos tratados, utilizando o iluminante A (luz Philips - fluorescente). Na avaliação dessas escalas (Figuras 14-15), quanto maior o valor, maior o “grau de branco” (mais branco é o material). Os maiores valores foram observados para os tecidos tratados com *P. echinulatum*, mesmo na ausência de auxiliares, seguidos por Denimax Acid L. Para *A. flavus*, os melhores resultados foram obtidos na presença de auxiliares, com um ligeiro aumento na presença de surfactante. Entretanto, deve-se destacar que a presença de componentes do engaço de bananeira presentes no extrato enzimático e adsorvidos no tecido pode ter prejudicado a avaliação deste resultado e o real potencial desse complexo enzimático, visto que o tratamento com tampão mostrou resultados semelhantes ao de *A. flavus*.

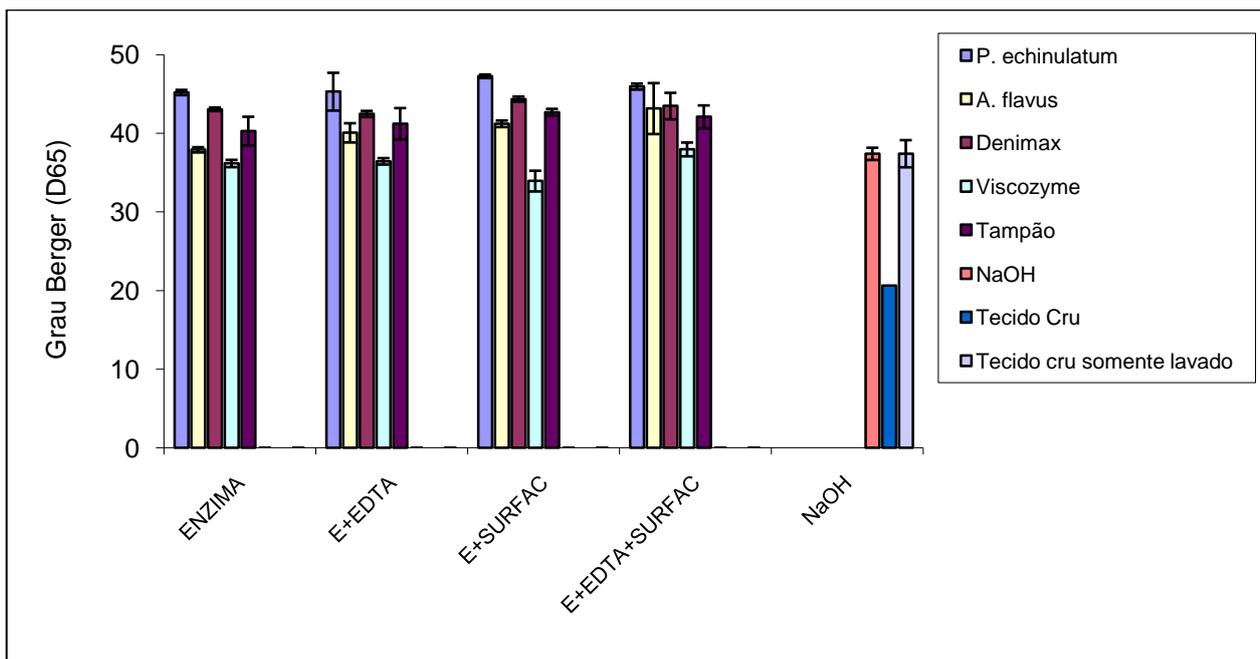


Figura 14. Avaliação do grau de branco pela escala de Berger com iluminante D65 (luz natural).

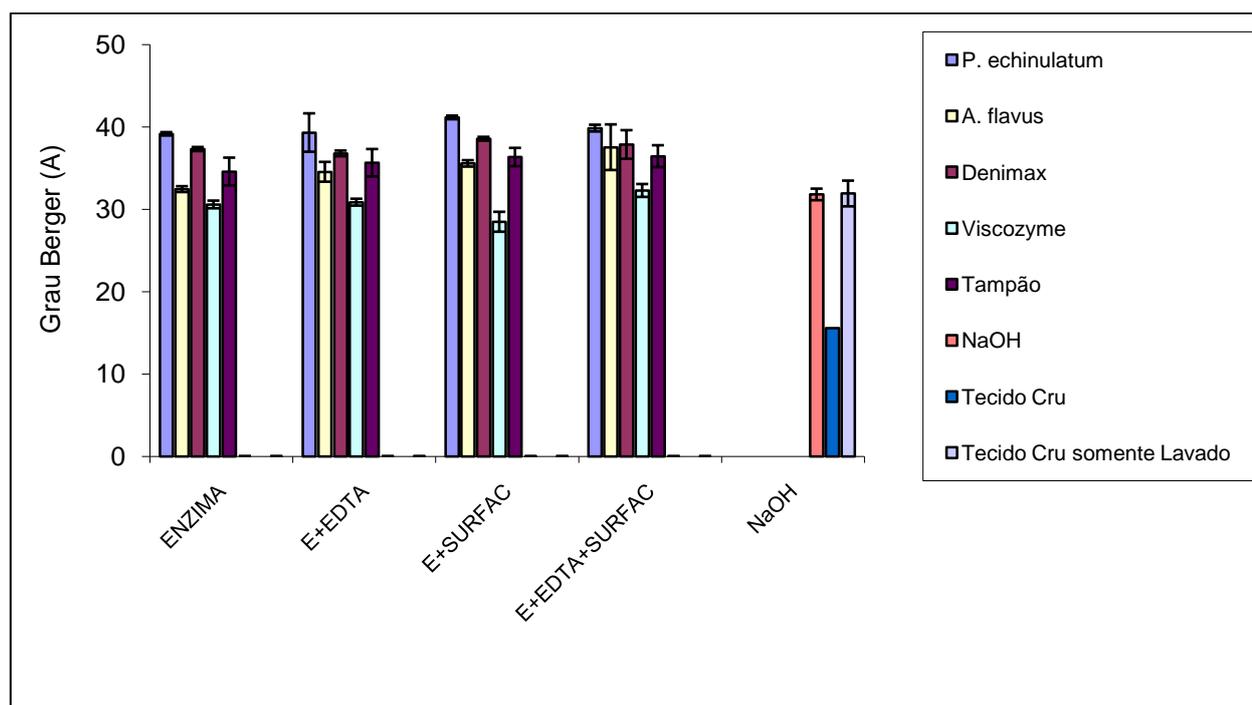


Figura 15. Avaliação do grau de branco pela escala de Berger com iluminante D65 (luz Philips - fluorescente).

Destaca-se também o tecido cru somente lavado com água quente, já que apresenta elevado grau de brancura, indicando que os principais produtos que conferem cor ao tecido são solúveis em água e facilmente removíveis. O tratamento com tampão (pH 5) proporcionou resultados superiores aos de purga com NaOH e ao de tecido cru apenas lavado. Aliás, o tecido cru lavado e o tecido tratado com NaOH proporcionaram resultados praticamente iguais. Isso, talvez, possa ser explicado pela baixa temperatura que foi utilizada na purga com NaOH (50°C).

3.4 Desbotamento de tecido tingido com índigo

O desbotamento de artigos tingidos se restringe a artigos têxteis tingidos superficialmente. A ação conjunta das celulases e da agitação mecânica provoca a desfibrilação ou a abrasão das fibras superficiais, a remoção de camadas tingidas e a liberação de corante, o que leva à revelação de partes brancas dos fios e ao aspecto desbotado do material (Andreas, 2001; Bajaj & Agarwal, 1999).

A perda de massa dos tecidos tratados com diferentes complexos enzimáticos sem e com a presença adicional de discos para aumentar fricção/agitação mecânica está representada no gráfico da figura 16. Considerando que a quantidade de proteínas utilizadas era semelhante para todos os tratamentos, observou-se que as maiores perdas de massa foram obtidas pelo tratamento com Denimax Acid L, tanto na ausência como na presença de discos de aço. Os discos de aço proporcionam ação mecânica/fricção adicional ao material, facilitando a remoção de fibrilas “mais fragilizadas” pelo ataque das enzimas, o que resultou em (significativa) maior perda de massa para todas as enzimas utilizadas. A menor perda de massa com as enzimas de *P. echinulatum* e de *A. flavus*, embora a quantidade de proteínas tenha sido a mesma, poderia ser explicada pelo fato de que a quantidade de enzimas ativas, principalmente celulasas (CMCase) presentes em Denimax Acid L foi maior que no extrato de *P. echinulatum* e de *A. flavus*. Segundo Belghith *et al.* (2001), celulasas de *Penicillium occitanis* (Pol6) oferecem excelente alternativa às celulasas comerciais (especialmente da *T. reesei*) para *stonewashing* (pedra-pomes) de roupas de denim azul.

Nos tratamentos com *P. echinulatum* e Denimax Acid L, a quantidade de açúcares redutores solúveis formados aumentou com o tempo e foi maior na presença de discos, ou seja, o aumento da agitação mecânica aumentou a ação enzimática (Figura 17). Para *A. flavus*, a quantidade de açúcares liberados foi baixa, indicando que a presença de componentes do engaçó possivelmente dificultou a ação das celulasas no tecido, resultando na menor quantidade de açúcares liberados.

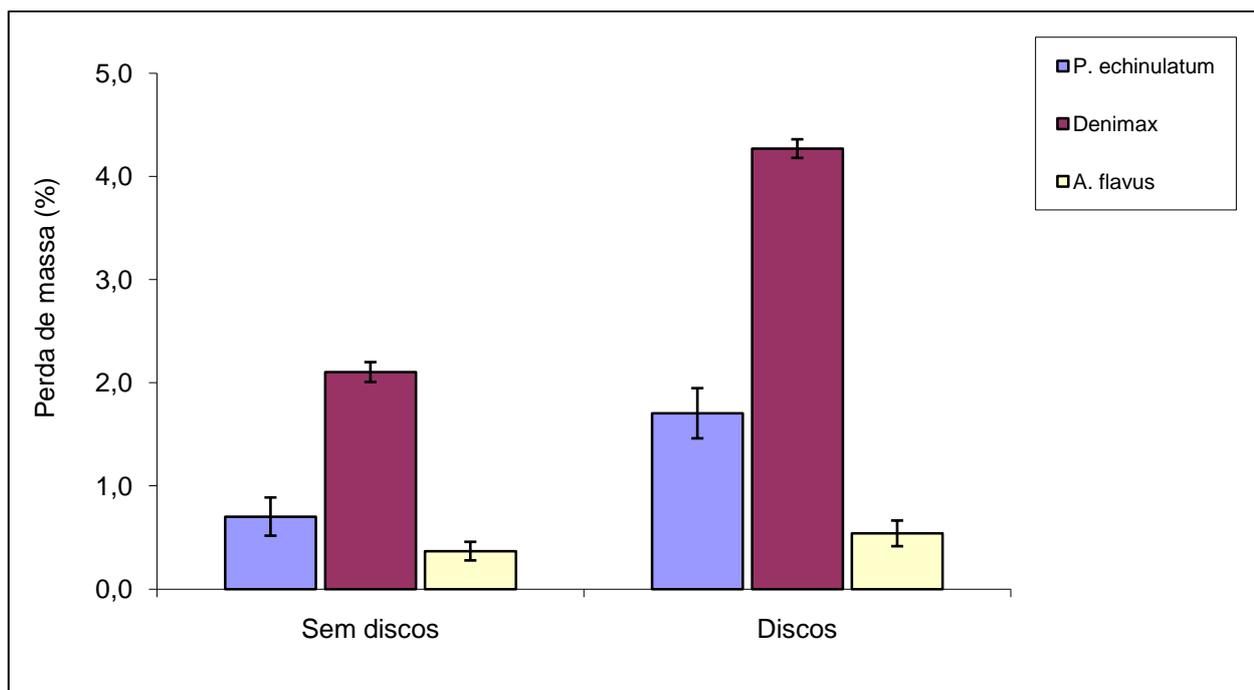


Figura 16. Perda de massa (%) nos tratamentos de tecidos tintos com índigo.

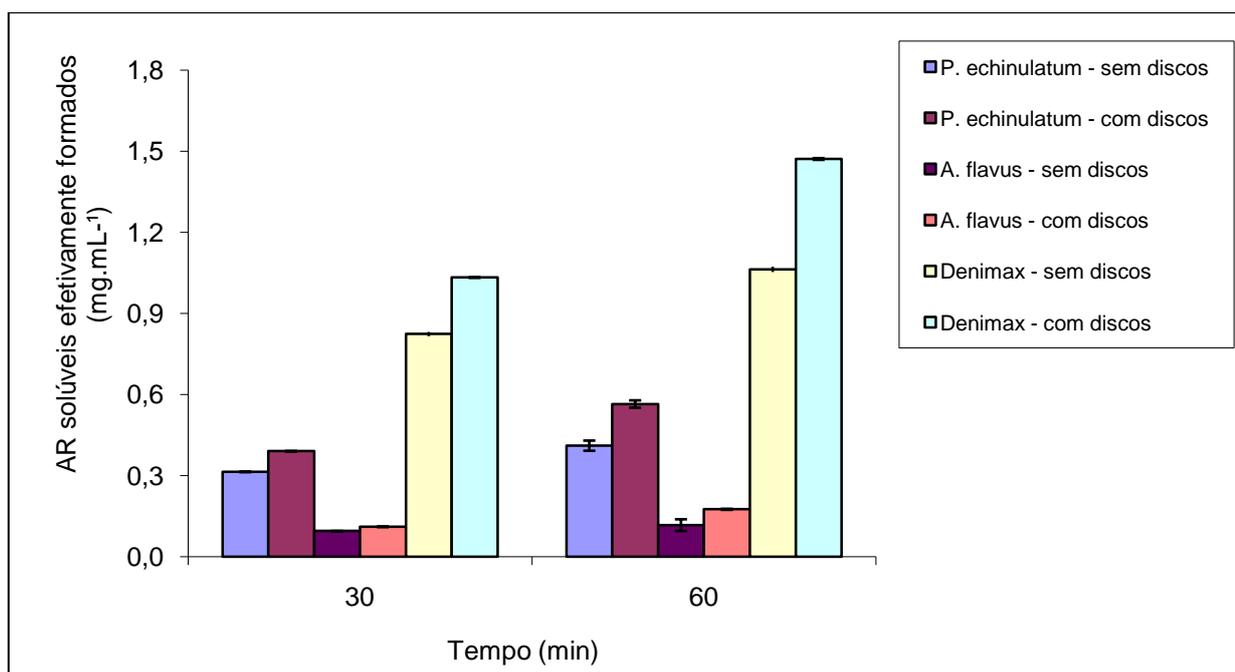


Figura 17. Açúcares redutores solúveis formados nos tratamentos de desbotamento.

Observa-se, de modo geral, que K/S (lado direito) (Figura 18), em todos os tratamentos, exceto com Denimax Acid L na presença de discos, não houve alteração da cor do lado direito do tecido referente ao tecido padrão. Como os valores de K/S do padrão estão na mesma faixa dos

tratamentos enzimáticos, com exceção dos com Denimax Acid L, pode-se considerar que o efeito de desbotamento das enzimas nas condições de tratamento não foi significativo. Alguns dos tratamentos apresentaram valor de K/S até levemente superior ao do tecido não tratado, o que pode ser, eventualmente, atribuído ao efeito de *backstaining*, redeposição do corante índigo no fio de trama branco. A medição nos dois comprimentos de onda (refletância máxima) revelou os mesmos resultados.

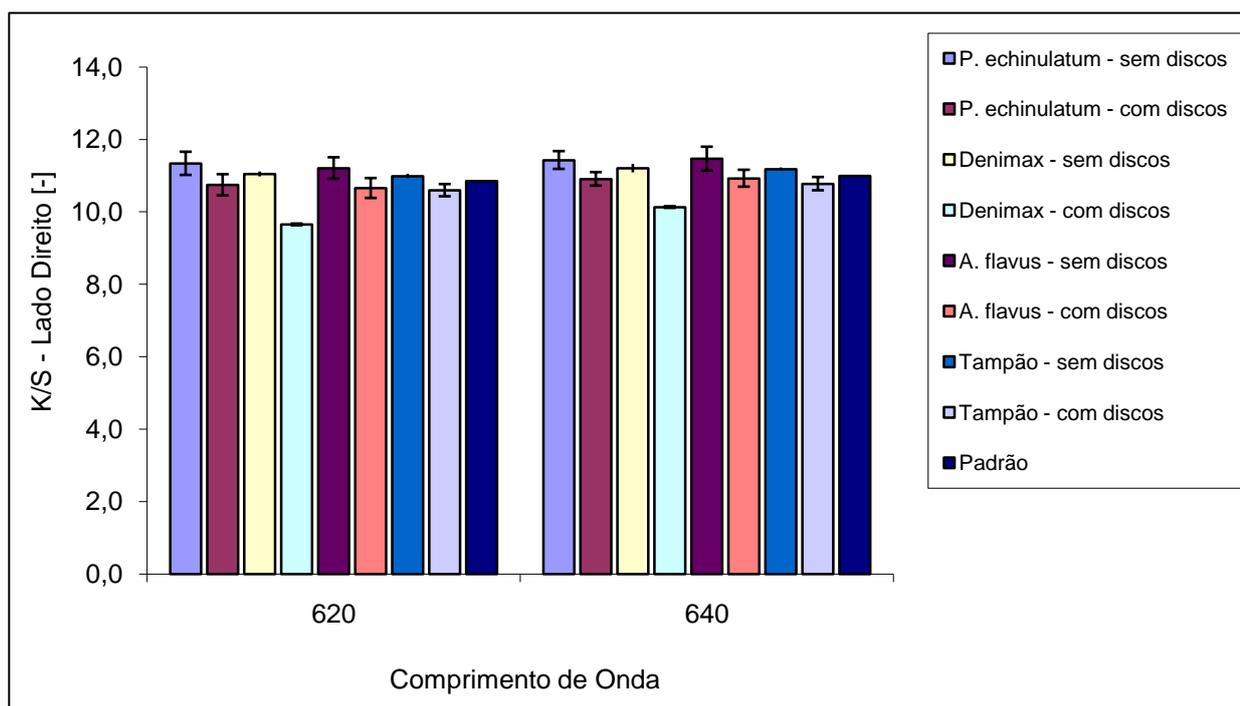


Figura 18. Reflexão espectral (K/S) do lado direito dos tecidos tratados.

A medição da cor do lado avesso (Figura 19), em que prevalece o efeito da cor do fio de trama branco, é, geralmente, utilizada para avaliar o grau de *backstaining*, ou seja, a redeposição do corante índigo, que foi removido pela abrasão enzimática, no fio de trama branco. Todos os valores de K/S no lado avesso são menores que do tecido padrão. Entretanto, o tratamento somente com tampão também provocou redução na cor. Os resultados obtidos nas diferentes condições de tratamento e em comparação com o tecido padrão desengomado indicam que não ocorreu redeposição significativa do corante índigo do lado avesso. Pelo contrário, a lavagem removeu

também a cor do lado avesso, que pode, eventualmente, advir da desengomagem anterior do tecido. Melhores valores (maior redução da cor) poderiam ser obtidos com maior quantidade de enzima, presença de maior agitação/fricção mecânica e auxiliares (surfactantes), assim como uma lavagem posterior com detergente para a remoção do corante insolúvel redepositado no tecido. Considerando que o corante índigo, apesar de ser uma molécula pequena, é bastante insolúvel, a presença de auxiliares (surfactantes, dispersantes e polímeros) pode ajudar a manter o corante em solução manter as partículas liberadas em solução, evitando, assim, a redeposição do corante (*backstaining*).

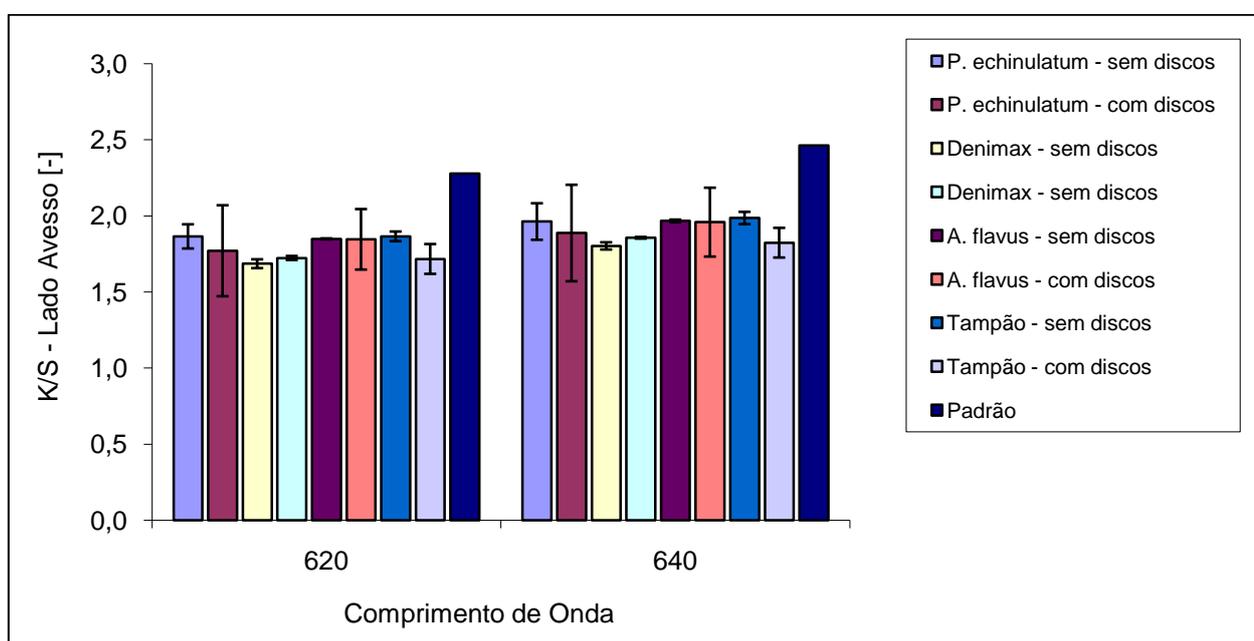


Figura 19. Reflexão espectral (K/S) do lado avesso dos tecidos tratados.

A aplicação de surfactantes, especialmente não-iônicos, e de outros auxiliares, junto com as celulasas durante o tratamento de denim, pode aumentar a eficiência das celulasas e diminuir o tempo de tratamento e os efeitos secundários indesejados, como o *backstaining* (Tzanov *et al.*, 2003; Andreus & Cavaco-Paulo, 2008).

4. Conclusões

O extrato bruto do fungo selvagem *Aspergillus flavus* cultivado em meio líquido com engaço de bananeira como fonte de carbono mostrou baixa atividade de CMCase, mas significativas atividades de pectinase e xilanase, em relação ao preparado comercial Denimax L, produzido pelo fungo melhorado *T. reesei*. A pectinase apresentou maior atividade entre 60° e 70°C, e atividade crescente com aumento do pH até pH 9,0, demonstrando, assim, o potencial do extrato desse fungo para a utilização no tratamento têxtil de fibras de algodão. Os resultados obtidos nos ensaios de biopurga, de biopolimento e de bioestonagem, no entanto, demonstraram que o engaço de bananeira, utilizado como fonte de carbono durante o cultivo do fungo, libera muitos extrativos totais (escuros) que causam manchamento dos tecidos. Esse manchamento pode ter mascarado diversos resultados, como, por exemplo, a interferência nas análises colorimétricas, ou o impedimento da adsorção das enzimas nos tecidos. Por outro lado, esse extrato poderia ser explorado como corante natural de tecidos. Para dar continuidade ao trabalho, sugerem-se testes para avaliar o grau de manchamento de tecidos com extratos do engaço de bananeira e o cultivo do *A. flavus* em outras fontes de carbono, assim como purificar os extratos enzimáticos do cultivo realizado em engaço de bananeira, para repetir os tratamentos em tecidos de algodão.

5. Referências

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2003. **Material Têxtil – Determinação da Hidrofilidade de Tecidos**: NBR 13.000. Rio de Janeiro, 2003.
- ANDREAUS, J. 2001. Aplicação de Celulases em Processos de Desbotamento. **Química Têxtil**. 64, 5-18.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. 2008. Enzimas no Processamento de Fibras Têxteis. In: BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 8, p. 179-204.
- BAJAJ, P.; AGARWAL, R. 1999. Innovations in Denim Production. **American Dyestuff Reporter**, 88, 5, p. 26.

- BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S.E.; GARGOURI., A. 2001. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, 253–258.
- BHAT, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18, 355-383.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapide and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-255.
- BUSCHLE-DILLER, G.; EL-MOGAHZY, Y.; INGLESBY, M.K.; ZERONIAN, S.H. 1998. Effects of Scouring with Enzymes, Organic Solvents, and Caustic Soda on the Properties of Hydrogen Peroxide Bleached Cotton Yarn. **Textile Research Journal**. 68, 12, 920-929.
- CALAFELL, M.; KLUG-SANTNER, B.; GUEBITZ, G.; GARRIGA, P. 2005. Dyeing behaviour of cotton fabric bioscoured with pectate lyase and polygalacturonase. **Coloration Technology**, 121, 291-297.
- CAVACO-PAULO, A. 1998. Mechanism of Cellulase Action in Textile Processes. **Carbohydrate Polymers**, 37, 273-277.
- CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. Catalysis and Processing. 2003. In: CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. **Textile Processing with Enzymes**. Cambridge: CRC Press, 2003. Cap 3, p 86-119.
- CSISZAR, E.; LOSONCZI, A.; SZAKA´CS, G.; RUSZNA´K, I.; BEZU´R, L.; REICHER, J. 2001. Enzymes and Chelating Agent in Cotton Pretreatment, **Journal Biotechnology**, 89, 271–279.
- DILLON, A.J.P. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. 2004. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004. Cap. 14, p. 243-270.
- DURÁN, N.; DURÁN, M. 2000. Enzyme Applications in the Textile Industry. **Rev. Prog. Coloration**. 30, 41-44.
- FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. 2006. Pectinases. In: PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. Delhi: Springer, 2006. Cap. 14, p. 273-296.
- FERREIRA-FILHO, E.F. Pectinases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. 2004. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004. Cap. 17, p. 307-326.
- GUILLÉN, J.C.; GARRIDO, J.M. 1987. **Algodon y Cellulose: Estructura y Propiedades**. Terrassa: Universidade Politècnica de Catalunya, 1987. Cap 1. p. 9-31.
- 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.; POLIZELI,

- M.L.T.M. 2006. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, 3, 474-480.
- HARDIN, I.R.; LI, Y.; AKIN, D. Cotton Wall Structure and Enzymatic Treatments. 1998. In: **ACS Symposium Enzyme Applications in Fiber Processing**. American Chemical Society. San Francisco. 1998. v. 687. Cap 16. p. 190-203. (ANAIS).
- HARTZELL, M.M.; HSIEH, Y-L. 1998. Enzymatic Scouring to Improve Cotton Fabric Wettability. **Textile Research Journal**, 68, 4, 233-241.
- HEARLE, J.W.S.; WILKINS, A.H. 2006. Mechanistic Modelling of Pilling. Part I: Detailing of Mechanisms. **Journal of the Textile Institute**. 97, 4, 359-368.
- HSIEH, Y-L. Chemical structure and properties of cotton. 2007. In: GORDON, S.; HSIEH, Y-L. **Cotton: Science and technology**. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2007. Cap. 1, p. 3-34.
- JØRGENSEN, H.; KUTTER, J.P.; OLSSON, L. 2003. Separation and Quantification of Cellulases and Hemicellulases by Capillary Electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 317, 85-93.
- KAMM, B.; KAMM, M. 2004. Principles of Biorefineries. **Applied Microbiology Biotechnology**, 64, 137-145.
- KANCHAGAR, A.P. **Adsorption of purified cellulases on cotton fibers**. 2003. Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor Of Philosophy Athens, Georgia, 2003.
- KARAPINAR, E.; SARIISIK, M.O. 2004. Scouring of Cotton with Cellulases, Pectinases and Proteases. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**. 12, 3, 79-82.
- KLAHORST, S.; KUMAR, A.; MULLINS, M.M. 1994. Optimizing the use of cellulase enzymes. **Textile Chemical Color.**, 26, 1318.
- LENTING, H.B.M.; ZWIER, E.; NIERSTRASZ, V.A. 2002. Identifying important parameters for a continuous bioscouring process. **Textile Research Journal**, 72(9), 825-831.
- LI, Y.; HARDIN, I. R. 1998. Treating Cotton with Cellulases and Pectinases: Effects on Cuticle and Fiber Properties. **Textile Research Journal**, 68, 9, 671-679.
- LIN, C-H.; HSIEH, Y-L. 2001. Direct Scouring of Greige Cotton Fabrics with Proteases. **Textile Research Journal**, 71, 5, 425-434.
- LOPEZ-CASADO, G.; URBANOWICZ, B.R.; DAMASCENO, C.M.B.; ROSE, J.K.C. 2008. Plant Glycosyl Hydrolases and Biofuels: A Natural Marriage. **Current Opinion in Plant Biology**. 11, 329-337.
- LOSONCZI, A.; CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; BEZUR, L. 2005. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. **Textile Research Journal** 75(5), 411-417.

- MARTINS, L.F. 2005. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum***. 139 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426–428.
- MORI, R.; HAGA, T.; TAKAGISHI, T. 1997. Changes in Dyeability and Morphology of Cotton Fiber Subjected to 114 Cellulase Treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, 65, 155-164.
- NIERSTRASZ, V.A.; WARMOESKERKEN, M.M.C.G. Process Engineering and Industrial Enzyme Applications. 2003. In: CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. **Textile Processing with Enzymes**. CRC: 2003. Cap 4. p 120-157.
- RAU, M.; HEIDEMANN, C.; PASCOALIN, A. M.; FILHO, E. X. F.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; CHAGAS, C.F.; ANDREAS, J. 2008. Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres. **Biocatalysis and Biotransformation**, 26(5): 383_390.
- RAU, M. 2008. **Caracterização das atividades dos complexos enzimáticos de *Acrophialophora nainiana* e *Penicillium echinulatum* e aplicação em biopurga de algodão**. Dissertação de Mestrado – Universidade Regional de Blumenau, 107 pp, 2008.
- ROUSSELLE, M-A. BERTONIERE, N.R.; HOWLEY, P.S.; PERE, J.; BUCHERT, J. 2003. Effect of Purified *Trichoderma reesei* Cellulases on the Supramolecular Structure of Cotton Cellulose. **Textile Research Journal**, 73, 10, 921-928.
- SARAVANAN, D.; DINESH, C.; KARTHIKEYAN, S.; VIVEKANANDAN, A.; NALANKILLI, G.; RAMACHANDRAN. T. 2009. Biopolishing of cotton fabrics with total cellulases of *Trichoderma reesei* and optimization using Taguchi methods. **Journal of Applied Polymer Science**, 112, 6, 3402-3409.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, 6, 219-228.
- SOFFNER, M.L.A.P. 2001. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira**. Master dissertation, University of São Paulo, Brazil.
- SZAKACS, G.; TENGEDY, R.P.; NAGY, V. Cellulase. 2006. In: PANDEY, A. *et al.* **Enzyme Technology**. Delhi: Springer, 2006. Cap. 13, p. 253-272.
- TZANOV, T.; BASTO, C.; GÜBITZ, G.M.; CAVACO-PAULO, A. 2003. Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton. **Macromolecular Materials and Engineering**, 288, 807-810.
- VIGO, T.L. 1994. **Textile Processing and Properties**. The Netherlands: Elsevier, 1994. Cap 1. p 1–51. Coleção Textile Science and Technology. v. 11.

WAKELYN, P.J. 2007. **Cotton Fiber Chemistry and Technology**. Boca Raton: CRC Press, 2007.
Cap 3.

WARREN, R.A.J. 1996. Microbial Hydrolysis of Polysaccharides. **Annual Reviews Microbiology**.
50, 183-212.

Capítulo V

The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi

**Artigo publicado na International Biodeterioration & Biodegradation
(2010)**

*Félix Gonçalves de Siqueira¹ · Eliane Gonçalves de Siqueira¹ · Paula Marcelo Duque Jaramillo² ·
Marcos Henrique Luciano Silveira³ · Jürgen Andreaus³ · Fabiana Aparecida Couto⁴ · Luís Roberto
Batista⁴ · Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹.*

*¹Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,
Brasília, DF, CEP 70910 900, Brazil. ²Laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de
Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP 37200 000, Brazil. ³Laboratório de
Química Têxtil, Departamento de Química, FURB - Universidade Regional de Blumenau,
Blumenau, SC, CEP 89012 900, Brazil. ⁴Laboratório de Microbiologia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, CEP
37200 000, Brazil.*

RESUMO

Um dos grandes problemas da industrialização é o volume de resíduos produzidos diariamente e que, algumas vezes, não recebem nenhum tratamento e são lançados no ambiente, criando um problema que está se tornando cada vez mais preocupante. Por esse motivo, cresceu o interesse no aproveitamento dos resíduos industriais como forma de gerar receita para a empresa e, ao mesmo tempo, reduzir o impacto ambiental, eliminando toneladas de subprodutos que podem poluir o ambiente. O algodoeiro produz, além da fibra do algodão, que tem mais de quatrocentas

aplicações industriais e veste quase metade da população humana, vários subprodutos aproveitáveis pelo homem, destacando-se o óleo, que representa cerca 17% de todo o óleo vegetal produzido no mundo e o línter (fibras curtas, menores que 12,7 mm), que tem inúmeras aplicações na indústria, como algodão hidrófilo, tecidos rústicos, pólvora, estofamentos, etc. (Beltrão *et al.*, 2000). O processo de beneficiamento industrial do algodão em fios de algodão produz um resíduo composto por pequenos fragmentos da fibra que tem composição química similar à do material de origem, denominado “piolho”, podendo ser subdividido em “piolho-bom”, “piolho-sujo” e “lixo” (Figura 1). Estudos estão sendo realizados com a finalidade de proporcionar o aproveitamento comercial e a viabilização desses resíduos na cadeia produtiva do algodão, além da redução dos impactos ambientais da indústria (Severino *et al.*, 2003; Firmino *et al.*, 2003).

Os materiais e métodos deste trabalho, que descrevem os experimentos realizados e relatados neste capítulo, estão no artigo publicado (anexado) e também nos Capítulos II e III desta tese.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar um dos resíduos da indústria de rebeneficiamento (piolho-de-algodão-sujo) como fonte de carbono indutora para holocelulases de fungos filamentosos em cultivo submerso. Essa fonte de carbono foi comparada com outra fonte lignocelulósica, o engaço de bananeira. Os fungos utilizados nos cultivos foram isolados da compostagem natural de resíduos de uma indústria de rebeneficiamento de fibras de algodão (Hantex Ltda., região do Vale do Itajaí, Gaspar, SC). Foram isolados mais de 20 fungos filamentosos, tendo como destaque: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans* (forma teleomórfica de *Aspergillus nidulans*), *Penicillium citrinum*, *Fusarium proliferatum* e *Paecilomyces lilacinum*. Alguns extratos brutos foram purificados parcialmente em membranas de ultrafiltração e cromatografia de filtração em gel, para a observação do comportamento de celulasas, hemicelulasas e pectinases.

O padrão das holocelulases foi influenciado pelo tipo de resíduos agroindustriais presentes no meio de cultura de cultivo. Os fungos *A. oryzae*, *A. terreus* e *E. nidulans* tiveram resultados significativos na produção de holocelulases, sendo este último fungo produtor de considerável atividade de arabinofuranosidases quando cultivado em piolho-de-algodão-sujo como fonte de carbono (Figura 2). A multiplicidade das enzimas foi evidenciada por fracionamento do extrato bruto por ultrafiltração, filtração em gel (Figura 3) e cromatografia de troca iônica (Figura 4) e análises de gel de eletroforese e zimograma (Figura 5).



Figura 1. Imagens da indústria de rebeneficiamento de algodão no Vale do Itajaí, SC. A) Estoque de resíduos expurgados por grandes indústrias de beneficiamento do algodão em fio. B) Uma das máquinas (aspiração de pó de filtro) responsáveis pelo rebeneficiamento das fibras de algodão consideradas como expurgo no primeiro beneficiamento em indústria de maior porte. C) Fibras de algodão rebeneficiada, prontas para venda (fibra de segunda qualidade). D) Coleta do material lignocelulósico residual referente à aspiração durante o rebeneficiamento da fibra de algodão (pó-de-filtro). E) F) Compostagem dos resíduos da indústria de rebeneficiamento utilizados depois da formação de húmus para adubação da horta da indústria, sendo estes os locais de coleta das amostras para isolamentos dos fungos filamentosos utilizados neste trabalho.

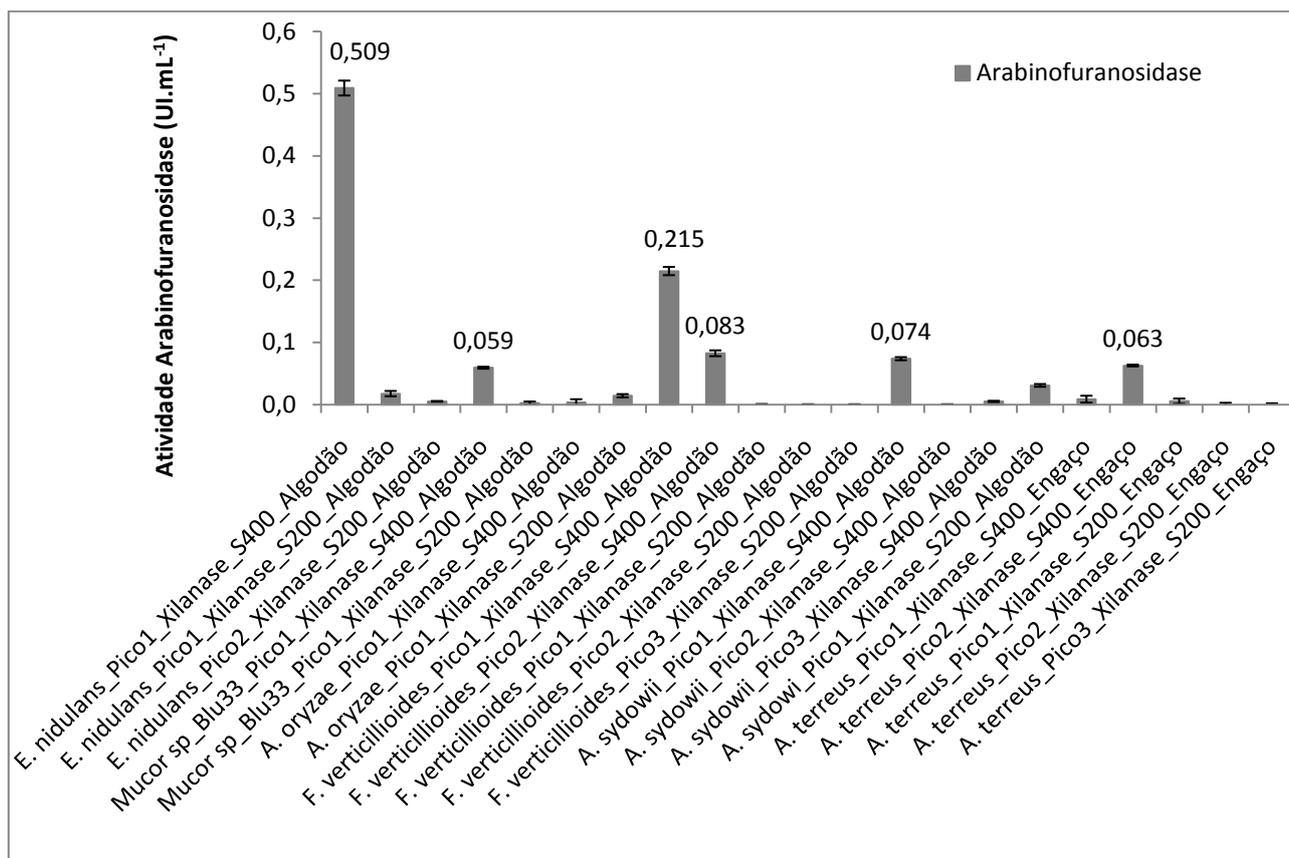


Figura 2. Atividade de arabinofuranosidase dos extratos brutos de alguns fungos cultivados em piolho-de-algodão-sujo e engaço de bananeira, que foram submetidos à ultrafiltração em membrana de 300 e, posteriormente, à cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-400 e S-200.

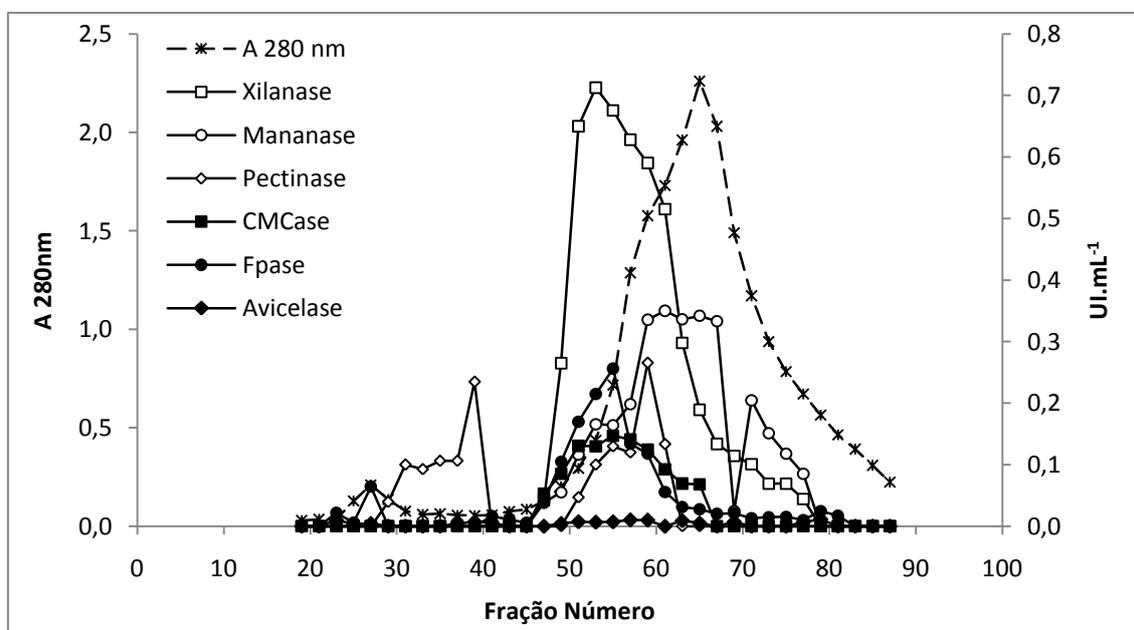


Figura 3. Perfil cromatográfico em coluna de filtração em gel (Sephacryl S-400) das atividades enzimáticas de celulases, hemicelulases e pectinase do extrato bruto de *Emericella nidulans* crescido em piolho-de-algodão-sujo previamente concentrado em membrana de PM 300.

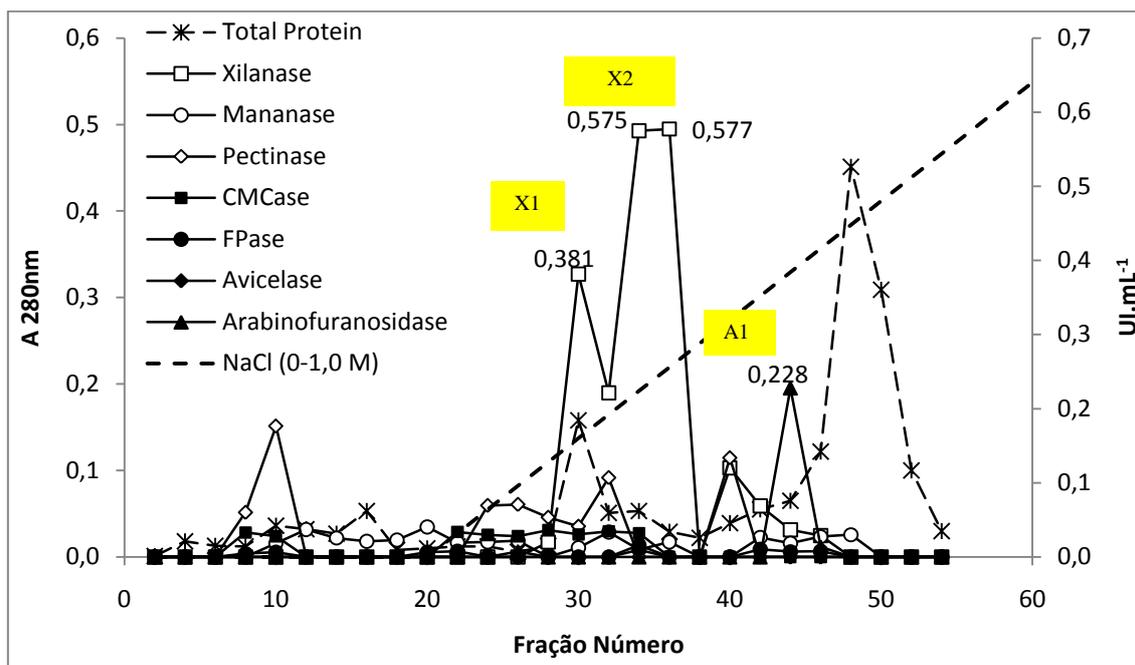


Figura 4. Perfil da cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (Aniônica) das frações (50-60) de filtração em gel S-400 (Figura 3).

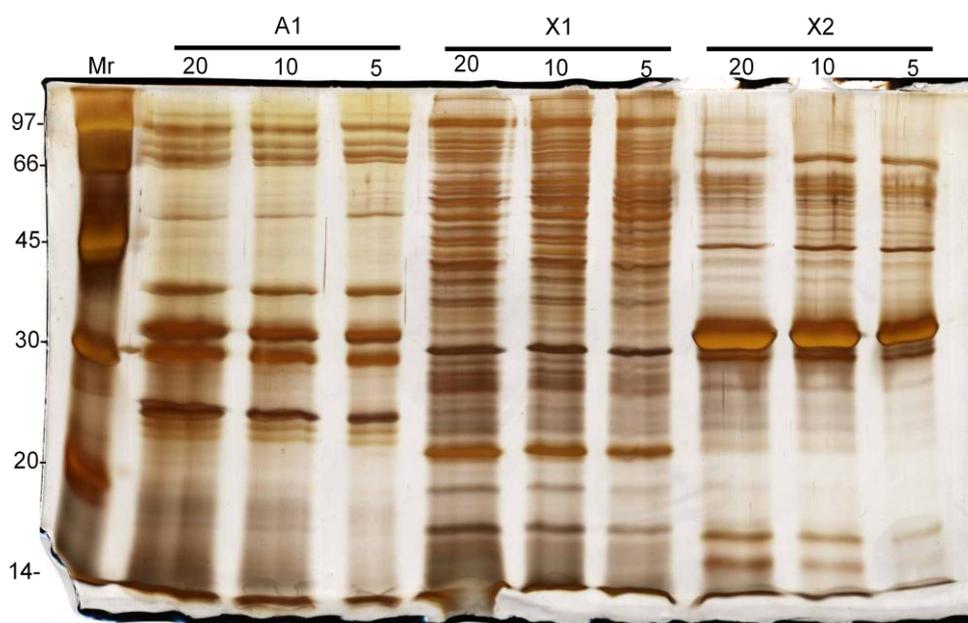


Figura 5. Gel de eletroforese (SDS-PAGE12%) com diferentes volumes das amostras de arabinofuranosidase (A1) e xilanases (X1 e X2) que foram obtidas da cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) (Figura 4).

O gel de eletroforese (SDS-PAGE) dos picos de atividades de xilanases (X1 e X2) e arabinofuranosidase (A1) feito com diferentes volumes (5, 10 e 20 μ L) de amostras apresentou várias bandas de proteicas (Figura 5). Desse modo, a cromatografia de troca iônica Q-sepharose, apesar de separar as enzimas, não foi suficiente para a purificação total das enzimas. No entanto, foi realizado um zimograma para detectar a atividade de xilanase em gel de eletroforese. Neste experimento, pode-se observar que a fração contendo a atividade de arabinofuranosidase (A1) não apresentou, como esperado, atividade de xilanase. Por outro lado, as xilanases (X1 e X2) formaram halos visíveis de atividade no gel (Figura 6). A determinação da massa molecular de X1 e X2 por SDS-PAGE mostrou valores de 23 e 31 kDa, respectivamente (Figura 7).

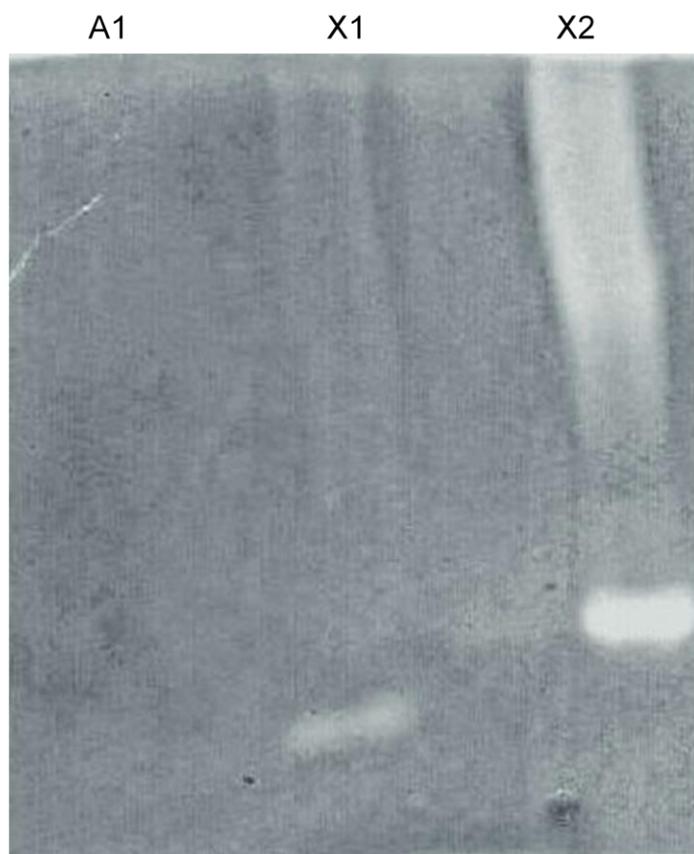


Figura 6. Zimograma das frações cromatográficas de arabinofuranosidase (A1) e xilanases (X1 e X2) que foram obtidas da cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (Figura 4).

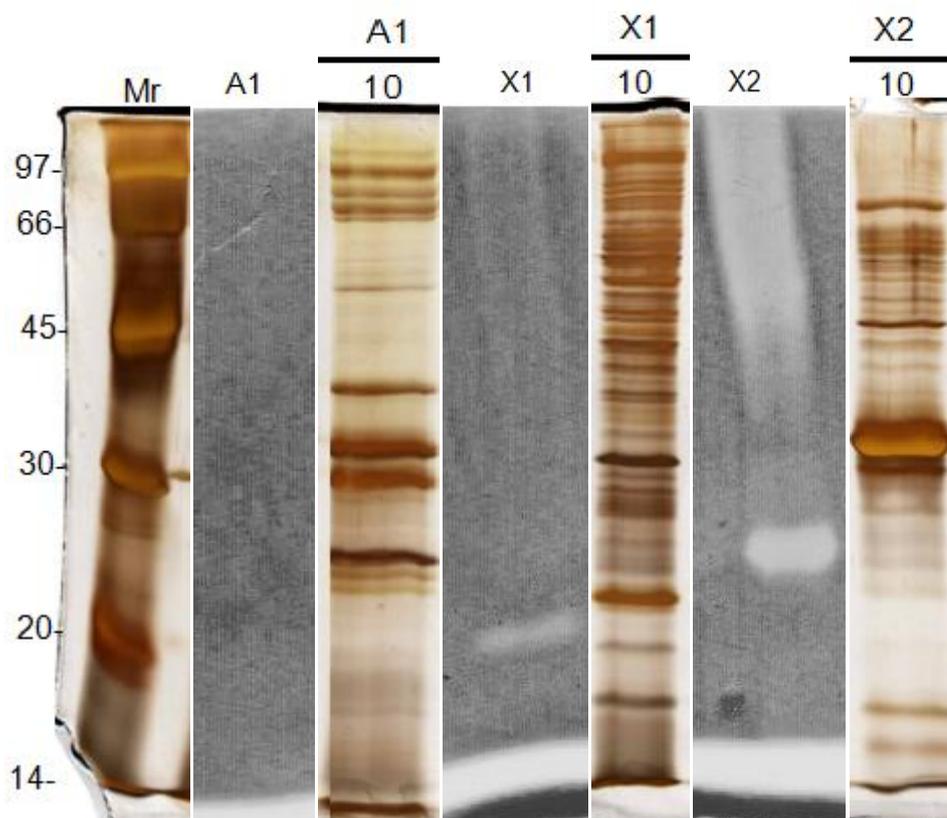


Figura 7. Sobreposição dos géis de eletroforese (SDS-PAGE – volume de 10 μ L) (Figura 5) e o zimograma com xilana *oat spelt* (Figura 6) para a determinação hipotética das massas moleculares das xilanases (X1 e X2).

A purificação parcial dos extratos brutos por meio de cromatografia de filtração em gel e troca iônica mostrou que holocelulases coeluem com outras proteínas, como se pode observar para xilanases e arabinofuranosidase do *E. nidulans* no gel de eletroforese. Dessa forma, cabe ressaltar que o uso de enzimas no processamento de resíduos agroindustriais para a produção de outros produtos não é um caminho totalmente compreendido, em função da complexidade das estruturas e da composição desses materiais. Portanto, para a conversão biológica dos resíduos agroindustriais de forma eficiente, é necessário o uso de um consórcio de enzimas que interajam sinergicamente para liberar produtos, como monômeros e oligômeros, que podem ser convertidos em combustíveis e outros subprodutos de interesse industrial e comercial.

REFERÊNCIAS

- BELTRÃO, N.E.M. 2000. Algodão: Utilidades – O que fazer com a semente?. **Cultivar**, Pelotas, 2(17):36-39.
- FIRMINO, P.T.; BELTRÃO, N.E.M.; CARDOSO, G.D.; LIV SOARES SEVERINO, L.S. 2003. **Alternativas de aproveitamento do resíduo industrial da fibra de algodão (piolho e lixo)**. 4º Congresso Brasileiro de Algodão, CD ROOM - Campina Grande, www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/.../376.pdf.
- SEVERINO, L.S.; FARIAS, V.A.; LIMA, L.D.; FIRMINO, P.T.; BELTRÃO, N.E.M.; CARDOSO, DIONÍZIO, G. 2003. Crescimento do algodoeiro em resposta à aplicação de resíduos industriais da fibra de algodão. **Revista Brasileira de Oleaginosa e Fibrosas**, disponível em www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

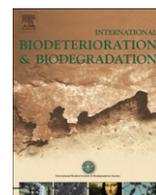
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi

Félix Gonçalves de Siqueira^a, Eliane Gonçalves de Siqueira^a, Paula Marcela Duque Jaramillo^b, Marcos Henrique Luciano Silveira^c, Jürgen Andreas^c, Fabiana Aparecida Couto^d, Luís Roberto Batista^d, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho^{a,*}

^aLaboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

^bLaboratory of Agriculture Microbiology, Department of Biology, University of Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000, Brazil

^cLaboratory of Textile Chemistry, Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, Blumenau, SC, CEP 89012-900, Brazil

^dLaboratory of Food Microbiology, Department of Food Science, University of Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2009

Received in revised form

6 October 2009

Accepted 6 October 2009

Available online 3 November 2009

Keywords:

Banana stem

Cotton residues

Holocellulose

Holocellulase

ABSTRACT

Fungal species, including *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Emmericella nidulans*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Paecilomyces lilacinum*, were isolated from cotton processing residues. They were screened for their ability to produce holocellulases when grown in liquid-state media containing agro-industrial residues as the carbon sources. Experiments on the growth of filamentous fungi on culture media containing cotton residue as the carbon source is reported for the first time. For convenience, cultivation conditions (other than temperature) and enzyme assays were the same for all fungi, i.e., no attempt at optimization of individual was made. The objective of this work was to identify fungi and holocellulase (cellulase, hemicellulase and pectinase) of academic interest and as well as of potential commercial application. The pattern of holocellulase production was influenced by the type of agro-industrial residue present in the medium. The best yields of holocellulases were obtained from extracts of *A. oryzae* and *A. terreus*. Enzyme multiplicity was evidenced by fractionation of the crude extracts on ultrafiltration, gel filtration and ion-exchange chromatography procedures and zymogram analysis.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Agro-industrial residues contain lignocellulosic material available for exploitation as sources of chemical feedstocks, fuels, foods and feeds. The term holocellulose is used to describe the total carbohydrate content of lignocelluloses, and the material that is obtained after the removal of lignin (Andreas et al., 2008). The agro-industrial residues represent an important alternative source for the microbial growth and production of industrial enzymes. Enzymatic hydrolysis of holocellulose requires an arsenal of enzymes, including cellulases, hemicellulases and pectinases. A great variety of fungi and bacteria are able to degrade these macromolecules by using a battery of hydrolytic or oxidative enzymes (Sánchez, 2009). The ability of some microorganisms to metabolize lignin, cellulose, and hemicellulose make them potentially important to take advantage of vegetable residues (Pérez et al., 2002). Procedures for optimizing the

production of fungal holocellulases require a cheap carbon source. Here we investigate the potential use of cotton and banana residues for this purpose. The residue that accumulates in cotton processing textile companies, especially during cotton spinning has been used before as feed for cattle, but today it seems to be too expensive for this purpose, so that this material is further processed to exploit more of the fibrous matter. The residues are collected from different cotton spinning and yarn forming textile industries, mixed and submitted to further mechanical purification. The purification procedure results in three fractions of different qualities: a cleaner fibrous fraction that contains short cotton fibers with a length below 15 mm, which may be reused for the production of low quality yarns (clean cotton residue), a second more dirtier fraction that contains very short fibers, husks and other dark matter (dirty cotton residue) and the filter powder. Dirty and clean cotton residues are sold as feed for cattle and to spinning companies, respectively and filter powder is recycled as fertilizer and also burned to produce energy (Hantex Resíduos Têxteis, Gaspar, SC, Brazil, personal information). Banana stem, a grain stalk that supports the banana fruits, is normally discarded after the fruit harvesting, either in the "packing houses" or

* Corresponding author. Tel.: +55 61 33072152; fax: +55 61 32734608.
E-mail address: eximenes@unb.br (E.X.F. Filho).

in the delivering centers, where it is considered a residue due to the great volume generated (Medeiros et al., 2000). The objectives of the present work were to isolate and identify fungal species from residues of cotton spinning, and evaluate their capacity to produce holocellulases during growth in liquid media containing agro-industrial residues (banana stem and dirty cotton residue) as the carbon sources. By using two substrates with different cell wall composition, it is expected the information obtained here to make significant contribution not only in gaining knowledge for the best conditions for microorganism growth and enzyme production, but also to the development of a well balanced crude enzyme mixture for cell wall breakdown and for biotechnological applications.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All substrates were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All residues from cotton processing were a gift from Hantex Resíduos Têxteis Ltda (Gaspar, SC, Brazil). Banana stem was from a local source. Sephacryl S-200, Sephacryl S-400 and Q-Sepharose were from GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, SP, Brazil).

All the experiments were carried out in five replicates. The standard deviation was less than 20% of the mean.

2.2. Fungi isolation and identification

The fungi species were isolated from natural compost of dirty cotton, clean cotton and filter powder residues. Pieces of cotton residues (10 g) were diluted in 990 ml of saline water. A serial dilution (10^3) was carried out by transferring 1.0 ml of the above solution to 9 ml of saline water and placed in a series of Petri plates containing 10% potato-agar. After that, 100 μ l of the diluted solution was spread to fresh potato-agar medium and incubated at 30 °C, 40 °C and 50 °C up to 72 h until the mycelium spreads over most of the medium surface. They were then stored at 28 °C. Each isolate was cultivated for 07 days in appropriate standard conditions, including temperature and medium. The fungi identification was done according to previously described, and the species and genus features are reported in the literature (Pitt and Hocking, 1997; Pitt, 2000; Samson et al., 2000; Klich, 2002).

2.3. Organism and enzyme production

The fungi were maintained in PDA medium (2.0% potato broth, 2.0% dextrose and 2.0% agar). An aliquot (2.5 ml) of a spore suspension (10^8 spores/ml) was inoculated in Erlenmeyer flasks containing 250 ml of liquid medium (0.7% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.06% yeast extract) at pH 7.0, and 1.0% (w/v) banana stem or dirty cotton residue as the carbon source. The fungi were grown for 7 days, at 30 °C, 40 °C and 50 °C, under agitation of 120 rpm. The media were then filtered through filter paper and the resulting supernatants, hereafter called crude extract, used as source of holocellulases.

2.4. Enzyme assays

Endoglucanase (CMCase activity), xylanase, pectinase and mannanase activities were carried out by mixing 50 μ l of enzyme sample with 100 μ l of substrate 1%, w/v (carboxymethyl cellulose, oat spelt xylan, and pectin respectively) and 0.5% w/v (galactomannan) at 50 °C for 30 min. FPase activity was determined with filter paper (Whatman N°1) as the substrate and 150 μ l of enzyme at 50 °C for 1 h (Mandels et al., 1976). Avicelase activity was

determined by mixing microcrystalline cellulose suspension (50 μ l) as the substrate (1% w/v) and 100 μ l of enzyme at 50 °C for 2 h. The release of reducing sugars was measured using the DNS (dinitrosalicylic acid reagent) method (Miller, 1959). One unit was expressed as μ mol reducing sugar formed min/ml enzyme solution, i.e., as IU ml^{-1} . Glucose, xylose, mannose and galacturonic acid were used as standards. Each experiment described above was repeated at least three times, and standard deviations are shown on the graphics results. In experiments involving α -arabinofuranosidase activity, the assays were carried out at 50 °C with ρ -nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (10 mM ρ NPA) as substrate. An appropriately diluted enzyme solution (100 μ l) was mixed with ρ NPA (50 μ l) and 850 μ l of distilled water in a total volume of 1.0 ml. The ρ -Nitrophenol released was measured by monitoring the increase in $A_{410\text{nm}}$ after 10 min of incubation. The reaction was stopped by the addition of 1.0 ml of 1.0 M sodium carbonate. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), with bovine serum albumin as the standard. The glucose content was measured by the glucose oxidase and DNS methods (Miller, 1959; Trinder, 1969).

2.5. Partial purification of holocellulases

The partial purification steps were carried out at room temperature. The crude extract of *Aspergillus terreus* was concentrated by ultrafiltration using an Amicon System fitted with 300 kDa (PM 300) cut-off-point membranes. Aliquots of the concentrate samples of PM 300 were fractionated by gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 (2.5 \times 60.0 cm) and Sephacryl S-200 (2.5 \times 40.0 cm) columns, pre-equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and 0.15 M NaCl. Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 20 ml h^{-1} . The ultrafiltrate was subjected to gel filtration chromatography on Sephacryl S-200. The crude extract of *Emericella nidulans* was fractionated by gel filtration chromatography in the same conditions as described above and by ion-exchange chromatography on Q-Sepharose (2.5 \times 8 cm), previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, followed by a linear gradient of NaCl (0–1 M). Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 25 ml h^{-1} . Fractions corresponding to holocellulases were pooled and stored at 4 °C.

2.6. Electrophoresis and zymogram

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as described by Laemmli (1970) using a 12% gel. After denaturing electrophoresis, the gel containing 1% xylan oat spelt was cut longitudinally into two pieces. One piece of the gel was silver stained for protein by the method of Blum et al. (1987) and the other was treated with Triton X-100 (1%) for 30 min at 4 °C and submitted to further incubation with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 for 10 min at 50 °C. It was stained for xylanase activity by incubating with Congo red (0.1%) for 30 min at room temperature under agitation. After staining, the gel was washed with water to remove excess of Congo red and destained for 30 min with 1 M NaCl at room temperature. Acetic acid (100 mM) was added in order to obtain better band visualization (Nascimento et al., 2002).

2.7. Bromatological analysis of agro-industrial residues

For bromatological analysis, all residues were dried at 60 °C for 48 h. After that, they were grinded, kept in polyethylene bags, tied and stored at 20–25 °C. The total protein was determined by using the micro Kjeldahl method (AOAC, 1995). The fat content was measured with Soxhlet extraction with ethylic ether (AOAC, 1995),

and the ash content was obtained by the gravimetric method at 550 °C (AOAC, 1995). The crude fiber was content was evaluated by the methodology of AOAC (1995). The content of lignin, insoluble fiber in acid detergent, insoluble fiber in neutral detergent, humidity, hemicelluloses, cellulose and dry matter was determined as described elsewhere (Kirk and Obst, 1988; Tunick, 2005, van Soest, 1963, van Soest and Wine, 1967). Calcium determination was performed by atomic absorption spectrophotometry at 422.7 nm (Cali et al., 1973). The phosphorus quantification was performed in a UV-visible spectrophotometer at 420 nm (Roig et al., 1999).

3. Results and discussion

3.1. Fungi isolation and bromatological analysis of cotton residues and banana stem

Composting is defined as a process of organic waste treatment by aerobic microorganisms, being thus an ideal option for processing biodegradable solid wastes (Neklyudov et al., 2006). Twenty one fungi species were isolated from natural composting of cotton residues according to the place and temperature of cultivation and screened for their ability to produce holocellulases. The isolated fungi were identified based on their morphological characteristics. The species that could not be identified were assigned an identification number. The isolates were collected from several parts of the external and internal layers of natural composting at 20 and 40 °C, respectively. A third sample was also collected from humified fraction at 20 °C. The determination of temperature for the growth of the fungi species isolated from composting of cotton residues showed that all fungi species were able to grow at 30 °C, some of them at 40 °C (*A. terreus*, *E. nidulans* and *Fusarium verticillioides*), but none at 50 °C (results not shown). *F. verticillioides* was isolated from different parts of the composting, including external and internal layers and humic fraction. *Mucor* sp. was isolated from the external and internal layers of natural composting at 30 °C and 40 °C. *Aspergillus* genus was the dominant constituent of fungal flora isolated from composting of cotton residues. Moreover, *E. nidulans*, the teleomorph of *Aspergillus nidulans*, presented the highest number of colonies during the period of isolation.

The agro-industrial residues are cheap carbon sources for the growth of microorganisms, including filamentous fungi and for the production of holocellulases. In this context, cotton residues and banana stem were found to be a rich source of macro- and micro-nutrients (Table 1). The bromatological analysis of banana stem and

cotton residues showed that clean cotton residue had the highest cellulose content, followed by dirty cotton residue. Filter powder residue had the highest hemicellulose and fiber content. The micro-nutrient content was higher in dirty cotton residue. With respect to lignin content, banana stem showed the highest value. In comparing the Kjeldahl nitrogen content, we made the simplifying assumption that all of this nitrogen is protein-derived. The highest protein and soluble carbohydrate contents were measured for banana stem.

3.2. Production of holocellulases

The production of holocellulases by liquid-state cultivation on media dirty cotton and banana residues was studied in different fungi species (Tables 2 and 3). It has been reported that the nature of the substrate influences the nature and utility of the enzymes produced during the growth in liquid-state media (Considine and Coughlan, 1989). Thus, each holocellulose component of banana stem and cotton residue should induce synthesis of the enzyme involved in its breakdown. However, exceptions to this rule can occur, especially when we deal with xylanase induction by cellulose, which is sometimes a better inductor than xylan. Our preliminary data show that the mesophilic fungus *Penicillium corylophilum* produced highest holocellulase activities when grown in the presence of dirty cotton residue (data not shown). Therefore, in order to investigate the inducing effect of cotton residue in holocellulase production, dirty cotton was adopted as the carbon source. Moreover, another previous experiment with several fungi species showed that the period of seven days of growth was the optimal incubation time to detect the highest holocellulase when banana stem and cotton residues were the carbon sources. We noticed that even under the same cultivation conditions there may be considerable variation in the production of holocellulases. According to Tuohy et al. (1989), the cultivation of fungi, extraction of enzymes and enzyme assays are associated with logistical problems and, therefore must be considered. For convenience, cultivation conditions (other than temperature) and enzyme assays were the same for all fungi, i.e., no attempt at optimization of individual activities was made. Although a number of quantitative comparisons of holocellulases are described in literature, no standard enzyme substrate has been adopted yet and comparison of the amounts of enzyme produced by different organisms should be done carefully is not absolutely adequate, because different culture conditions may have been used (Tuohy et al., 1989). Moreover, the enzyme sample dilution is also a parameter to be included when we deal with measured enzyme activity. The enzyme activity may be underestimated for a variety of reasons, including the presence of phenolic substances in crude extract samples which may inhibit the enzyme activities or adsorb to enzymes and render them unavailable for a further catalysis. In addition, soluble inhibitors are described to delay or inhibit growth of fungi on lignocellulosic substrates (Tuohy et al., 1989). From the point of view of economical holocellulase production, it is desirable to use an inexpensive lignocellulosic biomass, like cotton and banana residues. Moreover, the addition of fibrous material as banana stem and cotton residues is believed to contribute in the interparticle spacing with a possible increase in aeration, nutrients and enzyme diffusion (Martin et al., 2004). Among twenty one fungi tested, the highest yields of xylanase activity were produced by *A. terreus* (3.5 IU ml⁻¹), *E. nidulans* (2.7 IU ml⁻¹) and *Aspergillus siydowii* (2.2 IU ml⁻¹), when grown in banana stem at 30 °C (Table 3). However, when grown at 40 °C, xylanase activity production by *A. terreus* and *E. nidulans* was significantly lower. In comparison to the growth of *A. terreus* and *E. nidulans* in banana stem as substrate, the amount of xylanase activity found in dirty cotton residue medium was notably high at 30

Table 1
Bromatological analysis of residues from cotton industry and banana stem.

Bromatological analysis	Residues			Banana stem
	Filter powder	Clean cotton	Dirty cotton	
Fiber (%)	86.8	69.1	56.7	44.6
Ash (%)	1.2	2.8	4.6	7.8
Humidity (%)	6.8	7.2	8.5	8.4
Dry matter (%)	93.2	92.8	91.5	91.6
Crude protein (%)	5.0	6.2	6.9	8.6
Fat (%)	1.5	1.1	1.8	2.3
FDA ^a (%)	45.3	77.8	72.0	62.3
FDN ^b (%)	93.1	81.9	81.8	79.8
Soluble carbohydrate (%)	5.6	20.8	30.0	36.7
kcalorie (Kcal g ⁻¹ 100 g)	55.3	118.1	163.7	202.0
Cellulose (%)	40.8	73.0	65.7	52.9
Hemicellulose (%)	47.7	4.1	9.8	17.4
Lignin (%)	4.5	4.8	6.3	9.4
Calcium (%)	0.27	0.53	1.01	0.98
Phosphorous (%)	0.07	0.1	0.14	0.09

^a FDA = Insoluble fiber in acid detergent.

^b FDN = Insoluble fiber in neutral detergent.

Table 2

A profile of cellulase, hemicellulase and pectinase activities of fungi isolated from residues of the cotton industry and grown on dirty cotton residue.

Fungi species	Temperature for isolation and cultivation	Hemicellulase & pectinase			Cellulase		
		IU ml ⁻¹			Endoglucanase	FPase	Avicelase
		Xylanase	Mannanase	Pectinase			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	30 °C	0.017 ± 0.014	0.054 ± 0.007	0.038 ± 0.010	0 ± 0.006	0.004 ± 0.001	0.026 ± 0.001
<i>Mucor</i> sp. (Blu 16) ^a		0.560 ± 0.040	0 ± 0.025	0.006 ± 0.011	0.018 ± 0.005	0.023 ± 0.001	0.028 ± 0.003
<i>Emericella nidulans</i>		2.288 ± 0.075	0.455 ± 0.017	0.221 ± 0.019	0.149 ± 0.007	0.086 ± 0.001	0.027 ± 0.001
<i>Aspergillus terreus</i>		2.467 ± 0.048	0.109 ± 0.039	0.583 ± 0.111	0.213 ± 0.011	0.064 ± 0.003	0.018 ± 0.006
<i>Fusarium verticillioides</i>		0.859 ± 0.019	0.213 ± 0.027	0.220 ± 0.015	0.038 ± 0.012	0.035 ± 0.002	0.024 ± 0.001
<i>Mucor</i> sp. (Blu 33) ^a		1.432 ± 0.064	0.238 ± 0.032	0 ± 0.014	0.104 ± 0.010	0.042 ± 0.002	0.028 ± 0.001
<i>Aspergillus oryzae</i>		2.637 ± 0.022	0.026 ± 0.012	0.215 ± 0.017	0.223 ± 0.014	0.091 ± 0.005	0.030 ± 0.000
<i>Trichoderma harzianum</i>		0.397 ± 0.009	0.095 ± 0.013	0.093 ± 0.006	0.101 ± 0.009	0.030 ± 0.001	0.026 ± 0.002
<i>Penicillium citrinum</i>		0.412 ± 0.020	0 ± 0.012	0.057 ± 0.009	0.057 ± 0.009	0.030 ± 0.002	0.011 ± 0.002
<i>Aspergillus siydowii</i>		0.343 ± 0.014	0 ± 0.021	0 ± 0.012	0 ± 0.006	0.030 ± 0.001	0 ± 0.001
<i>Paecilomyces lilacinum</i>		0 ± 0.005	0 ± 0.018	0 ± 0.017	0.179 ± 0.015	0.025 ± 0.002	0 ± 0.001
Blu 258 ^b		1.202 ± 0.035	0 ± 0.010	0 ± 0.014	0.020 ± 0.006	0.021 ± 0.001	0.014 ± 0.002
<i>Aspergillus tamaraii</i>		1.418 ± 0.019	0.029 ± 0.015	0.132 ± 0.018	0.055 ± 0.009	0.120 ± 0.006	0.014 ± 0.002
<i>Aspergillus terreus</i>		40 °C	2.026 ± 0.031	0.086 ± 0.002	0.153 ± 0.012	0.098 ± 0.016	0.053 ± 0.002
<i>Fusarium verticillioides</i>	0.909 ± 0.025		0.028 ± 0.013	0.137 ± 0.018	0.041 ± 0.011	0.016 ± 0.001	0.004 ± 0.001
<i>Fusarium</i> sp. (Blu 36) ^a	0.387 ± 0.047		0 ± 0.006	0 ± 0.015	0 ± 0.012	0.016 ± 0.001	0.015 ± 0.002
<i>Emericella nidulans</i>	2.161 ± 0.040		0 ± 0.005	0 ± 0.012	0 ± 0.010	0.120 ± 0.003	0.016 ± 0.002
Blu 38 ^b	0 ± 0.044		0 ± 0.015	0 ± 0.022	0 ± 0.022	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.002
<i>Mucor</i> sp. (Blu 39) ^a	0.133 ± 0.019		0 ± 0.004	0 ± 0.048	0 ± 0.010	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.000
<i>Fusarium</i> sp. (Blu 40) ^a	0.386 ± 0.017		0 ± 0.015	0.034 ± 0.010	0 ± 0.016	0.016 ± 0.001	0.011 ± 0.001
<i>Fusarium proliferatum</i>	0.047 ± 0.034		0 ± 0.005	0.041 ± 0.005	0 ± 0.009	0.016 ± 0.003	0.010 ± 0.002

^a Fungi identified only to genus.

^b Fungi not identified.

and 40 °C (Table 2). The highest xylanase activity (2.6 IU ml⁻¹) in medium containing cotton residue was found for *Aspergillus oryzae* when grown at 30 °C. Arabinofuranosidase activity was most active in extracts of cultures of *E. nidulans* (data not shown). With respect to mannanase activity, the best yield was obtained with extracts of cultures of *A. siydowii* and *A. terreus* grown in banana stem at 30 and 40 °C, respectively. Compared to cotton residue, banana stem was also better inducer of pectinase activity, which was highest in extracts of *A. oryzae* and *E. nidulans* grown at 30 °C and *A. terreus* at 40 °C. The highest levels of cellulase activities, including

endoglucanase, FPase and avicelase, were obtained by extracts of *A. terreus*, *F. verticillioides*, *E. nidulans*, *A. siydowii* and *Mucor* sp. when grown in banana stem. Surprisingly, cellulase activities were lower when the selected fungi were grown in dirty cotton residue (Table 2), whereas it showed, in comparison to banana stem, a higher cellulose content (Table 1). In general, it would be appear that *A. terreus* and *E. nidulans* showed the best responses to holocellulase production at 30 and 40 °C. The production of extracellular cellulases by *A. terreus* M11 on the lignocellulosic materials was studied in solid-state fermentation (Gao et al., 2008). The results showed that a high-level

Table 3

A profile of holocellulase activities of filamentous fungi isolated from residues of the cotton industry and grown on banana stem as the carbon source.

Fungi species	Temperature for isolation and cultivation	Hemicellulase & pectinase			Cellulase		
		IU ml ⁻¹			Endoglucanase	FPase	Avicelase
		Xylanase	Mannanase	Pectinase			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	30 °C	0.133 ± 0.009	0.627 ± 0.031	0 ± 0.110	0.152 ± 0.019	0.075 ± 0.004	0.012 ± 0.004
<i>Mucor</i> sp. (Blu 16) ^a		1.559 ± 0.060	0.151 ± 0.010	0.366 ± 0.035	0.216 ± 0.005	0.095 ± 0.002	0.007 ± 0.002
<i>Emericella nidulans</i>		2.707 ± 0.074	0.515 ± 0.002	1.473 ± 0.079	0.223 ± 0.014	0.133 ± 0.004	0.004 ± 0.004
<i>Aspergillus terreus</i>		3.510 ± 0.055	0.161 ± 0.022	0.796 ± 0.092	0.519 ± 0.024	0.159 ± 0.009	0.027 ± 0.003
<i>Fusarium verticillioides</i>		1.542 ± 0.052	0.559 ± 0.017	0 ± 0.133	0.293 ± 0.011	0.175 ± 0.005	0.005 ± 0.005
<i>Mucor</i> sp. (Blu 33) ^a		1.288 ± 0.024	0.558 ± 0.024	0 ± 0.051	0.141 ± 0.021	0.064 ± 0.006	0.007 ± 0.006
<i>Aspergillus oryzae</i>		1.343 ± 0.052	0.242 ± 0.016	2.207 ± 0.139	0.036 ± 0.016	0.062 ± 0.007	0 ± 0.007
<i>Trichoderma harzianum</i>		0.181 ± 0.008	0.002 ± 0.005	0.459 ± 0.065	0.012 ± 0.004	0.004 ± 0.000	0.011 ± 0.000
<i>Penicillium citrinum</i>		0.273 ± 0.009	0.069 ± 0.006	0.297 ± 0.097	0.101 ± 0.003	0.034 ± 0.002	0.018 ± 0.002
<i>Aspergillus siydowii</i>		2.197 ± 0.141	1.229 ± 0.080	0.295 ± 0.017	0.247 ± 0.020	0.084 ± 0.009	0.014 ± 0.009
<i>Paecilomyces lilacinum</i>		0.262 ± 0.043	0.115 ± 0.010	0.901 ± 0.060	0.035 ± 0.008	0.011 ± 0.003	0.014 ± 0.003
Blu 258 ^b		0.291 ± 0.014	0.050 ± 0.009	0.141 ± 0.020	0.042 ± 0.003	0.018 ± 0.000	0.024 ± 0.000
<i>Aspergillus tamaraii</i>		0.557 ± 0.007	0.164 ± 0.020	0.419 ± 0.030	0.081 ± 0.011	0.073 ± 0.005	0.018 ± 0.005
<i>Aspergillus terreus</i>		40 °C	1.088 ± 0.072	0.828 ± 0.099	1.834 ± 0.099	0.130 ± 0.010	0.076 ± 0.004
<i>Fusarium verticillioides</i>	0.603 ± 0.014		0 ± 0.009	0.293 ± 0.009	0 ± 0.008	0.018 ± 0.002	0.011 ± 0.001
<i>Fusarium</i> sp. (Blu 36) ^a	0.134 ± 0.027		0.044 ± 0.014	0 ± 0.014	0.027 ± 0.005	0.014 ± 0.001	0.004 ± 0.001
<i>Emericella nidulans</i>	0.918 ± 0.026		0.197 ± 0.008	0.191 ± 0.008	0.341 ± 0.038	0.144 ± 0.004	0.007 ± 0.000
Blu 38 ^b	0.204 ± 0.043		0.060 ± 0.005	0.478 ± 0.005	0.068 ± 0.013	0.006 ± 0.003	0.007 ± 0.001
<i>Mucor</i> sp. (Blu 39) ^a	0.281 ± 0.031		0.005 ± 0.008	0.432 ± 0.008	0.074 ± 0.020	0.007 ± 0.002	0.007 ± 0.001
<i>Fusarium</i> sp. (Blu 40) ^a	0.196 ± 0.040		0.013 ± 0.022	0 ± 0.022	0.016 ± 0.010	0.015 ± 0.002	0.005 ± 0.001
<i>Fusarium proliferatum</i>	0.154 ± 0.040		0.024 ± 0.010	0.208 ± 0.010	0.027 ± 0.009	0.005 ± 0.002	0.006 ± 0.001

^a Fungi identified only to genus.

^b Fungi not identified.

cellulase activity was produced at 45 °C (pH 3) and moisture 80% with corn stover and 0.8% yeast extract as carbon and nitrogen sources. Cellulase production by *A. terreus* grown on alkali-treated bagasse (El-Nawwi and El-Kader, 1996) showed lower yields of FPase activity than in media containing banana stem or dirty cotton residue as carbon source (Tables 2 and 3). In this case, FPase activity from *F. verticillioides* was approximately twice higher than that from *A. terreus* grown on alkali-treated bagasse. Protein determination showed that *Cladosporium cladosporioides*, *F. verticillioides*, *A. oryzae*, *A. terreus* and *Fusarium* sp. produced higher amounts of protein at 30 and 40 °C, respectively when grown in dirty cotton residue, while *F. verticillioides* and *Penicillium citrinum* were the best protein producers on banana stem residue at 30 °C (data not shown). In addition to protein determination, the cultivation on dirty cotton residue showed that the highest specific activities of xylanase and mannanase were detected in crude extract samples of *A. terreus* and *E. nidulans* grown at 30 °C, while at 40 °C the highest specific xylanase activity was recorded in crude extract samples of *E. nidulans*. It was also seen that *A. siydowii* and *Mucor* sp. (Blu 16) produced the highest levels of specific xylanase activity when grown on banana stem. It was also found that the highest specific activities of pectinase and FPase were achieved in crude extracts of *A. oryzae* and *Mucor* sp. (Blu 16), respectively. In this context, one notes that *C. cladosporioides* produced the best yields of endoglucanase and mannanase activities. The reducing sugar analysis of crude extract samples by DNS and glucose oxidase methods indicated that the best total reducing sugar and glucose content was detected in crude extract samples of *Aspergillus tamaritii* and *Fusarium* sp., respectively (data not shown). Estimation of protein in crude extracts by the Bradford method may cause significant deviation from the actual absorbance of proteins (Banik et al., 2009). Because of the presence of carbohydrate, phenolic and other interfering substances in crude extracts, protein concentration could be measured with accuracy only after trichloroacetate (final concentration 5%) precipitation and redissolution (Filho et al., 1993a,b; Marshall and Williams, 2004).

These fungal isolates may be used for protein-rich fungal biomass production using banana stem and cotton residues. Several reports in the literature describe the isolation of filamentous fungi from lignocellulosic residues, including species of the genera *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Fusarium* (Sánchez, 2009). Within this context, Gopinath et al. (2005) isolated about 34 fungal species associated with edible oil mill wastes and showing, among others, cellulase activity. Six wild fungal strains, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Glucadium virens*, *A. terreus*, *Aspergillus niger* and *Tiarospora phaseolina* were isolated from decomposed jute stacks and diseased jute stem and screened for cellulase activity (Gomes et al., 1989). The use of lignocellulose residues in different proportions was also reported to be a good strategy to improve the holocellulase production. Taking as example an article published by Martin et al. (2004), sixteen strains of fungi isolated from decaying vegetable and soil sample were cultivated in the mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in proportions of 1:9 and 9:1. In this case, the synthesis of polygalacturonase and pectin lyase by all the fungi tested depended upon the proportions of mixture used. Based on these reports and the results of the present article, a further work with the isolated strains will be directed to experiments using mixtures of banana stem and cotton residues in different proportions.

3.3. Partial purification of holocellulases

The results described above showed that *A. terreus* is a good producer of holocellulase activities, being thus chosen for a partial purification procedure. Fig. 1 shows the partial purification steps of holocellulases from crude extract sample of *A. terreus* grown on

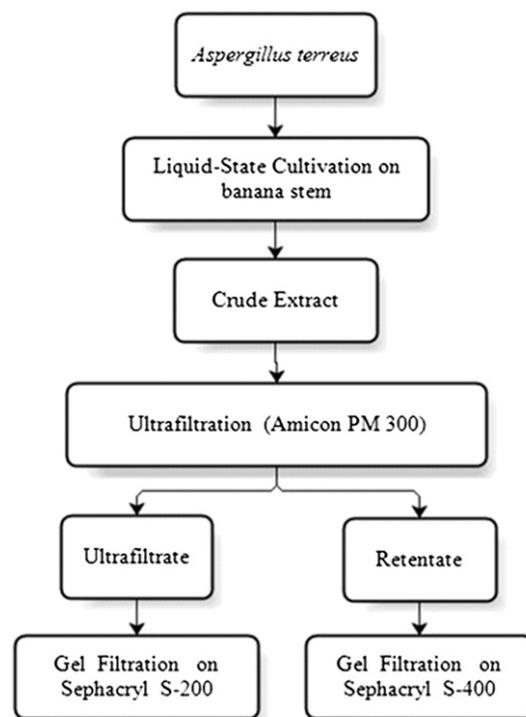


Fig. 1. Partial Purification Scheme of holocellulases from *A. terreus*.

banana stem residue, including ultrafiltration and gel filtration chromatography. The fractionation of crude extract samples by ultrafiltration showed holocellulase activities in both concentrate and ultrafiltrate, suggesting enzyme multiplicity. The concentrate presented xylanase and endoglucanase activities with high molecular mass, which was further evidenced by gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 (Fig. 2). Two major protein peaks were detected after fractionation on Sephacryl S-400. Most of the holocellulases were concentrated on the second protein peak. The first protein peak, corresponding to the void volume fractionation range, co-eluted with small peaks of xylanase and endoglucanase activities. Pectinase, mannanase, avicelase and FPase activities were only restricted to the second protein peak. This second protein peak was further purified by gel filtration chromatography on Sephacryl S-200. The profile on Sephacryl S-200 displayed a major protein peak and several peaks of xylanase and mannanase activities (data not shown). The chromatography of

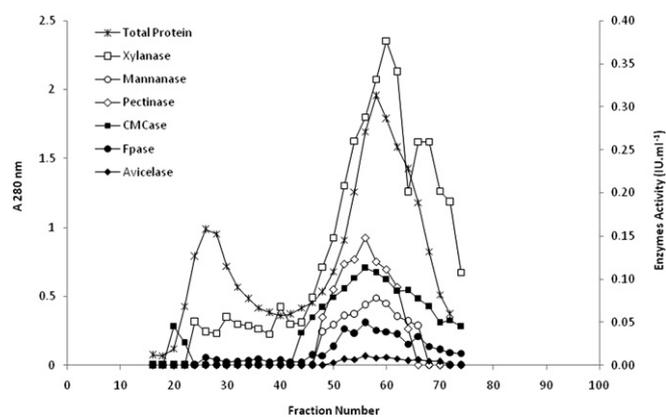


Fig. 2. Gel filtration chromatography of the concentrate on Sephacryl S-400.

ultrafiltrate on Sephacryl S-200 showed one protein peak containing three peaks of xylanase activity. A variety of enzymes are involved in the breakdown of holocellulose so that the complexity and heterogeneous nature of holocellulose require the presence of multiple forms of holocellulase for efficient biodegradation of the holocellulosic complex. In a parallel experiment, holocellulases from a crude extract sample of *E. nidulans* grown in dirty cotton residue were submitted to the same steps of purification and further purified by anion-exchange chromatography on Q-Sepharose. Various peaks of holocellulase activities were identified after gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 and Sephacryl S-200 (data not shown). The chromatography profile on Q-Sepharose revealed the presence of peaks of xylanase (X1 and X2) and α -arabinofuranosidase (A1) activities, respectively. The zymogram analysis of these enzyme peaks was performed by renaturing the enzyme after electrophoresis and visualized by staining with Congo red. A clear hydrolysis activity zone was formed against a dark background. In this case, it revealed the presence of at least two bands of xylanase activity (data not shown). The arabinofuranosidase activity was not detected.

In general, the overall yield of holocellulase activities was low for all purification procedures with most of the losses occurring during the different steps of purification. The purification yield varied from 20 to 45%. According to Filho et al. (1993a,b), comparisons of yield values with those reported for the relevant enzymes from other sources is not very meaningful because of the interlaboratory variability of holocellulase assays and because holocellulases differ from one another with respect to whether their actions require or are hindered by substituent on the substrate used.

4. Conclusions

A number of fungi species isolated from cotton residues were found to produce a group of enzyme activities able to breakdown holocellulose when grown on cotton residues and banana stem. It is clear from the results showed in this article that the yield and composition of holocellulase activities produced by liquid-state cultivation is influenced by the choice of fungus, the nature of carbon source and cultivation temperature. Some isolates, notably *A. terreus* showed a significant performance as producer of holocellulases. *A. terreus* may be included among the filamentous fungi which are able to ferment sugars to ethanol (Pushalkar and Rao, 1998). Because *A. terreus* produces hydrolytic enzymes for holocellulose degradation, further studies on the ability of this fungus to ferment cellulosic materials may prove its usefulness in the conversion of agro-industrial residues to ethanol. Some points have to be considered in the use of enzymes in processing of agro-industrial residues and upgrading of the products. These materials have complex structures and are composed of different polymers and components that interact with one another in ways that are not fully understood. Holocellulase production is directly proportional to the crystallinity of biomass from which it is produced i.e., higher the crystallinity, better will be the yield of holocellulases (ul-Haq et al., 2005). The biological conversion of these structures requires a consortium of enzymes which interacts synergistically to release of products, such as monomers and oligomers which might serve as fuel precursors and other chemicals. Contrary to other reports which deal with cotton saccharifying activity of holocellulase (ul-Haq et al., 2005), in this paper we have described, for the first time, the use of cotton residue as the carbon source for production of holocellulases by filamentous fungi. Further research will be directed to study the action mechanisms of these enzyme systems.

Acknowledgements

This work was funded by SEEDF, FAPDF (193.000.470/2008), FINEP, CNPq (470358/2007-6). E.X.F.F. acknowledges the receipt of research fellowship from CNPq.

References

- Andreus, J., Filho, E.X.F., Bon, E.P.S., 2008. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: Hou, C.T., Shaw, J.-F. (Eds.), *Biocatalysis and Bioenergy*. John Wiley & Sons, United States of America, pp. 197–229.
- Association of Official Analytical Chemists, 1995. *Official Methods of Analysis of the Association of the Analytical Chemists*, sixteenth ed., Washington.
- Banik, S.P., Pal, S., Ghorai, S., Chowdhury, S., Khowala, S., 2009. Interference of sugars in the Coomassie blue G dye binding assay of proteins. *Analytical Biochemistry* 386, 113–115.
- Blum, H., Beier, H., Gross, B., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Cali, J.P., Bowers Jr., G.N., Young, D.S., 1973. A referee method for the determination of total calcium in serum. *Clinical Chemistry* 19, 1208–1213.
- Considine, P.J., Coughlan, M.P., 1989. Production of carbohydrate-hydrolysing enzyme blends by solid-state fermentation. In: InCoughlan, M.P. (Ed.), *Enzyme Systems for Lignocellulosic Degradation*. Elsevier Applied Science, London, pp. 273–281.
- El-Nawwi, S.A., El-Kader, A.A., 1996. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. *Biomass and Bioenergy* 11, 361–364.
- Filho, E.X.F., Puls, J., Coughlan, M.P., 1993a. Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- β -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 535–540.
- Filho, E.X.F., Puls, J., Coughlan, M.P., 1993b. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology* 11, 171–180.
- Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., Xi, Y., 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology* 99, 7623–7629.
- Gomes, J., Esterbauer, H., Gomes, I., Steiner, W., 1989. Screening of some wild fungal isolates for cellulolytic activities. *Letters in Applied Microbiology* 8, 67–70.
- Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Hilda, A., 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46, 119–126.
- Kirk, T.K., Obst, J.R., 1988. Lignin determination. *Methods in Enzymology* 161, 87–101.
- Klich, M.A., 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultuur, The Netherlands.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., 1976. Measurements of saccharifying cellulase. *Biotechnology & Bioengineering Symposium* 6, 21–33.
- Marshall, T., Williams, K.M., 2004. Interference in the coomassie brilliant blue and pyrogallol red protein dye-binding assays is increased by the addition of sodium dodecyl sulfate to the dye reagents. *Analytical Biochemistry* 331, 255–259.
- Martin, N., Souza, S.R., Silva, R., Gomes, E., 2004. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47, 813–819.
- Medeiros, R.G., Soffner, M.L.A.P., Thomé, J.A., Cacaís, A.O.G., Estelles, R.S., Salles, B.C., Ferreira, H.M., Lucena Neto, S.A., Silva Jr., F.G., Filho, E.X.F., 2000. The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate. *Biotechnology Progress* 16, 522–524.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Gírio, F.M., Bon, E.P.S., Amaral-Collaco, M.T., 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 549–555.
- Neklyudov, A.D., Fedotov, G.N., Ivankin, A.N., 2006. Intensification of composting processes by aerobic microorganisms: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44, 9–23.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. *International Microbiology* 5, 53–63.
- Pitt, J.I., 2000. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Food Science Australia, North Ryde NSW.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Chapman and Hall, Cambridge.
- Pushalkar, S., Rao, K.K., 1998. Ethanol fermentation by a cellulolytic fungus *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 289–291.
- Roig, B., Gonzalez, C., Thomas, O., 1999. Simple UV/UV – visible method for nitrogen and phosphorous measurement in waste water. *Talanta* 50, 751–758.

- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Fitenborg, O., 2000. Introduction to Food and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Baarn/Delft, The Netherlands.
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6, 24–25.
- Tunick, M.H., 2005. Selection of techniques used in food analysis. In: Ötles, S. (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. CRC Press, Florida, pp. 1–15.
- Tuohy, M.G., Buckley, R.J., Griffin, T.O., Connelly, I.C., Shanley, N.A., Filho, E.X.F., Hughes, M.M., Grogan, P., Coughlan, M.P., 1989. Enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi on lignocellulosic substrates. In: Coughlan, M.P. (Ed.), *Enzyme Systems for Lignocellulosic Degradation*. Elsevier Applied Science, London, pp. 293–312.
- ul-Haq, I., Javed, M.M., Khan, T.S., Siddiq, Z., 2005. Cotton saccharifying activity of cellulases produced by co-cultures of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Research Journal of Agriculture and Biological Science* 1, 241–245.
- van Soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds. 2. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry* 46, 829–835.
- van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV: determination of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry* 50, 50–55.

Capítulo VI

Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues

Artigo publicado na Biodegration (2010)

Félix G. de Siqueira¹; Aline G. de Siqueira¹; Eliane G. de Siqueira¹; Marly A. Carvalho¹; Beatriz M. P. Peretti¹; Paula Marcela D. Jaramillo²; Ricardo S. S. Teixeira²; Eustáquio S. Dias²; Carlos R. Félix¹; Edivaldo X. Ferreira Filho¹.

¹Laboratório de Enzimologia- UnB/DF, Brasil. ²Laboratório de Tecnologia Enzimática – UFRJ/RJ, Brasil. ²Laboratório de Cogumelos Comestíveis - UFLA/MG, Brasil.

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos provenientes de resíduos agrícolas ou de processos de beneficiamento industrial são fontes de carbono para o crescimento de microrganismos e a indução de enzimas com aplicações biotecnológicas. Os resíduos lignocelulósicos podem ser obtidos de diversas fontes, tais como agricultura (colheita da soja, milho, algodão, arroz, trigo, bananeira, etc.), industriais (bagaço de cana-de-açúcar indústria sucroalcooeira, resíduo do beneficiamento do algodão, etc.) e lixo das cidades (papel, papelão, folhas e restos de podas das árvores, etc.). O crescimento dos microrganismos pode ser realizado em meio submerso (*fermentação submersa, SmF*) ou em meio sólido (*fermentação estado sólido, SSF*). O SSF simula as condições de crescimento que ocorrem na natureza, principalmente para os fungos filamentosos, especificamente os de podridão-branca, ou seja, os basidiomicetos, como os cogumelos (Pandey *et al.*, 2000). Esses fungos desenvolvem-se sobre serrapilheiras das florestas, troncos, solos e resíduos de animais

herbívoros com muita facilidade, desde que encontrem condições físico-químicas desejáveis, como umidade, temperatura e nutrientes suficientes para a proliferação micelial sobre o substrato.

Os Basidiomicetos e Ascomicetos são grupos de fungos que estão sendo investigados como fontes promissoras para a produção de enzimas lignocelulolíticas. Essas enzimas podem ser empregadas em diversos processos para a obtenção de produtos de interesse comercial e industrial, incluindo o bioetanol celulósico, que pode ser obtido a partir da liberação dos açúcares redutores fermentescíveis dos resíduos agroindustriais. Segundo Pandey *et al.* (2000), o cultivo de microrganismos em SSF é caracterizado por ser realizado em substratos sólidos como fonte de carbono e nitrogênio, com pouca presença de água ou apenas úmido e sem agitação. Mas, geralmente, SSF pode ser entendido como um processo em que substratos sólidos triturados pré-umedecidos e esterilizados são utilizados para o desenvolvimento dos microrganismos (Mitchell *et al.*, 2000). Aproximadamente 90% das enzimas produzidas industrialmente são obtidas por cultivo submerso, que utilizam microrganismos geneticamente modificados. Fazendo uso de microrganismos adaptados ao cultivo submerso, a produtividade em escala industrial neste sistema oferece insuperáveis vantagens sobre sistema SSF, quanto a logística para coleta do produto, esterilização do meio e higienização dos reatores. Por outro lado, quase todas essas enzimas podem ser produzidas em SSF por cepas selvagens dos microrganismos, com custos de produção menores que o SmF (Filer, 2001; Pandey *et al.*, 2001).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o perfil das atividades enzimáticas das holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases) dos fungos *Agaricus blazei* CS1, *Pleurotus ostreatus* (Basidiomicetos) e do *Aspergillus flavus* (Ascomiceto), quando crescidos em diferentes fontes de carbono de origem lignocelulósica, como também realizar a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e piolho-de-algodão-sujo.

A condição de cultivo na concentração de 10% e sem agitação a 28°C, ou seja, o cultivo em meio sólido, mostrou ser mais eficiente para os três fungos testados na produção das holocelulases

do que os cultivos com concentrações de 1% e 5% de substratos. O *Agaricus blazei* CS1 apresentou os resultados mais significativos de atividades de xilanase e mananase quando crescido em piolho-de-algodão na concentração, assim como para o cultivo em resíduo da colheita de milho, que também apresentou atividade relevante de xilanase.

A maior atividade de pectinase de *A. blazei* CS1 foi obtida quando crescido em bagaço de cana de 5%, enquanto as maiores atividades de CMCase e FPase foram obtidas por meio do crescimento em piolho-de-algodão. *Pleurotus ostreatus* mostrou, em bagaço de cana com 5% de concentração, o resultado mais significativo para atividade de xilanase, porém, a concentração de 10% apresentou também resultados relevantes para xilanase e mananase, apresentando uma eficiência na produção das hemicelulases neste substrato nos cultivos com maiores concentrações. A atividade de pectinase no cultivo em bagaço de cana foi o substrato que obteve melhor resultado no cultivo sólido (10%).

Para as atividades de celulasas, os resultados mais significativos ficaram com engajo 10% e piolho-de-algodão 10%, tanto para CMCases e FPases. O *Aspergillus flavus* mostrou, nos cultivos em engajo e resíduos da colheita de milho na concentração de 10%, os resultados mais significativos para holocelulasas, principalmente para xilanase, mananase e pectinase. Para pectinase, o *A. flavus* mostrou resultados significativos em todos os cultivos, principalmente na concentração de 10%, sendo os resíduos da colheita do milho o cultivo com o melhor desempenho dentre os substratos testados.

As atividades de CMCase e FPase tiveram os melhores resultados no engajo e resíduos da colheita de milho, na concentração de 10%. Na hidrólise enzimática, quase todos os tratamentos tiveram, em 12 horas, tempo suficiente para liberar a maioria dos açúcares redutores totais. O tratamento com *A. flavus* (resíduos de milho na concentração de 10%) foi o que apresentou o resultado mais significativo na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado. *A. blazei* (piolho de algodão, na concentração de 10%) e *A. flavus* (engajo de bananeira, na concentração de 10%)

apresentaram, após 48 horas de hidrólise, aumento na liberação de açúcares redutores totais, para o bagaço de cana, porém, esse comportamento também foi observado na hidrólise de piolho-de-algodão-sujo pré-tratado. Contudo, os tratamentos que apresentaram melhores resultados na hidrólise do piolho-de-algodão-sujo pré-tratado com 12 horas de hidrólise foram *A. blazei* (piolho-de-algodão-sujo, na concentração 10%) e *P. ostreatus* (engajo de bananeira na concentração de 10%).

Quanto à eficiência dos *pools* enzimáticos na hidrólise dos dois materiais lignocelulósicas, observou-se que, no bagaço de cana-de-açúcar, ocorreu maior liberação de açúcares redutores do que em piolho-de-algodão-sujo. Em 12 horas de hidrólise, o dobro de açúcares redutores havia sido liberado em bagaço de cana em relação ao piolho-de-algodão-sujo.

REFERÊNCIAS

- FILER, K. The newest old way to make enzymes. **Feed Mix**, v. n. 9, pp. 27–29, 2001.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II - Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, Oxford-UK, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LEO, J.A.R.; NIGAM, P. **Solid-state Fermentation in Biotechnology**, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, 2001, p. 221.

Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues

Félix Gonçalves de Siqueira · Aline Gonçalves de Siqueira · Eliane Gonçalves de Siqueira · Marly Azevedo Carvalho · Beatriz Magalhães Pinto Peretti · Paula Marcela Duque Jaramillo · Ricardo Sposina Sobral Teixeira · Eustáquio Souza Dias · Carlos Roberto Félix · Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Received: 25 September 2009 / Accepted: 25 February 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract *Agaricus brasiliensis* CS1, *Pleurotus ostreatus* H1 and *Aspergillus flavus* produced holocellulases when grown in solid and submerged liquid cultures containing agro-industrial residues, including sugar cane bagasse and dirty cotton residue, as substrates. These isolates proved to be efficient producers of holocellulases under the conditions used in this screening. Bromatological analysis of agro-industrial residues showed differences in protein, fiber, hemicellulose, cellulose and lignin content. Maximal holocellulase activity (hemicellulase, cellulase and pectinase) was obtained using solid-state cultivation with 10% substrate concentration. In this case, remarkably high levels of xylanase and polygalacturonase activity (4,008 and 4,548 IU/l, respectively) were produced by *A. flavus* when grown in

media containing corn residue, followed by *P. ostreatus* H1 with IU/l values of 1,900 and 3,965 when cultivated on 5% and 10% sugar cane bagasse, respectively. *A. brasiliensis* CS1 showed the highest reducing sugar yield (11.640 mg/ml) when grown on medium containing sugar cane bagasse. *A. brasiliensis* was also the most efficient producer of protein, except when cultivated on dirty cotton residue, which induced maximal production in *A. flavus*. Comparison of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse and dirty cotton residue by crude extracts of *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* showed that the best reducing sugar yield was achieved using sugar cane bagasse as a substrate.

Keywords *Agaricus brasiliensis* CS1 · Agro-industrial residue · Holocellulose · Holocellulase · Xylanase · Pectinase

F. G. de Siqueira · A. G. de Siqueira ·
E. G. de Siqueira · M. A. Carvalho ·
B. M. P. Peretti · C. R. Félix · E. X. F. Filho (✉)
Laboratory of Enzymology, Department of Cellular
Biology, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal
CEP 70910-900, Brazil
e-mail: eximenes@unb.br

P. M. D. Jaramillo · E. S. Dias
Laboratory of Edible and Medicinal Mushroom, Federal
University of Lavras, Lavras, Minas Gerais CEP 37200-
000, Brazil

R. S. S. Teixeira
Laboratory of Enzymatic Technology, Federal University
of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21949-900, Brazil

Introduction

The capacity of a particular microorganism to grow in lignocellulosic substrates is directly related to its production of a spectrum of enzyme systems that act synergistically to deconstruct plant cell walls by depolymerizing substrates of different complexities. Within this context, a broad range of enzymes is necessary for the degradation of the carbohydrate

portion of lignocellulose (holocellulose) (Andreas et al. 2008; Kumar et al. 2008). Among the enzymes showing activity against holocellulose, xylanase, mannanase, polygalacturonase, endoglucanase and exoglucanase play important roles in cleaving its polysaccharide backbone (Salles et al. 2007). Consequently, a great deal of effort is being devoted to the characterization of enzymes that break down holocellulose. Agro-industrial residues, including sugar cane bagasse and dirty cotton residues, contain lignocellulose material available for use as sources of fuels, chemical feedstocks, foods and livestock feeds (Kumar et al. 2008). Dirty cotton residue is a fraction collected from different cotton spinning and yarn forming textile industries that contains very short fibers, husks and other dark matter (Siqueira et al. 2010). In recent years, the use of such materials has also become an alternative approach for the production of holocellulases. Solid-state cultivation (SSC) is defined as the controlled growth of microorganisms on a moist solid substrate in the absence of free water (Cen and Xia 1999). It has shown some advantages over submerged liquid cultivation (SLC), including lower costs (simpler equipment, lower energy consumption and capital investment), improved enzyme stability and the production of enzymes with higher specific activities (Tuohy et al. 1989). On the other hand, SLC offers reproducible enzyme activities from batch to batch, ease of contamination control and is less labor-intensive (Cen and Xia 1999). However, the production costs of SLC are relatively high due to an inherently greater energy requirement, expensive medium composition and low enzyme concentrations. Basidiomycetes, the most conspicuous group of fungi in the environment, contains a number of edible and/or medicinal varieties (Erden et al. 2009). *Agaricus brasiliensis* CS1 is a medicinal mushroom native to Brazil, while *Pleurotus ostreatus* H1, commonly known as the oyster mushroom, is cultivated around the world for food. *Aspergillus flavus* is an imperfect ascomycete that does not produce ascospores. It grows rapidly as a haploid filamentous fungus on solid or liquid media under a variety of nutritional conditions. The focus of the present work was to compare the production of holocellulose-degrading enzymes by three fungus species with different anatomical and physiological characteristics when grown on different carbon sources (agro-industrial

residues) using SSC and SLC as well as to evaluate the enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse and dirty cotton.

Materials and methods

Chemicals

All substrates were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dirty cotton residues were received from Hantex Resíduos Têxteis Ltda (Gaspar, SC, Brazil), a company that collects cotton residues from different spinning and yarn forming textile industries, mixes these residues and subjects them to further purification. Banana stems, sugar cane bagasse and corn and soybean residues were from a local source.

All experiments included five replicates and data are reported as averages with standard deviations indicated.

Residue pretreatment

Sugar cane bagasse and dirty cotton residue were thoroughly washed with tap water and autoclaved at 121°C for 2 h. After autoclaving, they were dried at 65°C for 48 h and ground to form a homogeneous blend. A fine powder was obtained and used as a substrate for enzymatic hydrolysis experiments.

Enzyme production

A. brasiliensis CS1 and *P. ostreatus* H1 were kindly provided by the Edible and Medicinal Mushroom Laboratory, Federal University of Lavras, Brazil and Dr. Arailde Urben, National Research Centre for Genetic Resources and Biotechnology, Cenargen, Brazil, respectively. *A. flavus* was obtained from the fungus culture collection of the Enzymology Laboratory, University of Brasília, Brazil. All fungi were maintained in PDA medium (2.0% potato broth, 2.0% dextrose and 2.0% agar) at 28°C and cultured on five sources of lignocellulosic substrates (sugar cane bagasse, banana stems, dirty cotton, corn and soybean residues) at three concentrations. The substrate concentrations for SLC were 1% (w/v) and 5% (w/v),

while SSC was carried out at a substrate concentration of 10% (w/v) (Tuohy et al. 1989). The basal culture medium was as follows: 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% CaCl_2 , 0.001% $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0007% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0004% ZnCl_2 , 0.0001% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone at pH 5.5. An aliquot (2.5 ml) of an *A. flavus* spore suspension (10^8 spores/ml) was inoculated in Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid medium and agro-industrial residue as a carbon source. Cultures were grown for 5 days at 28°C without agitation. Cultures of *A. brasiliensis* CS1 and *P. ostreatus* H1 were grown for during 15 days using the conditions described above. Three cylindrical pieces (7 mm) of mycelium were placed in the submerged liquid and solid-state media. After the growth procedure, 100 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH, 5.0) was added for 1 h at 28°C and the media were then passed through filter paper (Whatman No. 1). The resulting supernatants, hereafter called crude extracts, were used for determination of holocellulase activities and extracellular protein concentration.

Enzyme assays

Endoglucanase, xylanase, polygalacturonase and mannanase activities were determined by mixing 50 μl of enzyme sample with 100 μl of 1% w/v substrate (carboxymethyl cellulose, oat spelt xylan and pectin respectively) or 0.5% w/v substrate (galactomannan) at 50°C for 30 min. FPase activity (Mandels et al. 1976) was determined using 150 μl of enzyme with filter paper (Whatman No. 1) as a substrate at 50°C for 1 h. Avicelase activity was determined by mixing a microcrystalline cellulose suspension substrate (1% w/v) (50 μl) and 100 μl of enzyme at 50°C for 2 h. The amount of reducing sugar released was measured using dinitrosalicylic reagent (Miller 1959). Activity was expressed as μmol reducing sugar formed per min per liter of enzyme solution, i.e., as IU/l. Glucose, xylose, mannose and galacturonic acid were used as standards. Protein concentration was determined by Bradford assay (1976) using bovine serum albumin as a standard after trichloroacetate (final concentration 5%) precipitation and redissolution. Glucose content was measured by the glucose oxidase method (Trinder 1969).

Bromatological analysis of agro-industrial residues

All residues were dried at 60°C for 48 h for bromatological analysis. Samples were then ground, kept in polyethylene bags, tied and stored at 20–25°C. Total protein content was determined using the micro Kjeldahl method (AOAC 1995). A factor of 6.25 was used to convert total nitrogen to crude protein. Fat content was measured by Soxhlet extraction with ethylic ether (AOAC 1995) and ash content was measured by the gravimetric method at 550°C (AOAC 1995). Crude fiber content was evaluated by AOAC methodology (1995). Lignin, insoluble fiber in acid detergent, insoluble fiber in neutral detergent, humidity, hemicellulose, cellulose and dry matter contents were determined as described elsewhere (Gomide and Demuner 1986; Silva and Queiroz 2002; van Soest 1963; van Soest and Wine 1967). Calcium determination was performed by atomic absorption spectrophotometry at 422.7 nm (Cali et al. 1973). Phosphorus quantification was performed using a UV-visible spectrophotometer at 420 nm (Roig et al. 1999).

Enzymatic hydrolysis

Hydrolysis of sugar cane bagasse and dirty cotton residues was performed as follows: 25 ml of distilled water was added to 1 g of pretreated substrate in 125 ml Erlenmeyer flasks. The mixture was then autoclaved at 121°C for 1 h and the contents of the flasks were incubated with 25 ml of enzyme solutions (crude extract samples of *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* grown using solid state cultivation) for 72 h at 50°C. At various time points, aliquots (1 ml) were withdrawn for reducing sugar, total protein and xylanase and endoglucanase activity assays.

Results and discussion

In this study, fungi were grown in solid state and submerged liquid cultures supplemented with five agro-industrial residues and were subjected to experiments including bromatological analysis. Previous work (Siqueira et al. 2010) has shown that cotton residues and banana stems represent a rich source of

macro- and micronutrients. In this study, corn and dirty cotton residues were found to be particularly rich in cellulose, followed by banana stems, soybean residue and sugar cane bagasse (Table 1). Bromatological analysis also revealed that the highest hemicellulose contents were present in banana stems and sugar cane bagasse. Soybean residue and banana stems contained the highest lignin content. On the other hand, the lowest levels of lignin were detected in corn residue and sugar cane bagasse, respectively. Micro-nutrient and fiber contents were higher in dirty cotton residue. When comparing Kjeldahl nitrogen contents, we made the simplifying assumption that all nitrogen is protein-derived. On this basis, we noted that protein and fat contents were superior in soybean residue and banana stems, respectively. In addition, we also noted a higher amount of soluble carbohydrate in sugar cane bagasse.

The basidiomycetes *A. brasiliensis* CS1 and *P. ostreatus* H1 and the ascomycete *A. flavus* were subjected to studies involving holocellulase production under SSC and SLC. For comparative purposes, SLC was performed without shaking to simulate SSC conditions. All fungus strains produced holocellulases with variable activity levels. Holocellulase production was more relevant when the fungi were grown under SSC using different agro-industrial residues (Tables 2, 3, 4). The performance of *A. brasiliensis* CS1 is displayed in Table 2. Dirty cotton

residue (10%) was the best carbon source for most holocellulase activities, including xylanase, mannanase, endoglucanase and FPase, with the exception of pectinase activity (polygalacturonase), which was higher when grown with sugar cane bagasse (5%). It should be noted that the highest activity, 1,349 IU/l, was observed for xylanase. Avicelase activity was detected at low levels in all carbon sources, corn residue being the best inducer. The influence of carbon source on holocellulase production by *P. ostreatus* H1 was also investigated (Table 3). Maximal xylanase activity, 1,900 and 1,220 IU/l, was observed when *P. ostreatus* H1 was grown on sugar cane bagasse at concentrations of 5% and 10%, respectively. Mannanase activity reached its highest value (197 IU/l) using sugar cane bagasse (10%) as a carbon source. It is important to note that sugar cane bagasse induced the highest levels of polygalacturonase activity, while banana stems were the best inducer of endoglucanase and FPase activities. The highest avicelase activity was achieved by cultivating the fungus on dirty cotton residue. *A. flavus* showed markedly elevated levels of polygalacturonase activity (Table 4). In this case, the highest activity level was found to be 4,548 IU/l following cultivation on corn residue (10%). According to Mellon et al. (2007), *A. flavus* produces high yields of pectinase when grown in different carbon sources. Banana stems (10%) induced the highest xylanase, endoglucanase and FPase activities,

Table 1 Bromatological analysis of agro-industrial residues

Bromatological analysis	Sugar cane bagasse	Banana stem	Corn residue	Dirty cotton residue	Soybean residue
Ash (%)	0.8	7.8	3.4	4.6	3.6
Dry matter (%)	92.4	91.6	90.8	91.5	90.8
Crude protein (%)	3.1	8.6	3.6	6.9	7.5
Fat (%)	1.2	2.3	1.1	1.8	2.5
FDA (%)	39.7	62.3	80.2	72.0	61.3
FDN (%)	55.9	79.8	80.8	81.8	71.7
Soluble carbohydrate (%)	64.7	36.7	50.7	30.0	41.5
kcalorie (kcal g*100 g)	281.7	202.0	226.7	163.7	218.5
Cellulose (%)	34.6	52.9	75.9	65.7	51.9
Hemicellulose (%)	16.2	17.4	0.6	9.8	10.4
Lignin (%)	5.1	9.4	4.3	6.3	9.4
Calcium (%)	0.02	0.98	0.16	1.01	0.78
Phosphorous (%)	0.03	0.09	0.06	0.14	0.08

FDA Insoluble fiber in acid detergent, FDN Insoluble fiber in neutral detergent

All the experiments included five replicates

Table 2 Determination of holocellulase activities in crude extracts of *Agaricus brasiliensis* CS1 grown in different concentrations of agro-industrial residues

Carbon source and concentration	Hemicellulase and pectinase activities			Cellulase activity		
	IU/l					
	Xylanase	Mannanase	Polygalacturonase	Endoglucanase	FPase	Avicelase
Banana stem (1%)	11.3 ± 6.8	9.0 ± 2.4	25.9 ± 3.1	12.4 ± 3.7	77.7 ± 3.8	1.0 ± 0.3
Banana stem (5%)	8.6 ± 3.0	3.0 ± 1.6	35.4 ± 5.0	45.5 ± 4.9	91.4 ± 3.5	1.0 ± 0.7
Banana stem (10%)	29.2 ± 9.4	6.0 ± 1.6	37.0 ± 3.6	97.9 ± 7.4	65.9 ± 4.2	1.0 ± 0.4
Corn residue (1%)	35.4 ± 22.8	2.0 ± 1.7	8.4 ± 38.7	37.5 ± 18.6	103.9 ± 10.8	1.0 ± 0.8
Corn residue (5%)	31.0 ± 15.5	6.0 ± 1.5	52.2 ± 26.6	86.0 ± 25.8	63.3 ± 7.2	1.0 ± 0.5
Corn residue (10%)	562.7 ± 42.6	7.0 ± 2.4	67.3 ± 43.9	190.8 ± 11.5	107.0 ± 9.2	26.0 ± 2.6
Soybean residue (1%)	9.5 ± 11.6	40.5 ± 8.5	7 ± 2.7	62.0 ± 15.4	80.7 ± 13.1	2.1 ± 1.0
Soybean residue (5%)	17.5 ± 14.6	195.8 ± 18.5	6 ± 3.1	93.3 ± 12.2	61.9 ± 3.2	0 ± 0.9
Soybean residue (10%)	377.7 ± 17.8	7.0 ± 1.2	7.0 ± 1.9	115.4 ± 28.1	59.8 ± 7.0	0 ± 0.7
Sugar cane bagasse (1%)	109.4 ± 9.0	68.6 ± 5.9	283.3 ± 13.7	64.4 ± 3.7	5.0 ± 2.6	5.7 ± 0.7
Sugar cane bagasse (5%)	148.6 ± 13.8	60.7 ± 9.7	451.3 ± 13.1	110.8 ± 15.0	13.4 ± 1.4	19.1 ± 1.4
Sugar cane bagasse (10%)	183.6 ± 19.7	86.6 ± 10.9	155.6 ± 14.1	101.6 ± 11.1	15.1 ± 4.9	15.7 ± 2.5
Dirty cotton residue (1%)	38.1 ± 21.3	8 ± 2.7	7.0 ± 4.4	6.9 ± 2.0	46.1 ± 5.9	1.4 ± 0.5
Dirty cotton residue (5%)	304.0 ± 37.8	196.3 ± 19.7	73.8 ± 60.3	96.0 ± 11.6	111.1 ± 6.4	1.2 ± 0.5
Dirty cotton residue (10%)	1,348.8 ± 99.9	206.4 ± 53.9	219.0 ± 78.4	315.3 ± 30.7	180.4 ± 8.1	5.7 ± 0.9

Table 3 Holocellulase activities in crude extracts of *Pleurotus ostreatus* H1 grown in different concentrations of agro-industrial residues

Carbon source and concentration	Hemicellulase and pectinase activities			Cellulase activity		
	IU/l					
	Xylanase	Mannanase	Polygalacturonase	Endoglucanase	FPase	Avicelase
Banana stem (1%)	14.4 ± 1.4	9.0 ± 3.0	4.0 ± 1.4	22.6 ± 0.0	1.6 ± 4.2	4.0 ± 1.6
Banana stem (5%)	228.4 ± 5.0	30.2 ± 5.2	148.4 ± 35.8	62.1 ± 7.6	73.2 ± 7.6	50.2 ± 5.9
Banana stem (10%)	1,072.3 ± 8.4	67.5 ± 8.5	161.9 ± 15.5	325.3 ± 11.5	142.2 ± 3.0	56.7 ± 2.0
Corn residue (1%)	40.1 ± 1.2	38.4 ± 2.8	8.3 ± 3.6	29.0 ± 5.4	4.4 ± 2.3	5.1 ± 1.3
Corn residue (5%)	118.1 ± 6.7	27.1 ± 5.2	7.9 ± 2.2	40.5 ± 2.7	16.8 ± 2.6	7.0 ± 2.3
Corn residue (10%)	21.6 ± 2.8	24.0 ± 2.1	6.3 ± 1.6	24.8 ± 2.0	2.0 ± 5.2	5.3 ± 0.3
Soybean residue (1%)	49.6 ± 4.9	16.7 ± 0.1	1.8 ± 1.2	14.0 ± 1.2	11.1 ± 7.6	4.2 ± 0.6
Soybean residue (5%)	85.8 ± 6.7	17.5 ± 2.1	8.8 ± 3.2	22.4 ± 2.9	31.7 ± 1.9	7.1 ± 0.7
Soybean residue (10%)	170.8 ± 2.7	45.8 ± 4.2	119.4 ± 16.2	40.4 ± 3.1	23.3 ± 3.7	6.7 ± 0.6
Sugar cane bagasse (1%)	721.4 ± 11.4	26.0 ± 6.2	801.5 ± 20.1	17.1 ± 2.0	3.2 ± 3.6	4.0 ± 1.2
Sugar cane bagasse (5%)	1,900 ± 42.5	79.0 ± 6.1	3,035.6 ± 42.3	142.0 ± 13.2	94.3 ± 6.4	55.2 ± 8.4
Sugar cane bagasse (10%)	1,226.0 ± 80.2	196.5 ± 25.0	3,965.4 ± 105.3	138.6 ± 9.6	54.3 ± 1.3	74.9 ± 4.5
Dirty cotton residue (1%)	252.5 ± 13.1	30.7 ± 3.5	172.0 ± 8.2	82.6 ± 4.9	1.5 ± 0.8	20.1 ± 1.2
Dirty cotton residue (5%)	275.9 ± 9.1	40.8 ± 4.4	243.1 ± 19.8	129.1 ± 7.4	94.5 ± 5.2	105.9 ± 12.0
Dirty cotton residue (10%)	684.5 ± 8.1	54.1 ± 5.0	216.4 ± 17.7	240. ± 6.4	102.35.1	94.6 ± 5.9

Table 4 Holocellulase activities in crude extracts of *Aspergillus flavus* grown in different concentrations of agro-industrial residues

Carbon source and concentration	Hemicellulase and pectinase activities			Cellulase activity		
	IU/l					
	Xylanase	Mannanase	Polygalacturonase	Endoglucanase	FPase	Avicelases
Banana stem (1%)	218.1 ± 4.1	14.2 ± 0.6	263.0 ± 21.0	22.1 ± 1.9	11.2 ± 1.9	3.1 ± 1.5
Banana stem (5%)	279.6 ± 18.0	63.5 ± 2.5	295.1 ± 13.7	34.0 ± 2.5	119.7 ± 9.7	108.3 ± 7.5
Banana stem (10%)	3,346.9 ± 37.2	497.2 ± 13.6	2,547.7 ± 75.7	439.9 ± 4.4	197.7 ± 16.2	52.7 ± 6.2
Corn residue (1%)	585.3 ± 12.1	23.9 ± 4.6	257.9 ± 13.5	37.1 ± 3.5	30.0 ± 2.3	5.7 ± 1.4
Corn residue (5%)	707.1 ± 27.0	67.7 ± 10.1	576.1 ± 31.5	73.5 ± 7.7	91.4 ± 8.9	62.6 ± 7.3
Corn residue (10%)	4,008.0 ± 139.5	134.2 ± 12.8	4,547.6 ± 158.3	432.7 ± 11.7	199.2 ± 8.5	11.4 ± 4.9
Soybean residue (1%)	341.4 ± 14.0	102.8 ± 3.0	233.3 ± 9.5	42.8 ± 3.6	21.9 ± 6.9	4.6 ± 2.2
Soybean residue (5%)	588.4 ± 10.6	137.1 ± 14.5	249.3 ± 22.3	65.5 ± 7.8	96.2 ± 14.0	62.0 ± 4.4
Soybean residue (10%)	1,823.5 ± 68.8	228.8 ± 11.2	2,029.3 ± 44.4	91.9 ± 11.2	103.3 ± 17.0	32.7 ± 7.7
Sugar cane bagasse (1%)	402.7 ± 18.3	37.1 ± 2.6	943.1 ± 26.2	33.2 ± 5.3	1.7 ± 0.2	2.8 ± 1.9
Sugar cane bagasse (5%)	383.4 ± 16.7	42.8 ± 13.2	565.2 ± 22.4	47.4 ± 16.9	104.3 ± 11.2	2.1 ± 1.2
Sugar cane bagasse (10%)	758.3 ± 71.9	27.4 ± 12.8	3,357.6 ± 103.1	17.5 ± 8.0	36.3 ± 8.0	19.0 ± 4.2
Dirty cotton residue (1%)	276.5 ± 20.8	20.2 ± 9.1	54.5 ± 7.0	21.3 ± 8.2	27.3 ± 7.1	2.0 ± 0.8
Dirty cotton residue (5%)	538.2 ± 8.3	47.7 ± 4.2	118.1 ± 5.9	11.0 ± 6.8	65.7 ± 10.7	14.8 ± 5.4
Dirty cotton residue (10%)	1,983.2 ± 86.3	154.9 ± 19.3	2,300.2 ± 55.3	58.2 ± 8.8	103.7 ± 7.3	45.2 ± 12.6

whereas maximum mannanase and avicelase activities were obtained following cultivation on soybean residue and banana stems, respectively. Based on these results, it appears that the enzyme induction pattern depends on the nature of the substrate. *A. flavus* was the overall best producer of holocellulase activities. In comparison to *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 was a more efficient producer of holocellulase activity, producing high levels of xylanase and polygalacturonase activities. From the above results, it is clear that SSC is a more efficient procedure for production of holocellulase activities than SLC. *A. brasiliensis* CS1 showed the best reducing sugar yield (11.640 mg/ml) when cultivated with 10% sugar cane bagasse (Table 5). The highest amount of protein was observed when *A. brasiliensis* CS1 was grown with 10% banana stems.

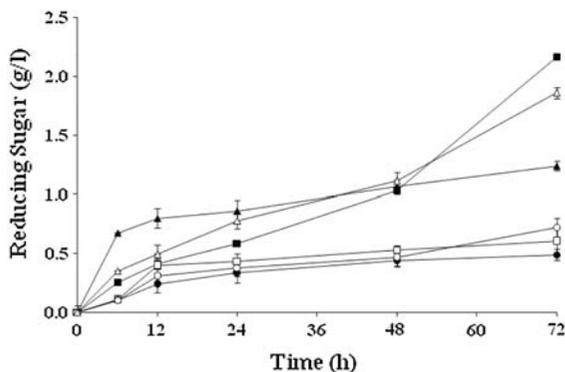
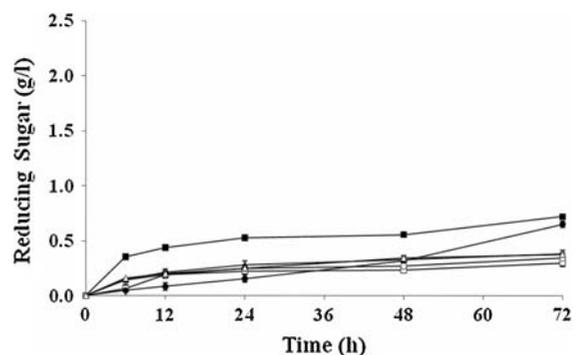
The ability of crude extracts from *A. flavus*, *A. brasiliensis* CS1 and *P. ostreatus* H1 to degrade lignocellulosic substrates was examined using pretreated sugar cane bagasse and dirty cotton residue. The crude extracts were selected according to their highest xylanase, endoglucanase and FPase activities (Tables 2, 3, 4). Therefore, six crude extracts obtained after SSC were used to determine their enzymatic potential to degrade lignocellulosic residues. In the

case of *A. brasiliensis* CS1, crude extracts were from fungi grown in media containing dirty cotton and corn residues. With respect to *P. ostreatus* H1 extracts, extracts were obtained after cultivation using banana stems and dirty cotton residue as substrates, while *A. flavus* extracts were derived from cultures using corn residue and banana stems as sources of xylanase, endoglucanase and FPase activities.

The release of reducing sugars from pretreated sugar cane bagasse and dirty cotton residues by crude enzyme samples from *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* was measured by DNS and glucose oxidase methods (Figs. 1, 2, 3, 4). Our results indicate that the highest amount of reducing sugar was released following culture with sugar cane bagasse, peaking at 72 h of incubation. At 12 h of incubation, the amount of reducing sugar detected was approximately double that of reaction mixtures containing dirty cotton residue as a substrate (Figs. 1 and 2). Figure 1 indicates that, at 12 h of incubation, the highest level of reducing sugar was observed in *A. flavus* (corn residue crude extract), while after 48 h of incubation, *A. brasiliensis* CS1 (dirty cotton residue crude extract) and *A. flavus* (banana stem crude extract) showed an increase in reducing sugar release. A similar pattern was observed when dirty cotton

Table 5 Reducing sugar and protein content in crude extracts of *Agaricus brasiliensis* CS1, *Pleurotus ostreatus* H1 and *Aspergillus flavus* grown in different concentrations of agro-industrial residues

Carbon source and concentration	Reducing sugar (mg/ml)			Protein ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>A. brasiliensis</i> CS1	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. brasiliensis</i> CS1	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. flavus</i>
Banana stem (1%)	0.697 \pm 0.069	0.028 \pm 0.003	0.119 \pm 0.013	40.2 \pm 1.0	42.3 \pm 1.1	36.0 \pm 2.9
Banana stem (5%)	2.553 \pm 0.172	0.091 \pm 0.007	0.200 \pm 0.015	200.5 \pm 6.0	89.4 \pm 4.1	68.9 \pm 1.3
Banana stem (10%)	4.997 \pm 0.099	0.579 \pm 0.010	0.830 \pm 0.042	344.4 \pm 9.0	183.8 \pm 17.4	170.7 \pm 2.6
Corn residue (1%)	0.620 \pm 0.021	0.024 \pm 0.007	0.097 \pm 0.012	10.1 \pm 1.6	57.0 \pm 4.1	31.6 \pm 1.2
Corn residue (5%)	2.148 \pm 0.009	0.454 \pm 0.013	0.683 \pm 0.020	41.4 \pm 3.8	61.7 \pm 1.4	50.5 \pm 2.1
Corn residue (10%)	6.571 \pm 0.386	0.337 \pm 0.010	0.688 \pm 0.044	84.2 \pm 1.7	17.9 \pm 8.4	85.9 \pm 2.7
Sugar cane bagasse (1%)	2.080 \pm 0.221	0.165 \pm 0.013	0.325 \pm 0.015	5.4 \pm 0.6	36.0 \pm 2.5	24.6 \pm 1.9
Sugar cane bagasse (5%)	9.396 \pm 0.337	2.129 \pm 0.034	1.883 \pm 0.050	34.1 \pm 3.1	38.2 \pm 1.7	12.5 \pm 0.8
Sugar cane bagasse (10%)	11.640 \pm 0.199	2.330 \pm 0.034	2.642 \pm 0.036	54.3 \pm 8.8	47.5 \pm 6.4	11.0 \pm 3.2
Soybean residue (1%)	0.537 \pm 0.027	0.021 \pm 0.003	0.108 \pm 0.002	7.2 \pm 1.0	34.6 \pm 6.9	35.4 \pm 4.0
Soybean residue (5%)	1.817 \pm 0.166	0.169 \pm 0.010	0.425 \pm 0.044	56.7 \pm 2.7	60.4 \pm 2.0	53.1 \pm 6.4
Soybean residue (10%)	4.670 \pm 0.284	0.428 \pm 0.027	0.763 \pm 0.032	104.6 \pm 8.6	61.0 \pm 2.1	90.6 \pm 10.1
Dirty cotton residue (1%)	0.433 \pm 0.045	0.078 \pm 0.000	0.131 \pm 0.016	4.8 \pm 0.3	44.0 \pm 4.0	34.1 \pm 3.6
Dirty cotton residue (5%)	1.989 \pm 0.229	0.196 \pm 0.017	0.420 \pm 0.027	45.7 \pm 1.6	73.1 \pm 5.8	53.9 \pm 1.9
Dirty cotton residue (10%)	4.622 \pm 0.540	0.347 \pm 0.013	0.592 \pm 0.041	56.6 \pm 1.7	74.5 \pm 3.6	95.5 \pm 8.5

**Fig. 1** Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse measured by DNS. Dirty cotton residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (filled square); corn residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (open square); banana stem crude extract of *P. ostreatus* H1 (filled circle); dirty cotton residue crude extract of *P. ostreatus* H1 (open circle); corn residue crude extract of *A. flavus* (filled triangle); banana stem crude extract of *A. flavus* (open triangle)**Fig. 2** Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of dirty cotton residue measured by DNS. Dirty cotton residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (filled square); corn residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (open square); banana stem crude extract of *P. ostreatus* H1 (filled circle); dirty cotton residue crude extract of *P. ostreatus* H1 (open circle); corn residue crude extract of *A. flavus* (filled triangle); banana stem crude extract of *A. flavus* (open triangle)

residue was used as the substrate (Fig. 2). However, in this case *A. flavus* (banana stem crude extract) was replaced by *P. ostreatus* H1 (banana stem crude extract). The results displayed in Figs. 3 and 4 show that maximal glucose release was detected in reaction mixtures containing *A. brasiliensis* CS1 (dirty cotton

residue crude extract) and *A. flavus* (banana stem crude extract), followed by *A. flavus* (corn residue crude extract). The best results for dirty cotton residue hydrolysis were achieved with *A. brasiliensis* CS1 (dirty cotton and corn residue crude extracts) (Fig. 4). In addition to hydrolysis experiments, at three time periods, aliquots were withdrawn and

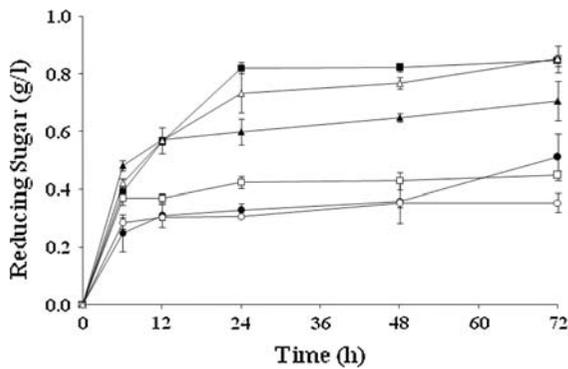


Fig. 3 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse measured by the glucose oxidase method. Dirty cotton residue crude extract of *A. brasiliensis* (filled square); corn residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (open square); banana stem crude extract of *P. ostreatus* H1 (filled circle); dirty cotton residue crude extract of *P. ostreatus* H1 (open circle); corn residue crude extract of *A. flavus* (filled triangle); banana stem crude extract of *A. flavus* (open triangle)

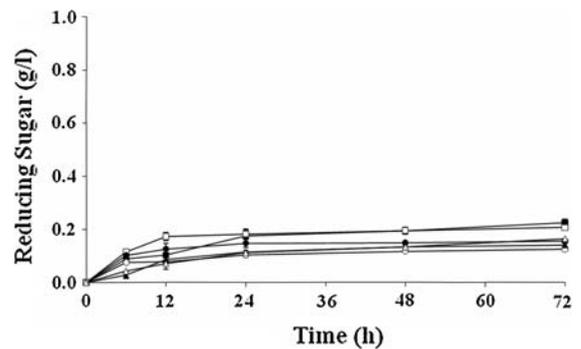


Fig. 4 Production of reducing sugar by enzymatic hydrolysis of dirty cotton residue measured by the glucose oxidase method. Dirty cotton residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (filled square); corn residue crude extract of *A. brasiliensis* CS1 (open square); banana stem crude extract of *P. ostreatus* H1 (filled circle); dirty cotton residue crude extract of *P. ostreatus* H1 (open circle); corn residue crude extract of *A. flavus* (filled triangle); banana stem crude extract of *A. flavus* (open triangle)

Table 6 Xylanase and endoglucanase activities in crude extracts of *Agaricus brasiliensis* CS1, *Pleurotus ostreatus* H1 and *Aspergillus flavus* after incubation with pretreated sugar cane bagasse and dirty cotton residue

Incubation mixture	Xylanase			Endoglucanase		
	IU/l					
	0 h	24 h	72 h	0 h	24 h	72 h
<i>A. brasiliensis</i> ^a + SCB	1,339.2 ± 12.1	618.2 ± 9.4	494.5 ± 25.0	339.5 ± 1.5	80.8 ± 16.7	44.4 ± 8.3
<i>A. brasiliensis</i> ^a + DCR	961.3 ± 25.2	457.2 ± 1.5	373.4 ± 7.2	102.2 ± 5.2	73.3 ± 10.2	64.3 ± 17.2
<i>A. brasiliensis</i> ^b + SCB	985.5 ± 38.8	607.3 ± 29.9	310.6 ± 38.8	169.2 ± 18.3	120.1 ± 7.1	40.4 ± 33.3
<i>A. brasiliensis</i> ^b + DCR	699.7 ± 29.5	615.5 ± 23.2	473.9 ± 43.4	152.4 ± 18.1	85.2 ± 10.3	65.2 ± 33.9
<i>P.ostreatus</i> ^c + SCB	1,048.4 ± 33.4	573.5 ± 29.4	504.3 ± 58.9	329.6 ± 17.4	75.1 ± 19.4	10.1 ± 13.5
<i>P.ostreatus</i> ^c + DCR	564.2 ± 47.5	381.4 ± 16.1	379.4 ± 26.5	139.8 ± 29.9	50.3 ± 8.2	35.4 ± 12.1
<i>P.ostreatus</i> ^a + SCB	627.5 ± 35.2	391.4 ± 41.3	396.0 ± 51.3	252.1 ± 21.1	93.4 ± 14.2	40.4 ± 9.4
<i>P.ostreatus</i> ^a + DCR	333.6 ± 40.3	432.7 ± 22.4	324.3 ± 11.7	61.8 ± 14.2	5.4 ± 3.1	3.3 ± 13.2
<i>A.flavus</i> ^b + SCB	3,320.9 ± 73.5	2,192.3 ± 53.4	1,803.6 ± 106.7	427.7 ± 31.4	221.8 ± 36.5	100.9 ± 9.9
<i>A.flavus</i> ^b + DCR	3,136.3 ± 59.5	1,974.4 ± 39.9	1,731.4 ± 29.5	119.2 ± 28.8	138.4 ± 11.4	56.4 ± 3.3
<i>A.flavus</i> ^c + SCB	3,970.7 ± 59.5	1,841.1 ± 131.4	1,762.0 ± 121.3	450.1 ± 26.1	184.5 ± 40.9	147.3 ± 35.7
<i>A. flavus</i> ^c + DCR	2,515.6 ± 56.1	1,986.5 ± 28.7	1,867.3 ± 86.1	186.0 ± 6.3	188.0 ± 11.2	152.2 ± 13.1

SCB Sugar cane bagasse, DCR Dirty cotton residue

^a Dirty cotton residue crude extract

^b Corn residue crude extract

^c Banana stem crude extract

residual xylanase and endoglucanase activities were determined under standard conditions (Table 6). The incubation mixture containing *A. flavus* crude extract showed the highest yields of xylanase and

endoglucanase activities over an interval of 0-72 h. Another line of evidence for enzyme adsorption was the observed decrease in protein content along the hydrolysis time course. However, we cannot discard

the fact that increased reducing sugar concentration could be the primary cause of inhibition. We observed a decrease in enzyme activities along the incubation period, suggestive of enzyme adsorption on both lignocellulosic substrates. The exact extent and mechanism of holocellulase adsorption has to do with the presence of highly ordered structures that represent the rate-limiting step in the conversion of holocellulose to soluble products (Zhang et al. 2006). Thus, there appears to be a strong correlation between holocellulose accessibility and the degree of holocellulase adsorption. Indeed, both parameters are known to contribute to conversion rates and yields of lignocellulosic structures in plant cell walls (Kristensen et al. 2009).

Conclusions

Intensive research over the last 30 years has led to the identification, isolation and growth of filamentous fungi that are able of producing a consortium of enzyme activities, including cellulases, hemicellulases and pectinases (Sanchez 2009). *A. brasiliensis* CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* produced several holocellulase enzymes when grown in solid and submerged liquid cultures on agro-industrial residue-based media. It appears that holocellulase production was influenced by the type of substrate used. Of the holocellulases examined, remarkably high levels of xylanase and pectinase activities were produced by *A. flavus*, followed by *P. ostreatus* H1. Cultivation by SSC produced the best holocellulase activity yields. Further studies are necessary to determine the role of the purified enzyme systems on the hydrolysis of holocellulose, particularly the roles of xylanase and pectinase.

Acknowledgements This work was funded by the Department of Education of Federal District (Brazil), the Foundation for Research Support of the Federal District (Brazil, research grant number 193.000.470/2008) and the Brazilian National Research Council (research grant number 470358/2007-6). E.X.F.F. acknowledges the receipt of research fellowship from Brazilian National Research Council.

References

- Andreus J, Filho EXF, Bon EPS (2008) Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: Hou CT, Shaw J-F (eds) Biocatalysis and bioenergy. Wiley, United States of America, pp 197–229
- Association of Official Analytical Chemists (1995) Official methods of analysis of the association of the analytical chemists. 16th ed. Washington
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cali JP, Bowers GN Jr, Young DS (1973) A Referee method for the determination of total calcium in serum. *Clin Chem* 19:1208–1213
- Cen P, Xia L (1999) Production of cellulose by solid-state fermentation. *Adv Biochem Eng* 65:70–92
- Erden E, Ucar MC, Gezer T, Pazarlioglu NK (2009) Screening for lignolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. *Braz J Microbiol* 40:346–353
- Gomide JL, Demuner EBJ (1986) Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. *O papel* 47:36–38
- Kristensen JB, Felby C, Jørgensen H (2009) Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biotechnol Biofuels* 2:1–10
- Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377–391
- Mandels M, Andreotti R, Roche C (1976) Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol Bioeng Sympos* 16:21–33
- Mellon JE, Cotty PJ, Dowd MK (2007) *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:497–504
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Roig B, Gonzalez C, Thomas O (1999) Simple UV/UV-visible method for nitrogen and phosphorous measurement in waste water. *Talanta* 50:751–758
- Salles BC, Te'o VSJ, Gibbs MD, Bergquist PL, Filho EXF, Ximenes EA, Nevalainen KMH (2007) Identification of two novel xylanase-encoding genes (*xyn5* and *xyn6*) from *Acrophialophora naimiana* and heterologous expression of *xyn6* in *Trichoderma reesei*. *Biochnol Lett* 29:1195–1201
- Sanchez C (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27:185–194
- Silva DJ, Queiroz AC (2002) Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. University of Viçosa, Brazil
- Siqueira FG, Siqueira EG, Jaramillo PMD, Silveira MLH, Andreus J, Couto FA, Batista LR, Filho EXF (2010) The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* 64:20–26
- Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6:24–25
- Tuohy MG, Buckley RJ, Griffin TO, Connelly IC, Shanley NA, Filho EXF, Hughes MM, Grogan P, Coughlan MP (1989) Enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi on lignocellulosic substrates. In: Coughlan MP (ed) Enzyme systems for lignocellulose degradation. Elsevier Applied Science, London, England, pp 293–312

van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analyses of fibrous feeds. 2. A rapid method for determination of fiber and lignin. *J Assoc Off Anal Chem* 46:829–835

van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV: determination of plant cell wall constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 50:50–55

Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24:452–481

Capítulo VII

Holocelulases e Perfil Bidimensional de *Aspergillus* Cultivados em Substratos Lignocelulósicos

*Félix Gonçalves de Siqueira¹; Gilvan Caetano Duarte¹; Diana Paola Gomez Mendoza²,
Paula Marcela Duque Jaramillo³; Carlos André Ornelas Ricart², Edivaldo Ximenes
Ferreira Filho¹.*

¹Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil. ²Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brazil. ³Laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

RESUMO

Os fungos do gênero *Aspergillus* têm sido relatados como um grupo importante de fungos filamentosos para diversas áreas, como de produção de alimentos e vários tipos de indústrias. Dois fungos deste gênero (*A. terreus* e *A. oryzae*) e uma forma teleomórfica do *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) isolados da compostagem de resíduos do rebeneficiamento de algodão, descrita no Capítulo V, foram caracterizados quanto à produção de holocelulases, avaliando temperaturas e pHs para a determinação de atividade enzimática, quando cultivados em diferentes fontes de carbono lignocelulósicos previamente pré-tratados. As holocelulases desses três fungos também foram avaliadas quanto ao sistema de cultivo, líquido (submerso) ou sólido. *A. terreus*, quando crescido em engaço de bananeira no sistema submerso, destacou-se na produção de holocelulases, principalmente para xilanase, além de apresentar, para pectinase, um perfil crescente de atividade em pH alcalino. Já no sistema de

cultivo sólido, o fungo *A. oryzae* crescido também em engaço de bananeira foi o que teve maior representatividade entre as holocelulases, tendo a pectinase sido a que apresentou maior produção quando comparado com o sistema submerso. Também foram avaliados os perfis protéicos em géis 2DE de extratos brutos dos fungos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, fazendo uso ou não de PNGase F para desglicosilação proteica.

1. Introdução

O gênero *Aspergillus* é um grupo numeroso de fungos filamentosos que, em 1926, na primeira descrição, tinha 22 grupos dentro do gênero, porém, em posterior revisão, feita por Thom & Raper (1945), foram identificados 14 grupos. Atualmente, a ordem dos Eurotiales tem cerca de 200 espécies de *Aspergillus* (Chaufon & Batista, 2003). Dentre estes, encontram-se fungos patogênicos, como *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, e também encontram-se fungos de grande importância industrial, como: *A. niger* e *A. tubingensis*. Atualmente, têm-se aplicado novas técnicas moleculares associadas às caracterizações bioquímicas para distinguir claramente os oito grupos de *Aspergillus* de coloração preta: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. heteromorphus* e *A. ellipticus* (de Vries & Visser, 2001).

Os *Aspergillus* de coloração preta têm muitas características que os apontam como microrganismos ideais para aplicações industriais, incluindo eficiente capacidade de fermentação e níveis elevados de secreção protéica. Outro interesse sobre o grupo dos *Aspergillus* que tem aumentado na atualidade é sua eficiente capacidade de degradar polissacarídeos da parede celular de plantas, tendo, assim, grande importância para vários tipos de indústrias, como alimentícia, cervejeira, bicompostíveis, entre outras (de Vries & Visser, 2001).

Diversos produtos de origem fúngica têm recebido o *Status GRAS* (*Generally Regarded As Safe*), podendo, assim, ser utilizados em produtos alimentícios humanos e de animais. Na atualidade, a espécie *Aspergillus* está sendo estudada como vetor para produção de proteínas heterólogas (de Vries & Visser, 2001).

Diversos microrganismos, como *Aspergillus*, são capazes de degradar holocelulose, assim como outros polissacarídeos da parede celular das plantas, graças à ação de uma bateria de enzimas hidrolíticas. Muitos desses microrganismos têm sido objeto de uma variedade de estudos, que incluem produção, purificação e caracterização, como também regulação gênica, clonagem de genes e expressão heteróloga de enzimas (Andreaus *et al.*, 2009).

A complexidade e a heterogeneidade das estruturas de celulose demandam uma ação sinérgica nas cadeias principais e laterais da holocelulose com enzimas de diferentes especificidades para sua completa hidrólise (Siqueira & Ferreira-Filho, 2010).

Dentre as holocelulases incluem-se as endo-enzimas, como β -xilanasas (EC 3.2.1.8), β -mananasas (EC 3.2.1.78), α -arabinase (EC 3.2.1.99), β -galactanase (EC 3.2.1.89), β -glucanase (EC 3.2.1.4 e exo-enzimas: β -xilosidase (3.2.1.37), β -manosidase (EC 3.2.1.25), celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91), β -glucosidase (3.2.1.21) e α -galactosidase (EC 3.2.1.22). Enzimas adicionais também são necessárias para a completa quebra da holocelulose, tais como acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72), α -arabinofuranosidase (3.2.1.55), acetil-manana-esterase (3.1.1.6), feruloil e *p*-coumaroil-esterases (3.2.1.73) e α -glucoronidase (3.2.1.139) que são requeridas para a remoção dos grupos substituintes da cadeia lateral que podem estar ligados a vários resíduos glicídicos da estrutura holocelulósica, criando mais sítios para hidrólises subsequentes (Ferreira-Filho, 1998; Andreaus *et al.*, 2009).

As holocelulases podem apresentar diversas aplicações industriais (Bhat, 2000; Zhang *et al.*, 2006), incluindo o uso em ração animal, alimentos, cervejaria e vinhos, têxtil, detergentes, combustíveis e na indústria de polpa de papel (Howard *et al.*, 2003).

De acordo com Wong & Saddler (1993), enzimas como hemicelulases e celulases são, provavelmente, mais utilizadas quando a remoção seletiva de fragmentos de holocelulose é requerida para a produção de materiais que têm elevado valor comercial. As holocelulases não são restritas a componentes individuais de aplicação industrial, mas também em combinações com outros sistemas de enzimáticos, como proteases, esterases e amilases. Como, por exemplo, na indústria de detergentes, em que proteases, celulases, lípases e amilases são utilizadas no preparo de sabão de limpeza biológico (Andreaus *et al.*, 2009).

Segundo Bhat (2000), o mercado mundial de enzimas industriais em 1995 foi cerca de 1 bilhão (US\$), em que 20% das vendas foi atribuída às celulases, às hemicelulases e às pectinases. Este mercado aumentou para 1,6 bilhão, em 2000 e 2,0 bilhões, em 2005. Atualmente, esse mercado está estimado em cerca de 4 bilhões (US\$), em que 60% destas correspondem a enzimas industriais (Costa *et al.*, 2007). No ano de 2009, aumentou a demanda por enzimas e o faturamento foi de 5 bilhões (US\$), segundo pesquisadores do *Fredonia Group* (www.fredoniagroup.com). Neste contexto, as hidrolases representam o maior grupo de enzimas industriais. De modo geral, enzimas industriais são produzidas na Europa (60%) e o restante, nos Estados Unidos e Japão (40%).

Os fungos filamentosos, como dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium*, são as maiores fontes de enzimas industriais porque eles têm a habilidade de produzir e secretar em larga escala estes catalizadores (Viniegra-González *et al.*, 2003; Viniegra-González & Favela-Torres, 2004). Estes fungos também são fáceis de cultivar nas formas convencionais

dos sistemas *submerged fermentation* (SmF) e *solid-state fermentation* (SSF) e também podem ser utilizados para produzir enzimas transgênicas (Berka, 1991).

A obtenção de produtos com elevado valor comercial utilizando-se o sistema SSF para produzir enzimas tem sido recentemente revisado (Pandey *et al.*, 1999; Shankaranand *et al.*, 1992; Viniegra-González, 1997) para uma ampla faixa de enzimas e isolados, e os métodos, geralmente, chegam a altos índices de produtividade, quando comparados com método convencionais de SmF. A razão para essa diferença de produtividade entre as técnicas de SSF e SmF é descrita por Pandey *et al.* (1999), mas Viniegra-González *et al.* (2002) apresentaram hipóteses para esta vantagem, que seria devido ao percentual de oxigênio disponível nos microgradientes, assim como na concentração de substrato que o fungo agrega, formando uma superfície de suporte sólido ou suspensões líquidas de fungos no interior da biomassa. Sejam quais forem as razões, existe um crescente interesse biotecnológico para a produção de enzimas em SSF, uma vez que a demanda de energia e água é menor e tem-se uma redução considerável de outros custos de transformação, tais como a purificação enzimática.

Existem evidências de que algumas vias secretoras de enzimas envolvem N-glicosilações e que tal modificação é responsável pela sobre-expressão e a adaptabilidade de algumas enzimas hidrolíticas, como glicoamilases e celobiohidrolases, em resposta à presença de diferente açúcares no meio de cultura (Kruszewska *et al.*, 2008).

Em organismos eucariontes, a secreção de proteínas está associada à translação no retículo endoplasmático, dobramento e modificação de proteínas e posterior transporte mediante vesículas ao complexo golgiense ou outras organelas, em que ocorrerá a maturação. Finalmente, as glicoproteínas são transportadas, por vesículas secretoras, à membrana celular e, logo após, ao meio extracelular (Valkonen *et al.*, 2003).

A glicosilação é a mais abundante e diversa forma de modificação pós-traducional e ocorre pela união de um glicano a um resíduo de asparagina, em cujo caso chama-se de N-glicosilação. O processo de N-glicosilação de proteínas em eucariotos requer o oligossacarídeo dolicol fosfato, o qual é transferido por ação da oligosacaril transferase à asparagina localizada na sequência consenso (Asn-X-Ser/Thr) (Deshpande *et al.*, 2008).

Este trabalho foi realizado com o objetivo principal de determinar o perfil enzimático das holocelulases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* e *Emericella nidulans* (forma teleomorfa do fungo *Aspergillus nidulans*) e as variações do secretoma destes fungos, quando cultivados em diferentes fontes lignocelulósicas, em sistema submerso (SmF) e sólido (SSF).

2. Materiais e Métodos

2.1 Fungos

Os fungos *A. oryzae*, *A. terreus* e *E. nidulans* (forma teleomórfica do *Aspergillus nidulans*) (Figura 1) foram isolados de compostagem natural de resíduos de algodão da indústria de rebeneficiamento de algodão, no polo têxtil da região do Vale do Itajaí, estado de Santa Catarina (Capítulo V). Esses fungos fazem parte da micoteca do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

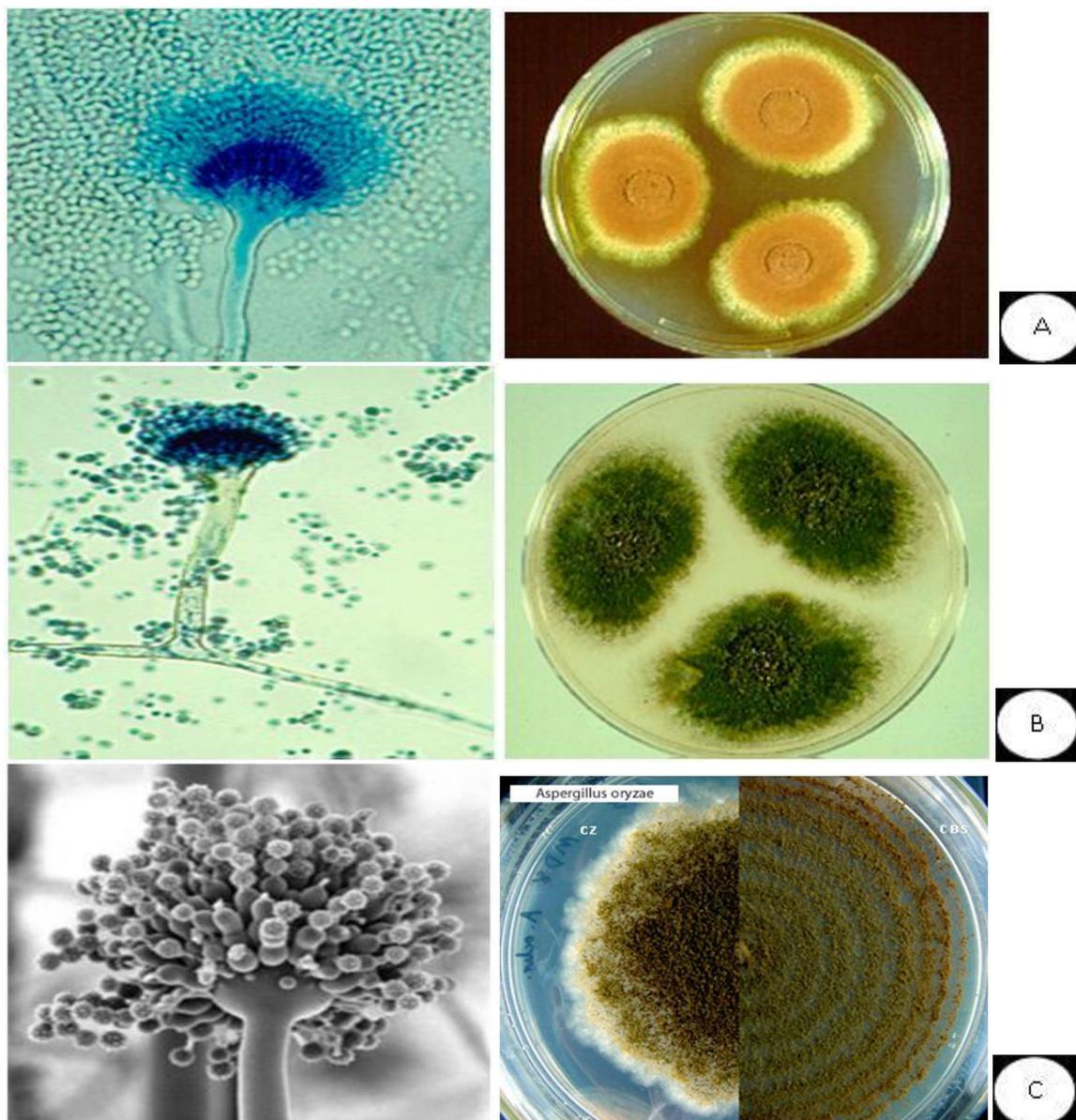


Figura 1. Microscopia de luz e eletrônica dos fungos filamentosos utilizados neste trabalho: A) *Aspergillus terreus*; B) *Aspergillus nidulans* (forma teleomórfica *Emericella nidulans*); C) *Aspergillus oryzae*.

Fonte: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/nidulans.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/nidulans.html), consultado em 05/06/2009.

A manutenção desses fungos é realizada mediante cultivo em placas com ágar-aveia ou batata dextrose ágar (BDA), com repiques periódicos. Também foi estabelecida a conservação desses fungos em água salina 0,9%, óleo mineral e glicerol 18%, em frascos de penicilina fechados com tampas emborrachadas e lacradas com anéis de alumínio, mantidos à

temperatura ambiente. As cepas também foram mantidas em glicerol 18% (v/v), devidamente esterilizadas em criotubos para conservação em freezer a -80°C.

2.2 Análises bromatológicas dos resíduos agroindustriais

As análises bromatológicas dos resíduos lignocelulósicos utilizados como fonte de carbono nos cultivos SmF e SSF foram realizadas conforme a descrição realizada no Capítulo II desta tese.

2.3 Produtos químicos e substratos

Os produtos químicos e substratos lignocelulósicos utilizados nestes experimentos têm as mesmas fontes que os materiais descritos no Capítulo II desta tese.

2.4 Cultivo dos fungos

Cada fungo foi cultivado em três diferentes fontes de carbono lignocelulósicas, em duas condições de cultivo, ou seja, SmF e SSF (Tabela 1).

As fontes de carbono lignocelulósicas foram pré-tratadas separadamente com autoclavagem a 121°C/atm, por 2 horas, com posterior lavagem em água corrente para a retirada de sujidades encontradas nestes resíduos. Após a lavagem, esses materiais foram secos a 65°C, por 48 horas, em estufa, sendo, logo depois, triturados em moinho industrial de bancada, utilizando-se peneiras finas para a obtenção de pequenas partículas de cada um dos resíduos utilizados nos cultivos SmF e SSF.

O meio de cultura utilizado no sistema SmF foi o meio suplementado (MS) (KH_2PO_4 – 7g; K_2HPO_4 – 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,6 g, com 1% da fonte de carbono, ou seja, 1g de bagaço de cana-de-açúcar ou engaço de bananeira ou piolho-de-algodão-sujo. Os valores foram calculados em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e o pH acertado para 7,0, com solução de KOH 1M. Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se erlenmeyers de 250 mL, com

100mL de meio de cultura, devidamente fechados e autoclavados a 121°C/atm de pressão constante, por 20 minutos. A adição do inóculo foi realizada por meio de raspagem dos esporos das placas totalmente colonizadas pelos fungos e colocados em solução de NaCl 0,9% (m/v) autoclavada, formando uma suspensão de esporos de 50 mL em solução salina, que recebeu 5 mL de surfactante, Tween 80 1% (v/v), para os fungos que apresentaram esporos hidrofóbicos, como foi o caso do *A. oryzae* e *E. nidulans*. A contagem dos esporos viáveis da solução foi feita por meio da observação em microscópio ótico com câmara de Newbauer, contabilizando 10^8 esporos/mL. Com o resfriamento dos frascos, foi feita a inoculação dos esporos, utilizando-se a câmara de fluxo laminar, na relação de 1 mL de solução de esporos para cada 100mL de meio de cultura, inoculando-se, assim, 1 mL para cada repetição. A incubação foi realizada por 5 dias, à temperatura de 28°C, sob agitação de 120 rpm. Após o cultivo, os frascos com o extrato-bruto foram centrifugados, por 10 minutos, a 10.000 rpm, passando o sobrenadante pelo processo de filtração em papel de filtro comum em bomba a vácuo. Os frascos com os extratos brutos receberam azida sódica (0,1% m/v) para evitar contaminação e foram armazenadas na câmara fria (4°C), para análises enzimáticas e proteômicas.

O cultivo em estado sólido (SSF) foi realizado com 10 g de fonte de carbono lignocelulósica pré-tratada conforme mencionado no parágrafo anterior, para cada um dos tratamentos, sendo umedecido com o mesmo meio de cultura (MS) utilizado no cultivo SmF. Foram necessários 80 mL de MS para a obtenção de uma umidade em torno de 65% nos frascos de cada cultivo. A solução de esporos foi preparada e adicionada da mesma maneira adotada em SmF. O cultivo foi realizado em câmara demanda biológica de oxigênio (BOD), a 28°C, por 5 dias, sem agitação. A extração das enzimas foi realizada com a adição de 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em cada frasco dos cultivos, sendo misturados à mão, com auxílio de um bastão de vidro. Logo após a homogeneização do tampão ao

cultivo, realizou-se a centrifugação do material por 10 minutos, a 10.000 rpm, fazendo-se, em seguida, a filtração em bomba de vácuo com papel filtro, para a obtenção do extrato bruto. Os extratos brutos foram mantidos da mesma forma que os extratos de SmF para as análises enzimáticas e proteômicas.

Tabela 1. Cultivos dos fungos filamentosos em diferentes fontes de carbono lignocelulósica, sob duas condições de crescimento.

Tratamentos	Fungos filamentosos	Fontes de carbono lignocelulósico	Tipo de cultivo
T1	<i>A. terreus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	SmF (submerged fermentation)
T2	<i>A. oryzae</i>		
T3	<i>E. nidulans</i>		
T4	<i>A. terreus</i>	Engaço de bananeira	28°C com agitação a 120 rpm, por 5 dias
T5	<i>A. oryzae</i>		
T6	<i>E. nidulans</i>		
T7	<i>A. terreus</i>	Piolho-de-algodão-sujo	
T8	<i>A. oryzae</i>		
T9	<i>E. nidulans</i>		
T10	<i>A. terreus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	SSF (solid-state fermentation)
T11	<i>A. oryzae</i>		
T12	<i>E. nidulans</i>		
T13	<i>A. terreus</i>	Engaço de bananeira	28°C, sem agitação BOD, por 5 dias
T14	<i>A. oryzae</i>		
T15	<i>E. nidulans</i>		
T16	<i>A. terreus</i>	Piolho-de-algodão-sujo	
T17	<i>A. oryzae</i>		
T18	<i>E. nidulans</i>		

2.5 Caracterização enzimática, proteína total e açúcares redutores

As atividades enzimáticas para as holocelulases foram realizadas conforme descrita no capítulo II desta tese.

A caracterização enzimática das holocelulases dos extratos brutos de cada cultivo foi feita com a determinação do efeito da temperatura e pH nas atividades. Os protocolos para esta caracterização foram os mesmos utilizados no Capítulo III. Seguindo também os protocolos descritos neste Capítulo III, foram determinados os teores de proteína total, açúcares redutores totais e glicose.

2.6 Análises proteômicas

2.6.1. Preparo das amostras

O filtrado obtido a partir do crescimento, em SmF e SSF, de *A. oryzae*, *A. nidulans* e *A. terreus* foram dialisados, utilizando-se uma membrana de celulose Sigma[®] com retenção de 10 kDa. As membranas foram inicialmente lavadas com água destilada e posteriormente tratadas com solução de 2% (m/v) de NaHCO₃ e 1mmol/L de EDTA, durante 2 horas, a 60°C. Ao final desse período, as membranas foram novamente lavadas com água destilada e dispuseram-se 2 mL dos extratos, para cada 2 cm da membrana. A diálise foi feita contra água destilada, durante 4 horas, a 4°C, trocando-se a água destilada a cada hora. Um volume de 1,0mL de cada amostra dialisada foi disposto em tubos eppendorf[®] e secado o vácuo em Speed Vac SC100 Savant[®]. As amostras foram armazenadas a -20°C.

2.6.2. Digestão enzimática com PNGase F

Os filtrados dialisados e liofilizados foram reconstituídos em tampão de digestão que consistia de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5; SDS 0,2%(m/v), β-mercaptoetanol 1μL

e tergitol NP40 1µL. Posteriormente, as amostras reconstituídas foram aquecidas, a 100°C, durante 10 minutos e, logo após o esfriamento, foram adicionadas três unidades da enzima PNGase F (E.C.3.5.1.52) (Sigma-Aldrich, Inc.) e incubadas, durante 18 horas, a 37°C. Amostras controle de cada filtrado (sem adição de enzima) foram também preparadas.

2.6.3. SDS-PAGE

A eletroforese em gel SDS-PAGE vertical foi realizada em géis de 12% (m/v) poliacrilamida, durante 3 horas, à corrente constante de 20 mA no sistema Hoefer®. Dispuseram-se, em cada poço, 20 µL de cada amostra (controle e tratamento com PNGase) e 20µL de tampão de amostra contendo Tris-HCl 50mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), DTT 100mM, glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol. Os géis foram fixados e corados com nitrato de prata (Blum *et al.* 1987).

2.6.4. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Para a eletroforese bidimensional, géis de gradiente imobilizado de pH, *Immobiline*™ *Dry Strip* 18 cm pH 4-7, foram utilizados. Os *strips* foram reidratados *over night*, a 20°C, com 350µL da amostra previamente desalinizada com o *2D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences ©) e dissolvida em tampão 2DE composto por DTT 85 mM, Triton X-100 2,5% (v/v), IPG buffer pH 4-7 GE® 0,5% (v/v), ureia 7 mol/L, tiourea 2 mol/L e isopropanol 10% (v/v). A focalização isoeletrica ocorreu a 20°C no suporte *Manifold*® adaptado ao aparelho *Ettan IPGphor III GE*® e corrente constante de 75 µA/*strip*, com um total de 36.000 Vh, que incluiu as seguintes etapas: *step* 1h-500 V, *grad* 1h – 1.000 V, *grad* 3h-10.000 V, *step* 1h50 - 10.000 V.

Os *strips* 4-7 equilibrados foram transferidos a géis gradiente SDS-PAGE 8-15%. A segunda dimensão foi feita utilizando-se cuba *Protean*® II xi Cell (Bio-Rad), à corrente

constante de 25 mA/gel. Os géis foram fixados e corados com comassie brilliant blue G250 (Anderson *et al.*, 1991).

Os géis foram escaneados no equipamento Image Scanner (Amersham Biosciences®), utilizando-se o programa PowerLook 1120 (Amersham Biosciences ©)

3. Resultados e Discussões

3.1 Análises bromatológicas

Dentre os três resíduos lignocelulósicos testados, o engaço de bananeira mostrou ser um substrato rico em proteína total com 8,6%. Isso significa que o teor de nitrogênio total deste material é em torno de 1,37% (Tabela 2). Este valor é obtido pela divisão do teor de proteína total pela constante 6,25, utilizada na literatura da bromatologia sobre conversão de proteína bruta em teor de nitrogênio total.

O teor de nitrogênio é importante para o crescimento de qualquer ser vivo, e cada ser vivo, incluindo os microrganismos, necessitam de uma determinada faixa de relação C:N para obter êxito sobre a degradação das matérias orgânicas. Obtendo-se o teor de C do engaço de bananeira por meio do somatório dos teores de gordura, carboidratos solúveis, celulose e hemicelulose, e dividindo-se este resultado pelo teor de nitrogênio total do engaço, pode-se inferir uma relação C:N para este resíduo, nestas condições de trabalho, de 79:1. Já as relações C:N do piolho-de-algodão-sujo e bagaço de cana-de-açúcar foram de, aproximadamente, de 97:1 e 237:1, respectivamente.

A relação C:N é uma variável importante para ser observada no desenvolvimento micelial e produtividade de cogumelos do gênero *Pleurotus* no sistema SSF (Zanetti & Ramal, 1997; Dias et al., 2003). Rossi et al. (2001) estudaram o desenvolvimento micelial do *Lentinula edodes* crescido em bagaço de cana-de-açúcar (SSF) com diferentes

suplementações de substratos ricos em nitrogênio total, constatando que a relações C:N muito baixas diminuem a taxa de crescimento micelial, como também relações muito pobres em nitrogênio não beneficiaram o desenvolvimento micelial deste fungo.

Neste contexto, Singh & Verma (1996) mostraram que relação C:N baixa limitava o crescimento de *Lentinula lateritia* e Kamra & Zadrazil (1986), citados por Maziero (1990), admitiram ocorrer inibição da degradação da lignina em decorrência da alta concentração de N no substrato. Segundo López et al. (2003), a produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* tem como principal fator de crescimento micelial e produção de metabólitos a relação de C:N dos nutrientes utilizados no meio de cultura.

Tabela 2. Análises bromatológicas dos resíduos agroindustriais utilizados nos cultivos de *Aspergillus* como fonte de carbono lignocelulósica nos sistemas de crescimento SmF e SSF.

Análises bromatológicas	Bagaço de cana-de-açúcar	Engaço de bananeira (banana prata)	Piolho-de-algodão "sujo"
Fibra (%)	30,2	44,6	56,7
Cinzas (%)	0,8	7,8	4,6
Umidade (%)	7,6	8,4	8,5
Matéria seca (%)	92,4	91,6	91,5
Proteína bruta (%)	3,1	8,6	6,9
Gordura (%)	1,2	2,3	1,8
FDA* (%)	39,7	62,3	72,0
FDN** (%)	55,9	79,8	81,8
Carboidratos solúveis (%)	64,7	36,7	30,0
Kcalorias (kcal g*100g)	281,7	202,0	163,7
Celulose (%)	34,6	52,9	65,7
Hemicelulose (%)	16,2	17,4	9,8
Lignina (%)	5,1	9,4	6,3
Cálcio (%)	0,02	0,98	1,01
Fósforo (%)	0,03	0,09	0,14

3.2 Atividades enzimáticas das holocelulases de *Aspergillus* cultivados em SmF

Os perfis enzimáticos das holocelulases obtidos a partir dos três fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* em fontes de carbono lignocelulósicas sem e com pré-tratamento encontram-se nas tabelas 3 e 4.

De modo geral, as atividades para hemicelulases (xilanase e mananase), pectinase e endoglicanase (CMCase) tiveram menores valores após o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos, quando se compara com as atividades dos substratos não-tratados (Tabela 3 e 4). No entanto, algumas atividades de FPase apresentaram melhora nos resultados após o pré-tratamento dos substratos, como o *A. terreus* (crescido em bagaço e engaço), que apresentou aproximadamente $0,2 \text{ UI.mL}^{-1}$ (Tabela 4), enquanto nos substratos não-tratados os valores foram de 0,06 e 0,15 $0,2 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3). Os menores valores para atividades das hemicelulases, pectinase e CMCase, após o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos, podem ser explicados em função da lavagem realizada após o processo de autoclavagem, que pode ter removido uma parte da hemicelulose, da pectina e da oligossacarídeos solúvel, após o despreendimento da parede celular dos substratos.

De acordo com Kim *et al.* (2009), o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos é necessário em função da necessidade de romper sua estrutura recalcitrante. Estes mesmos autores relataram processo alternativo, em que matérias-primas lignocelulósicas imersas em tubos de aço inox com água, hermeticamente fechados e submetidos a um banho de areia aquecida entre 160° a 190°C , proporcionaram a remoção de parte da hemicelulose das estruturas lignocelulósicas em forma de oligossacarídeos, tornando a celulose mais acessível à ação das celulases.

Os três substratos lignocelulósicos mostraram resultados expressivos para a produção de holocelulases, principalmente após o pré-tratamento. Entretanto, além do efeito promovido

pelo pré-tratamento, a espécie de *Aspergillus* utilizada no cultivo também foi fator importante na variação da indução de holocelulases.

O bagaço de cana-de-açúcar foi o substrato que teve menores variações de atividades de xilanases entre as três espécies de *Aspergillus* testadas, tanto com ou sem pré-tratamento, com, aproximadamente, 2,4 UI.mL⁻¹, para ambas as condições. Já o engaço de bananeira foi o substrato que teve as maiores variações entre os fungos após o pré-tratamento, principalmente entre as atividades de xilanase (entre 0,48 e 2,24 UI.mL⁻¹), pectinase (entre 0,30 e 0,59 UI.mL⁻¹), CMCase (entre 0,55 e 1,1 UI.mL⁻¹) e FPase (entre 0,006 e 0,171 UI.mL⁻¹).

A atividade de endoglicanase produzidas por *A. terreus* foi mais expressiva quando cultivada em bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira, respectivamente. Essas fontes de carbono mostraram-se bastante promissoras para a indução de holocelulases. No entanto, no engaço de bananeira, como visto no Capítulo IV, sobre aplicações têxteis de extrato bruto de *A. flavus*, os extrativos totais dessa fonte de carbono lignocelulósica são empecilhos para aplicação biotecnológica direta, como manchamento de tecidos, por exemplo, o que requer maiores esclarecimentos em estudos posteriores. O piolho-de-algodão apresentou a coloração mais clara do extrato bruto após o cultivo dos fungos entre os três substratos testados. Esta característica, muito provavelmente, constitui um ponto positivo para aplicações biotecnológicas das enzimas por esta fonte de carbono, como na indústria têxtil, além de apresentar resultados expressivos para a indução de holocelulases, com destaque para *E. nidulans* na produção de xilanase e pectinase após o pré-tratamento.

Tabela 3. Perfil das atividades de holocelulases, a 50°C, de extratos brutos de fungos do gênero *Aspergillus* crescidos em fontes de carbono lignocelulósicas (sem pré-tratamento) no sistema de cultivo SmF.

Fungos & fontes de carbono	Hemicelulases & pectinases			Celulases		
	UI.mL ⁻¹					
	Xilanase	Mananase	Pectinase	CMCase	FPase	Avicelase
<i>T10_A.terreus_bagaço</i>	2,402±0,013	0,022±0,011	0,494±0,082	0,298±0,008	0,060±0,003	0,005±0,002
<i>T11_A.oryzae_bagaço</i>	2,720±0,068	0,078±0,025	0,514±0,132	0,183±0,016	0,093±0,004	0,003±0,002
<i>T12_E.nidulans_bagaço</i>	2,426±0,039	0,030±0,022	0,719±0,075	0,089±0,014	0,027±0,007	0,020±0,001
<i>T13_A.terreus_engaço</i>	3,510±0,055	0,161±0,022	0,796±0,092	0,519±0,024	0,159±0,009	0,027±0,003
<i>T14_A.oryzae_engaço</i>	1,861±0,072	0,120±0,027	0,557±0,042	0,208±0,008	0,024±0,007	0,006±0,001
<i>T15_E.nidulans_engaço</i>	1,988±0,052	0,011±0,005	1,104±0,046	0,137±0,014	0,036±0,007	0,009±0,002
<i>T16_A.terreus_p.algodão</i>	2,467±0,048	0,109±0,039	0,583±0,111	0,213±0,011	0,064±0,003	0,018±0,006
<i>T17_A.oryzae_p.algodão</i>	1,715±0,045	0,210±0,013	0,572±0,058	0,086±0,010	0,018±0,005	0,015±0,004
<i>T18_E.nidulans_p.algodão</i>	2,742±0,032	0,130±0,016	0,980±0,068	0,159±0,022	0,063±0,005	0,014±0,003

Tabela 4. Perfil das atividades enzimáticas, a 50°C, das hemicelulases dos extratos brutos obtidos do cultivo de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, crescidos em fontes de carbono lignocelulósicas pré-tratadas (autoclavagem/lavagem/secagem/trituração) na condição de SmF.

Fungos & fontes de carbono	Hemicelulases & pectinases			Celulases		
	U.L.mL ⁻¹					
	Xilanase	Mananase	Pectinase	CMCase	FPase	Avicelase
T1_ <i>A.terreus</i> _bagaço	2,320±0,010	0,150±0,005	0,269±0,013	0,307±0,003	0,219±0,004	0,007±0,000
T2_ <i>A.oryzae</i> _bagaço	2,356±0,006	0,136±0,004	0,470±0,036	0,121±0,008	0,114±0,004	0,002±0,001
T3_ <i>E.nidulans</i> _bagaço	2,253±0,058	0,149±0,004	0,662±0,072	0,130±0,005	0,122±0,001	0,002±0,001
T4_ <i>A.terreus</i> _engaço	2,247±0,022	0,153±0,010	0,592±0,055	0,296±0,002	0,171±0,002	0,008±0,001
T5_ <i>A.oryzae</i> _engaço	0,481±0,007	0,117±0,002	0,436±0,026	0,059±0,005	0,006±0,006	0,002±0,001
T6_ <i>E.nidulans</i> _engaço	0,726±0,019	0,125±0,007	0,306±0,026	0,066±0,001	0,021±0,002	0,003±0,000
T7_ <i>A.terreus</i> _p.algodão	1,796±0,013	0,109±0,007	0,455±0,046	0,130±0,003	0,053±0,005	0,001±0,000
T8_ <i>A.oryzae</i> _p.algodão	1,437±0,011	0,116±0,007	0,761±0,151	0,110±0,002	0,022±0,009	0,002±0,001
T9_ <i>E.nidulans</i> _p.algodão	1,996±0,090	0,133±0,003	0,528±0,076	0,105±0,001	0,064±0,007	0,002±0,001

Tabela 5. Perfil das holocelulases, a 50°C, dos extratos brutos dos *Aspergillus* crescidos em fontes de carbono lignocelulósicas (pré-tratadas: autoclavagem/lavagem/secagem/trituração) no sistema de cultivo SSF.

Tratamentos	Hemicelulases & pectinases			Celulases		
	UI.mL ⁻¹					
	Xilanase	Mananase	Pectinase	CMCase	FPase	Avicelase
T10_ <i>A.terreus</i> _bagaço	1,486±0,045	0,164±0,012	1,814±0,029	0,228±0,002	0,198±0,016	0,036±0,002
T11_ <i>A.oryzae</i> _bagaço	2,536±0,039	0,187±0,001	1,843±0,041	0,129±0,007	0,166±0,014	0,041±0,002
T12_ <i>E.nidulans</i> _bagaço	2,752±0,044	0,203±0,022	1,852±0,043	0,210±0,021	0,203±0,005	0,059±0,001
T13_ <i>A.terreus</i> _engaço	1,708±0,049	0,164±0,022	1,876±0,032	0,172±0,010	0,152±0,008	0,033±0,005
T14_ <i>A.oryzae</i> _engaço	3,016±0,029	0,466±0,011	2,324±0,034	0,209±0,022	0,344±0,010	0,144±0,003
T15_ <i>E.nidulans</i> _engaço	2,891±0,041	0,278±0,007	1,822±0,054	0,195±0,011	0,248±0,008	0,036±0,003
T16_ <i>A.terreus</i> _p.algodão	0,711±0,023	0,144±0,018	2,155±0,045	0,199±0,027	0,110±0,005	0,044±0,003
T17_ <i>A.oryzae</i> _p.algodão	2,331±0,072	0,230±0,002	1,724±0,055	0,229±0,015	0,185±0,009	0,034±0,002
T18_ <i>E.nidulans</i> _p.algodão	2,304±0,048	0,216±0,017	1,812±0,011	0,229±0,008	0,171±0,012	0,035±0,003

Dentre o grupo das celulases, as endoglicanase apresentaram, em todos os tratamentos, valores muito próximos uns dos outros, sem maiores destaques para cada tratamento, sendo próximos a $0,23 \text{ UI.mL}^{-1}$. A atividade de FPase mostrou que *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira apresentou melhores resultados, seguido de perto por *E. nidulans*, também crescido em engaço de bananeira.

Para o ensaio de avicelase, os resultados mostraram a superioridade do *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, com mais que o dobro das atividades enzimáticas observadas nos outros tratamentos (Tabela 5).

Bonnin *et al.* (1997) observaram a produção de isoformas de endoglicanases em isolados de *A. terreus*. Endoglicanases e β -glicosidases também são capazes de clivar ligações de xiloglucanas. Endoglicanases não são capazes de hidrolizar a celulose até monômeros de glicose, liberando apenas oligosacarídeos de xiloglucanas.

Três exoglicanases foram purificadas, em pesquisas feitas por Bagga *et al.* (1990), a partir de *A. nidulans*, tendo sido observado que as três enzimas tinham peso molecular distinto e que as denominadas Exo-2 e Exo-3 tiveram maior afinidade com celulose que a Exo1. Duas exoglicanases foram identificadas em *A. terreus* (Ivanova *et al.*, 1983), como também em *A. ficuum* (Hayashida *et al.*, 1988). Estas enzimas também apresentaram massas moleculares distintas nas respectivas caracterizações.

Enzimas celulolíticas têm sido produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, utilizando fontes como celulose (Hayashida *et al.*, 1988; Paroda & Mishra, 1984, Pushalkar *et al.*, 1995); sofrorose e 2-O- β -D-glucopiranosil-D-xilose (Hrmová *et al.*, 1991); celobiose, glucose e xilose (Ali & Sayed, 1992). Outros fatores, como a fonte de nitrogênio, também são importantes para a

indução de enzimas degradadoras da parede celular de plantas, como observaram Stewart & Parry (1981) em *A. fumigatus* crescido em meio suplementado com amônia, mostrando que houve maior atividade enzimática de endo e exoglucacanasases que quando crescido em nitrato, No entanto esta última fonte de nitrogênio estimulou a produção de β -glucosidase em *A. terreus* (Pushalkar *et al.* 1995).

O valores de atividade de pectinase ficaram muito próximos uns dos outros, entre todos os fungos-tratamentos testados. Porém, *A. terreus* crescido em engaço apresentou valores mais próximos ao resultado de *A. oryzae* em engaço, que foi o tratamento que se mostrou mais favorável à produção das pectinases (Tabela 5). Os tratamentos na condição SSF (Tabela 5) foram diferentes das condições SmF (Tabelas 3 e 4, sem e com pré-tratamento, respectivamente) para pectinase. Essa atividade foi a única que teve melhor desempenho dentre as holocelulases no sistema SSF, quando comparado com o sistema SmF dos substratos não-tratados, para todos as condições testadas.

3.2.1 Efeito da temperatura nas atividades de holocelulases – Cultivo SSF

O fungo *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira apresentou, para todas holocelulases testadas, melhor desempenho nos ensaios em que foi avaliado o efeito da temperatura nas atividades, exceto para pectinase, que teve, com *E. nidulans* crescido em algodão, a melhor atividade a 60°C (Figura 4). A xilanase foi mais ativa na faixa de 50°C a 60°C, repetindo o perfil obtido nos tratamentos na condição SmF de cultivo (Figura 2). No entanto, os fungos *A. oryzae* e *A. nidulans*, ambos crescidos em engaço de bananeira e, novamente, *A. nidulans* (crescido em bagaço) foram os tratamentos que apresentaram melhor desempenho nos ensaios de temperatura. *A. terreus* crescido nos três substratos não mostrou atividade relevante de xilanase e

demais holocelulases na condição SSF (Figura 4), principalmente em engajo de bananeira, que mostrou resultados significativos nos ensaios enzimáticos sob condição SmF (Figura 2).

Segundo Ghanem *et al.* (2000), xilanases de *A. terreus* produzidas em meio sólido com farelo de trigo apresentaram maior atividade a 50°C, tendo uma diminuição mais significativa a 70°C. Este fato é uma característica importante, pois estas enzimas podem ser utilizadas na indústria de polpa de papel, na qual são necessárias enzimas que resistam a temperaturas acima dos 50°C. Beg *et al.* (2001), em revisão sobre as aplicações industriais das xilanases microbianas, demonstraram que os fungos do gênero *Aspergillus* têm uma faixa de temperatura ótima entre 24°C e 60°C.

Nas mananases, o comportamento enzimático foi melhor representado na temperatura de 60°C, para todos os tratamentos testados, da mesma maneira que ocorreu com o cultivo SmF (Figura 2). O tratamento T14, com o *A. oryzae* crescido em engajo de bananeira, teve maior significância entre todos os resultados, enquanto os demais tratamentos tiveram menos da metade da atividade enzimática desse tratamento (Figura 4). Moreira & Ferreira-Filho (2008), em revisão sobre as estruturas da manana e mananases microbianas, relatam que os fungos do gênero *Aspergillus* produzem enzimas deste complexo enzimático com temperatura ótima entre 60° e 72°C. Desse modo, os valores encontrados neste trabalho, com *Aspergillus* crescidos no sistema SSF com resíduos agroindustriais, são condizentes com os encontrados na literatura.

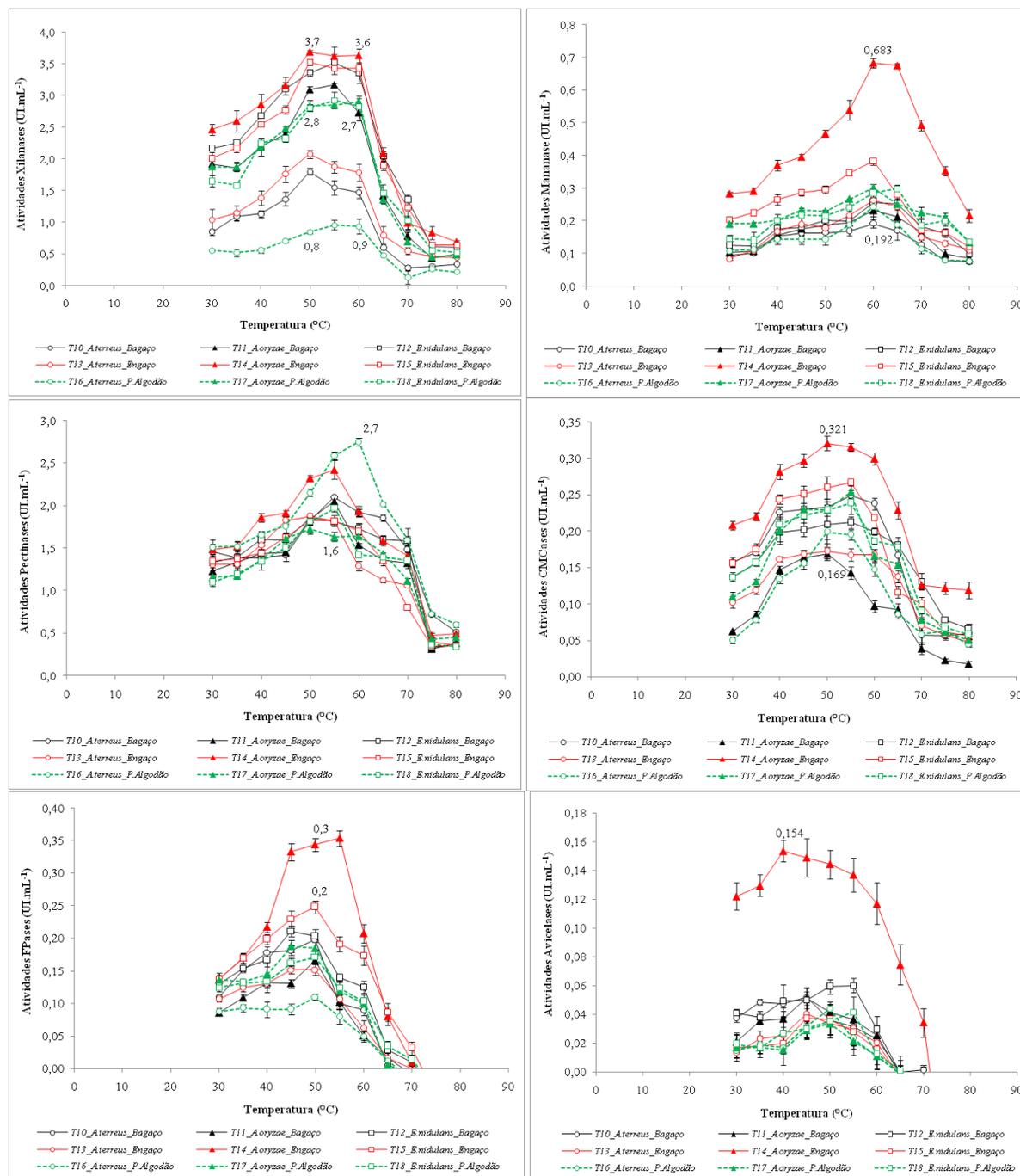


Figura 4. Efeito da temperatura ótima nas atividades de celulases (CMCase, FPase e avicelase), hemicelulases (xilanase e mananase) e pectinase dos extratos brutos de *Aspergillus* crescidos em diferentes fontes de carbono lignocelulósicas pré-tratadas nas condições de SSF.

A CMCase apresentou, para a maioria dos tratamentos, estabilidade das atividades enzimáticas na faixa de temperatura entre 40°C e 60°C (Figura 4), muito similar aos resultados vistos em SmF (Figura 2), tendo novamente *A. oryzae* crescido em engaço o resultado mais expressivo, seguido de *A. nidulans* crescido em engaço (Figura 4).

Khalil (2002), em trabalho com *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 crescido em bagaço de cana-de-açúcar (1%), apresentou melhores atividades de CMCase na faixa de temperatura entre 55°C e 70°C. Já Bukhtojarov *et al.* (2004) relataram que o fungo *Chrysosporium lucknowense* teve melhores resultados de endoglicanase na faixa entre 60°C e 70°C, resultados estes similares aos encontrados neste trabalho com fungos do gênero *Aspergillus* crescidos em alguns resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono (Figura 2 e 4).

A atividade de FPase teve em *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira o resultado mais expressivo no intervalo de temperatura 45°C a 55°C, seguido, novamente, pelo *A. nidulans* crescido em engaço na temperatura de 50°C, enquanto os demais tratamentos tiveram níveis basais de atividades de FPase, caindo drasticamente com o aumento da temperatura. A atividade de exoglicanase (avicelase) na condição SSF, para todas as condições testadas, não apresentou valores significativos (Figura 4), como foi visto anteriormente na figura 2.

Tanto para FPase quanto para avicelase, os resultados em SSF foram mais expressivos que os mostrados no sistema SmF (Figura 2), principalmente o tratamento T14 (*A. terreus*-Engaço). Segundo Xu *et al.* (2007), em trabalho de hidrólise enzimática de farelo de soja, foi encontrada, para celulase total (FPase), à temperatura ótima de 50°C e pH 4,8, a melhor condição de hidrólise do material lignocelulósico.

Chen *et al.* (2007) utilizaram celulases de *T. reesei* ZU-02 para hidrólise de sabugos de milho nas mesmas condições de temperatura e pH propostos no presente trabalho para hidrólise de farelo de soja. Da mesma forma, Baig *et al.* (2004) relataram a utilização de enzimas celulolíticas de *Trichoderma lignorum* para a sacarificação de pseudocales da bananeira (resíduos produzidos no cultivo da banana), sendo a temperatura de 45°C a melhor para a determinação da atividades enzimáticas.

3.2.2 Efeito do pH nas atividade de holocelulases – Cultivo SSF

Os testes de pHs para holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases) de *Aspergillus* crescidos nos três substratos lignocelulósicos pré-tratados mostraram que o *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira (T14) foi o que obteve os melhores resultados (Figura 5).

Na avaliação do efeito de pH para xilanase, os melhores resultados foram obtidos no tampão acetato de sódio 50 mM, na faixa entre 5 e 5,5 (Figura 5). Esta mesma faixa foi observada nos resultados da xilanase do cultivo em SmF (Figura 3), tendo *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira no cultivo SSF o maior destaque. Porém, a faixa de pH para este grupo de enzimas foi estendida entre 4,0 e 9,0, com valores de 60% ou mais da atividade máxima obtida por *A. oryzae* em engaço de bananeira, nos três tampões testados (Figura 6). A atividade de xilanase para os demais tratamentos seguiu o desenho gráfico do tratamento de *A. oryzae* em engaço de bananeira, porém, os que estiveram mais próximos (*E. nidulans* crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo) não chegaram a 70% do tratamento citado, em pH 5,0 (Figura 5).

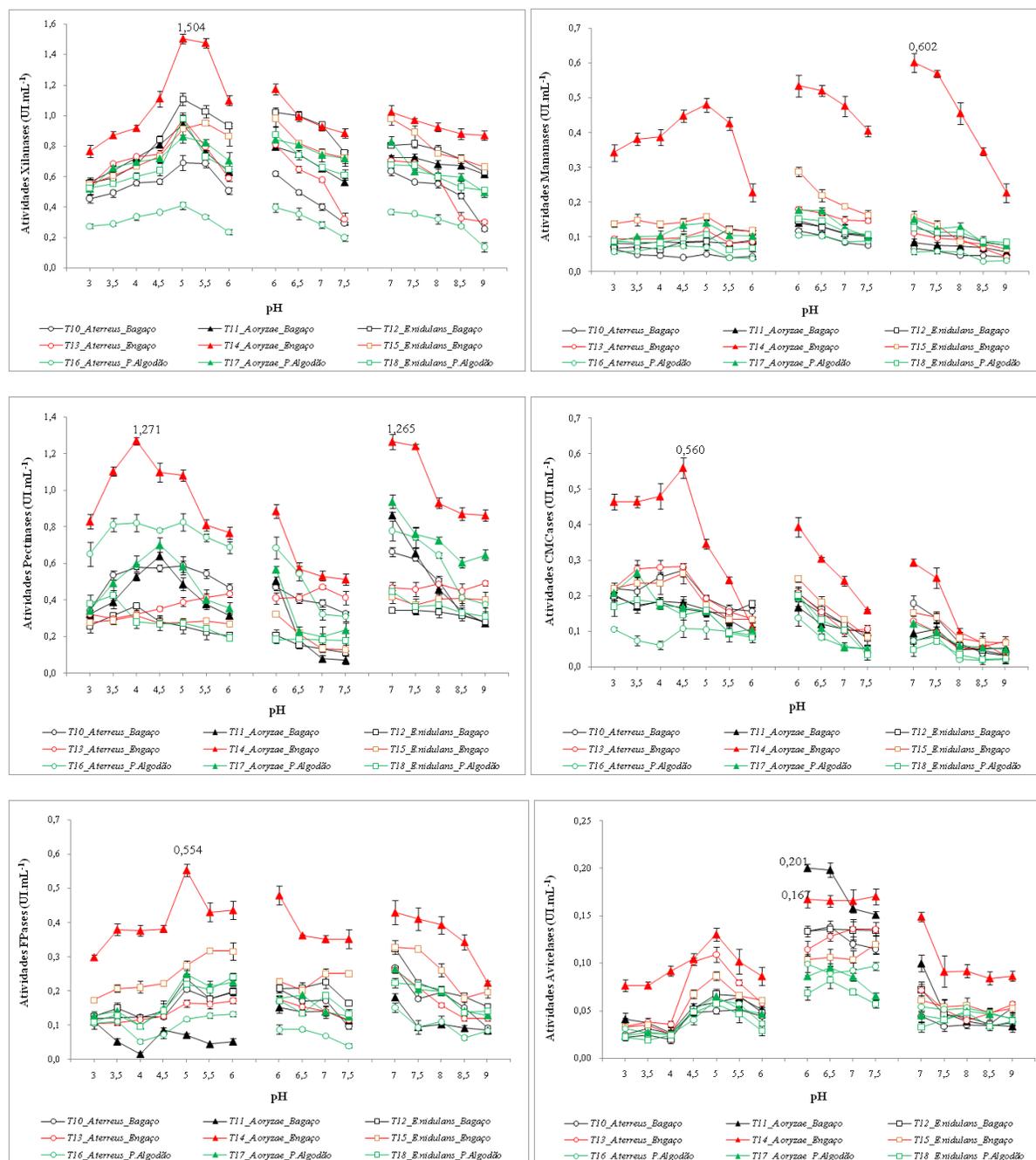


Figura 5. Efeito do pH nas atividades de celulases (CMCase, FPase e avicelase), hemicelulases (xilanases e mananases) e pectinase dos extratos brutos dos *Aspergillus* crescidos em diferentes fontes de carbono lignocelulósicas nas condições de SSF.

A atividade de xilanase nos tampões fosfato de sódio e Tris-HCl não apresentou diferenças relevantes entre os tratamentos com *A. oryzae* em engaço de bananeira e com os tratamentos de *E nidulans*. Porém, *A. terreus* crescido nos três substratos apresentou atividade irrelevante de xilanase (Figura 5), principalmente quando crescidos em piolho-de-algodão-sujo, em todas as faixas tamponantes utilizadas, diferentemente dos resultados apresentados no cultivo submerso, tendo o engaço de bananeira o substrato com resultados mais expressivos (Figura 3). A xilanase de *A. terreus* produzida em meio sólido com farelo de trigo apresentou faixa de pH entre 4 e 7 (Ghanem *et al.*, 2000). Valores de pH entre 1 e 10 foram relatados por Beg *et al.* (2001), para fungos do gênero *Aspergillus*, em revisão sobre as aplicações industriais das xilanases microbianas. Contudo, a faixa predominante de pH ótimo para xilanases desses microrganismos foi entre 5 e 6.

Mananase teve, com *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, o melhor resultado para o efeito do pH dentre os tratamentos no cultivo SSF (Figura 5). Os resultados do *A. oryzae* em engaço de bananeira apresentaram atividade mananolítica em ampla faixa de pH, nos três tampões testados. Observou-se que tanto no tampão fosfato de sódio quanto no Tris-HCl, ambos a 50 mM, os melhores resultados ficaram entre pHs 6 e 7, respectivamente (Figura 5). Porém, a mananase também tem atividade significativa em pHs abaixo de 5 em tampão acetato de sódio, como apresentado no cultivo SmF (Figura 3).

Resultados decrescentes de atividade enzimática de mananase foram observados na faixa de pH entre 5,5 e 6,0, no tampão acetato de sódio, mostrando que há influência do tampão nesta faixa de pH. Os demais tratamentos, nos três tampões, na faixa de pH de 3,0 a 9,0, de forma geral, não tiveram atividade de mananase relevante (Figura 5). A maioria dos tratamentos não chegou a atingir 30% da atividade de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira (T14). Valores

próximos destes pHs para este grupo de enzimas foram relatados por Moreira & Ferreira-Filho (2008), para os fungos do gênero *Aspergillus* apresentando pHs ótimos entre 3,0-6,0, porém, com predominância do pH 4,5. Os *Aspergillus* cultivados neste trabalho, no sistema SSF, em algumas fontes de carbono lignocelulósicas, apresentaram faixa de pH ótimo mais ampla, chegando com atividades significativas até pH 7,5 no tampão Tris-HCl (Figura 6).

Os resultados para pectinase mostraram maior atividade enzimática nas faixas ácida e neutra (Figura 5), diferenciando dos resultados no cultivo SmF, que mostraram um perfil alcalino para maioria dos tratamentos, principalmente *A. terreus*-engaco (T4) (Figura 3). O cultivo de *A. oryzae* crescido em engaco de bananeira destacou-se na atividade de pectinase em pH 4,0, mantendo mais de 85% da atividade na faixa ácida que variou 3,5 a 5,0 em tampão acetato de sódio 50 mM (Figura 5). Esse cultivo apresentou atividade de pectinase em torno de 70% no pH 6 do tampão fosfato de sódio, enquanto no tampão Tris-HCl, com mesma concentração dos demais tampões, o resultado mais expressivo foi na faixa tamponante de 7 a 7,5, apresentando, assim, os mesmos resultados observados no tampão acetato de sódio em pH 4.

A faixa alcalina de atividade pectinase de *A. oryzae* crescido em engaco de bananeira ficou próxima de 70% da atividade obtida na faixa ácida. O cultivo de *A. terreus* em piolho-de-algodão-sujo apresentou o mesmo desenho gráfico que *A. oryzae* crescido em engaco de bananeira, porém, com, aproximadamente, 62% da atividade máxima de pectinase observada em *A. oryzae* (Figura 5). O cultivo de *A. oryzae* crescido em piolho-de-algodão-sujo apresentou, em tampão Tris-HCl pH 7,0, atividade de pectinase próxima a 70%, quando comparado com os melhores resultados.

O resultado para CMCase apresentou, no cultivo de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, atividades expressivas na faixa ácida, tendo em pH 4,5 o seu melhor resultado, (Figura 5), sendo a mesma faixa observada no cultivo SmF (Figura 3). O melhor resultado da atividade de CMCase de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira em tampão fosfato de sódio foi observado em pH 6,0, porém, com menos de 65% da atividade máxima observada. Os demais cultivos não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando atividade de CMCase inferiores a 50% das atividades do cultivo de *A. oryzae* em engaço de bananeira (Figura 5). Para a faixa tamponante alcalina em tampão Tris-HCl, os resultados foram insignificantes para todos os cultivos.

Segundo Khalil (2002), *P. chrysosporium* BKM-F-1767 crescido em bagaço de cana-de-açúcar (1%), apresentou pH ótimo para CMCase em tampão acetato de sódio 100 mM, em torno de 4,5, porém, mostrou, na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, mais de 85% da atividade enzimática. Bukhtojarov *et al.* (2004) demonstraram que o fungo *Chrysosporium lucknowense* teve máxima atividade enzimática de endoglicanase e celobio-hidrolase em tampão ácido, sendo o pH ótimo entre 4,5 e 6,0. Os autores chamam a atenção para o fato de que duas endoglicanases mantiveram atividades de 55% a 60% até o pH 8,5. Estes autores ressaltam que altas atividades em pH neutro ou alcalino são raramente encontradas entre celulasas fúngicas, similar aos resultados encontrados neste trabalho com fungos do gênero *Aspergillus* crescidos em alguns resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono.

Segundo Silva *et al.* (2005), o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, quando crescido no sistema SSF usando diferentes resíduos agrícolas sem enriquecimento do meio, apresentou mais atividade xilanolítica que celulolítica. Este fungo teve seu melhor desempenho em sabugo de milho, palha de milho e grama-batatais. A faixa de pH ótimo foi entre 5,0 e 5,5

para xilanases e 5,0 para CMCase, enquanto a temperatura ótima foi 60°C, para ambas as atividades enzimáticas.

A atividade de FPase apresentou melhor resultado em pH 5,0 no cultivo de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, porém, a amplitude de faixa de pH para essas enzimas foi estendida entre 3,5 e 8,0, nos três tampões testados, chegando a mais de 70% da atividade máxima observada. O cultivo de *A. terreus* em engaço foi o que apresentou o segundo melhor resultado junto aos demais cultivos, principalmente entre a faixa tamponante ácida até a neutra entre 5,0 e 7,5 para os tampões acetato de sódio e Tris-HCl (Figura 5). Porém, esse cultivo de *A. terreus* crescido em engaço de bananeira atingiu em torno de 55% da atividade máxima de FPase nos pHs 6,0 e 7,0, quando comparado com o cultivo de *A. oryzae* em engaço de bananeira (Figura 5).

A avicelase produzida por estes fungos apresentou melhores resultados de atividade enzimática na faixa de pH neutro, principalmente no tampão fosfato de sódio. Para as avicelases, o melhor resultado obtido foi no cultivo de *A. oryzae* crescido em bagaço nos pHs 6,0 e 6,5 (Figura 6). O cultivo de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira também mostrou melhores resultados nos demais cultivos na faixa ácida, principalmente no pH 5,0, juntamente com os cultivos deste mesmo fungo nos substratos bagaço de cana-de-açúcar e piolho-de-algodão-sujo, com atividades em torno de 65% da atividade máxima de avicelases observada no cultivo de *A. oryzae* crescido em bagaço. Os demais cultivos apresentaram atividades de avicelases abaixo de 60%, em todas as faixas tamponantes testadas (Figura 6).

As celulasas no cultivo SmF (Figura 3) e no SSF (Figura 5) apresentaram atividades relevantes, tanto na faixa ácida como na neutra, para alguns tratamentos. De acordo com Baig *et*

al. (2004), o pH 6,0 favoreceu o processo de sacarificação de pseudocales de bananeira, quando foram utilizadas enzimas celulolíticas de *Trichoderma lignorum*. Os mesmos autores citam, em trabalhos anteriores, pH 6,0 como ideal para a sacarificação de outros resíduos agrícolas lignocelulolíticos. Estes dados de pH e temperatura ótimas da sacarificação dos pseudocales de bananeira estão de acordo com os valores encontrados neste trabalho.

3.2.3 Proteína total e açúcar redutor total – cultivos SmF e SSF

Após obtidos os extratos brutos dos cultivos SmF e SSF, foram determinados valores de pHs finais, proteína total e açúcares redutores totais, os quais estão expressos nas tabelas 6 e 7.

Os valores de pH dos extratos brutos, na condição SmF, apresentaram-se similares para os três fungos, bem como para os três resíduos, durante o período de cinco dias de cultivo. Os valores de pH variaram de 6,751 a 6,997 (Tabela 6). Essa invariabilidade nos valores de pH dos extratos brutos, mesmo utilizando-se fontes de carbono diferentes, está relacionada ao efeito promovido pelos componentes do meio suplementado $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ e HPO_4^{-2} , os quais exercem efeito tamponante e, dessa forma, neutralizariam pequenas alterações de pH do meio de cultivo, promovidas pelas três fontes de carbono ou, mesmo, pelo metabolismo das três espécies de fungos. Em termos gerais, observou-se leve tendência à acidificação de todos os extratos brutos, com ênfase para o tratamento T4_A. *terreus_engaço*, cujo valor de pH foi de 6,751 (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação do valor de pH final, proteína total (Bradford), açúcar redutor total (DNS) e glicose (Kit GOD-POD) dos extratos brutos de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, crescidos em diferentes substratos lignocelulósicos pré-tratados como fonte de carbono na condição de cultivo SmF.

Tratamentos (SmF)	pH (extratos brutos)	Proteína total Bradford (g.L ⁻¹)	Açúcar redutor total - DNS (g.L ⁻¹)	Glicose GOD-POD (g.L ⁻¹)
T1_A.terreus_bagaço	6,800	0,042±0,002	0,069±0,001	0,000±0,000
T2_A.oryzae_bagaço	6,892	0,056±0,006	0,069±0,001	0,001±0,002
T3_E.nidulans_bagaço	6,861	0,058±0,006	0,069±0,001	0,002±0,002
T4_A.terreus_engaço	6,751	0,061±0,004	0,149±0,010	0,000±0,000
T5_A.oryzae_engaço	6,997	0,042±0,005	0,061±0,002	0,000±0,000
T6_E.nidulans_engaço	6,899	0,053±0,008	0,055±0,002	0,000±0,000
T7_A.terreus_p.algodão	6,890	0,029±0,002	0,060±0,003	0,000±0,000
T8_A.oryzae_p.algodão	6,916	0,069±0,010	0,105±0,002	0,004±0,003
T9_E.nidulans_p.algodão	6,902	0,059±0,006	0,075±0,003	0,000±0,000

Em condições normais, processos fermentativos resultam em acidificação do meio, que está relacionada a produtos de metabolismo que, quando liberados, manifestam seu caráter ácido. Em condições SmF, extratos brutos cujos valores de pH se situam próximo da neutralidade, ou seja, pH 7,0, apresentam condições, na maioria das vezes, ideais para a estabilização de enzimas, uma vez que não há perda de estrutura nativa por condições ácidas ou alcalinas.

O teor de proteína total (Bradford) dos extratos brutos variou de 0,029 a 0,069 g.L⁻¹, correspondente aos tratamentos T7_A. terreus_p. algodão e T8_A. oryzae_p. algodão (Tabela 6). Nesta fonte de carbono particular, observaram-se valores extremos, possivelmente relacionados à diferença de desempenho das duas espécies de *Aspergillus*, tendo *A. oryzae* se mostrado mais

eficiente na liberação de proteínas da própria fonte de carbono, ou mesmo pelo metabolismo de secreção proteica do próprio fungo. *A. nidulans* apresentou valores de proteína total praticamente sem variação e *A. terreus* mostrou-se mais eficiente com relação ao teor de proteína total, quando cultivado em engaço de bananeira com valor correspondente a 0,061 g.L⁻¹. *A. oryzae*, por sua vez, apresentou melhor eficiência para o mesmo parâmetro, quando cultivado em piolho de algodão, 0,069 g.L⁻¹.

Os valores de açúcares redutores totais (DNS) obtidos para os nove tratamentos variaram de 0,055 a 0,149 g.L⁻¹, conforme expresso na tabela 6. Neste ensaio, os tratamentos T4_ *A. terreus*_engaço e T8_ *A. oryzae*_p. algodão se destacaram sobre os demais, com valores de 0,149 e 0,105 g.L⁻¹, respectivamente. O comportamento das três espécies de *Aspergillus* frente às três fontes de carbono não revelou tendências específicas favorecendo uma ou outra biomassa para uma maior ou menor produção de açúcares redutores totais. Contudo, submetidos à fonte de carbono bagaço de cana de açúcar, as três espécies mostraram o mesmo teor de açúcares redutores totais de 0,069 g.L⁻¹. O pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos com água quente sobre pressão é capaz de liberar uma parcela significativa de hemiceluloses (xilana, galactana arabinana) e pectina que estão entrenhadas na parede celular das plantas, facilitando, assim, a ação enzimática de celulasas (Mosier *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009). Desse modo, a maioria dos açúcares solúveis do meio de cultura no sistema de cultivo SmF derivou-se da hidrólise do arsenal de enzimas dos fungos utilizados. A quantidade insignificante de glicose revelada pelo ensaio que fez uso do *Kit God-Pod* (Tabela 6) está refletida na pouca expressão enzimática de alguns tipos de celulasas, como as exoglicanases (avicelase), em todos os tratamentos do cultivo SmF.

No sistema de cultivo SSF, o pH inicial dos extratos brutos dos tratamentos variou entre 4,6 a 5,3 (Tabela 7). O tratamento com *A. oryzae*-engaçó (T14), que teve o melhor desempenho nas atividades de holocelulases em SSF, foi o que apresentou o pH mais ácido, sendo a característica ácida predominante entre os tratamentos deste sistema, enquanto no SmF o pH foi neutro, com valores em torno de 6,8 (Tabela 6). A quantidade de proteína total no sistema SSF (Tabela 7) foi significativamente maior que no SmF (Tabela 6), para os tratamentos, por ter maior quantidade de fonte de carbono, conseqüentemente liberando maior quantidade de proteínas, que é parte constituinte desses materiais. Os tratamentos com engaçó de bananeira tiveram os valores mais significativos entre os resíduos lignocelulósicos utilizados, tendo sido o tratamento com *A. oryzae* (T14) o que teve maior destaque (Tabela 7).

A explicação para esta expressividade do engaçó de bananeira pode ser em função do percentual de proteína total deste material, conforme apresentado na tabela 2 e o *A. oryzae* foi o fungo que teve os melhores resultados entre as holocelulases no sistema SSF e o que mais produziu açúcares redutores totais (DNS) e glicose (Kit GOD-POD) (Tabela 7). Segundo Mosier et al. (2005), o pH da hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos pré-tratados com água fervente sobre pressão deve ser controlado em torno de 4,5, favorecendo, assim, o ataque enzimático das celulasas.

Tabela 7. Determinação do valor de pH final, proteína total (Bradford), açúcar redutor total (DNS) e glicose (Kit GOD-POD) dos extratos brutos de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* crescidos em diferentes substratos lignocelulósicos pré-tratados como fonte de carbono na condição SSF.

Tratamentos (SSF)	pH (extratos brutos)	Proteína total Bradford (g.L ⁻¹)	Açúcar redutor total - DNS (g.L ⁻¹)	Glicose GOD-POD (g.L ⁻¹)
<i>T10_A.terreus_bagaço</i>	4,814	27,8±1,6	0,302±0,014	0,034±0,004
<i>T11_A.oryzae_bagaço</i>	4,739	55,2±2,8	0,682±0,007	0,178±0,020
<i>T12_E.nidulans_bagaço</i>	4,812	52,6±1,8	0,266±0,016	0,036±0,005
<i>T13_A.terreus_engaço</i>	5,379	127,9±7,9	0,716±0,022	0,081±0,011
<i>T14_A.oryzae_engaço</i>	4,658	163,4±0,6	2,073±0,021	0,322±0,023
<i>T15_E.nidulans_engaço</i>	5,386	122,1±3,6	0,377±0,018	0,032±0,006
<i>T16_A.terreus_p.algodão</i>	5,067	58,9±1,4	0,371±0,011	0,036±0,013
<i>T17_A.oryzae_p.algodão</i>	4,959	100,9±0,4	0,404±0,007	0,021±0,008
<i>T18_E.nidulans_p.algodão</i>	5,088	73,6±1,9	0,282±0,007	0,040±0,005

3.4 Eletroforese bidimensional e presença de proteínas N-glicosiladas

3.4.1 SDS-PAGE

Após a digestão enzimática com a enzima PNGase F dos filtrados das três espécies de *Aspergillus*, os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) revelaram mudanças na mobilidade, na intensidade e na definição das bandas correspondentes a amostras N-deglicosiladas de *A. nidulans*-SSF (Figura 7), em contraste com amostras provenientes de *A. oryzae*-SSF (Figura 7), que não mostraram diferenças entre o tratamento com e sem adição da enzima. Por outro lado, o perfil proteico de *A. terreus* revelou que, quando tratado com o tampão de digestão e adição de PNGase F, reduziu-se a quantidade de proteínas em relação à amostra controle, que não passou por nenhum tratamento (Figura 6).

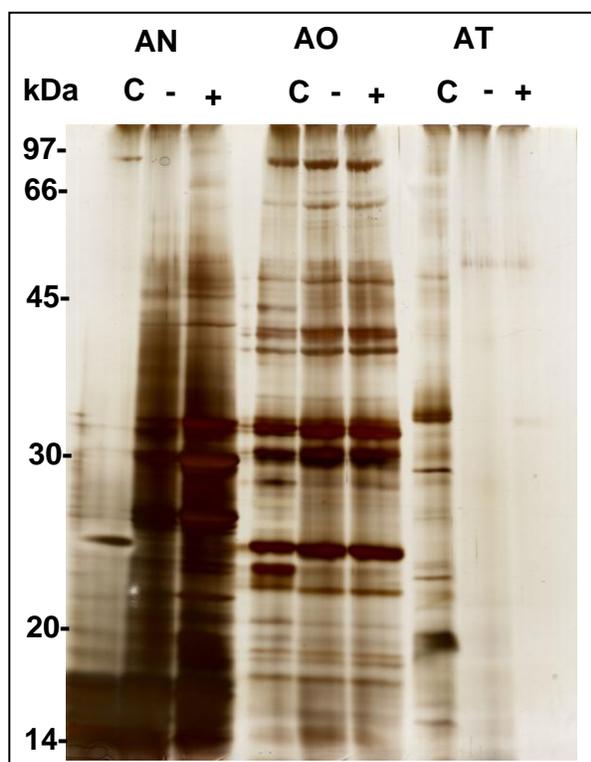


Figura 7. SDS-PAGE (12%) dos filtrados de *A. nidulans* (AN), *A. oryzae* (AO) e *A. terreus* (AT), a partir do crescimento em SSF utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono. Amostras sem tratamento (C), amostras tratadas, não digeridas com a PNGase F (-) e amostras tratadas e digeridas com PNGase F(+).

3.4.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Os perfis bidimensionais dos filtrados de *Aspergillus* sp. em SSF e SmF, sendo bagaço de cana-de-açúcar a fonte de carbono, foram obtidos na faixa de pH 4,0-7,0 que, segundo Gómez (2009), em perfis bidimensionais obtidos a partir do secretoma de *T. harzianum*, é a faixa de pH na qual se encontra maior número de *spots* e com melhor resolução.

As amostras tratadas com a enzima PNGase, cuja atividade é retirar N-glicanos da sequência proteica, revelaram, nos seus perfis bidimensionais, que a N-deglicosilação provoca mudanças no ponto isoelétrico das proteínas, como observado em géis 2DE de filtrados de *A. oryzae* SmF e SSF (Figuras 7 e 8, respectivamente). Mostraram também que, de modo geral, o gel proveniente da cultura SmF tem maior número de *spots* que o gel proveniente de SSF.

Este último resultado está em concordância com o que foi demonstrado por Oda *et al.* (2006), em pesquisas feitas com *A. oryzae* cultivado em farelo de trigo SmF e SSF. Neste trabalho, após 40 horas de cultura, foi realizada análise proteômica que revelou diferenças no perfil bidimensional e no tipo de proteínas secretadas nos dois tipos de cultura, permitindo a classificação das mesmas em proteínas secretadas exclusivamente em meio sólido, proteínas secretadas exclusivamente em meio submerso, proteínas encontradas nas duas condições de crescimento e proteínas ligadas à parede celular em meio submerso, achadas também em meio sólido.

Por outro lado, foi mostrado, nos perfis bidimensionais de *A. nidulans* SSF (Figura 9) e *A. terreus* SSF (Figura 10), que alguns *spots* desaparecem ou ganham resolução após a digestão enzimática.

A deglicosilação de amostras provenientes de fungos filamentosos é uma técnica empregada por diversos autores (Medina *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2006; Fryksdale *et al.*, 2002), uma vez que a adição de resíduos glicosilados é uma modificação comum em proteínas secretadas, proporcionando-lhes estabilidade e resistência frente a fatores externos, como mudanças de pH, calor e ataque proteolítico (Peberdy, 1994). Porém, a glicosilação de proteínas provoca alguns problemas na hora da análise eletroforética e na identificação de proteínas, devido ao incremento na massa molecular que dificulta a difusão das proteínas à primeira dimensão (IPG) e a obtenção de espectros de massas (Medina *et al.*, 2004)

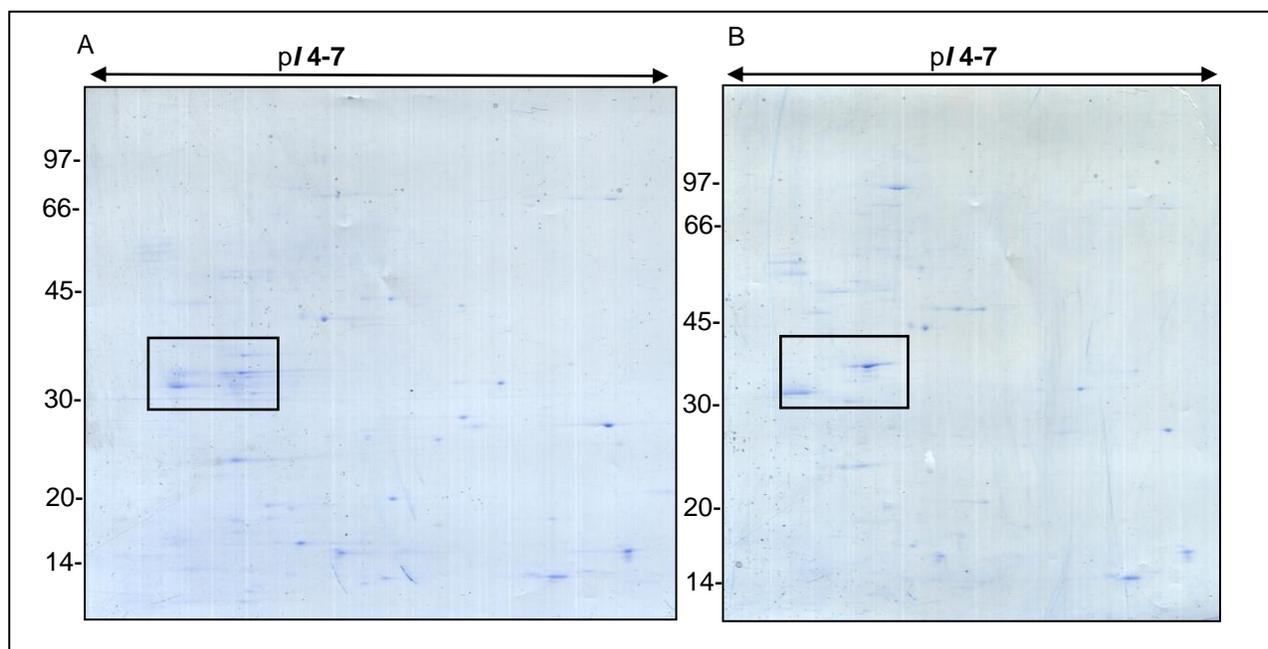


Figura 7. Perfil bidimensional do filtrado de *A. oryzae* cultivado em SSF usando bagaço de cana como fonte de carbono. Cada gel correu em strips pH 4-7 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 8%-15%, na segunda dimensão. Os géis correspondem a amostras tratadas sem digestão com PNGase F (A) e amostras digeridas com a enzima PNGase F (B). No quadro, exemplos de mudanças que aconteceram após o tratamento enzimático.

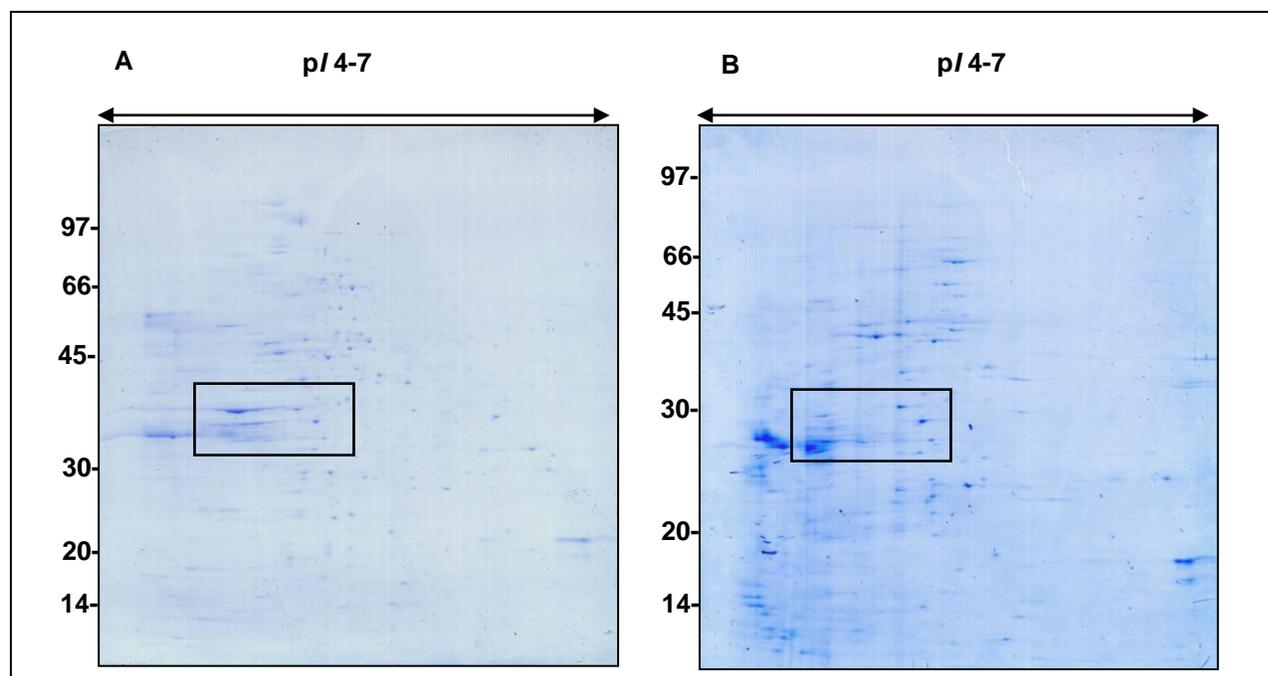


Figura 8. Perfil bidimensional do filtrado de *A. oryzae* cultivado em SmF usando bagaço de cana como fonte de carbono. Cada gel correu em strips pH 4-7 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 8%-15%, na segunda dimensão. Os géis correspondem a amostras tratadas sem digestão com PNGase F (A) e amostras digeridas com a enzima PNGase F (B). No quadro, exemplos de mudanças que aconteceram após o tratamento enzimático.

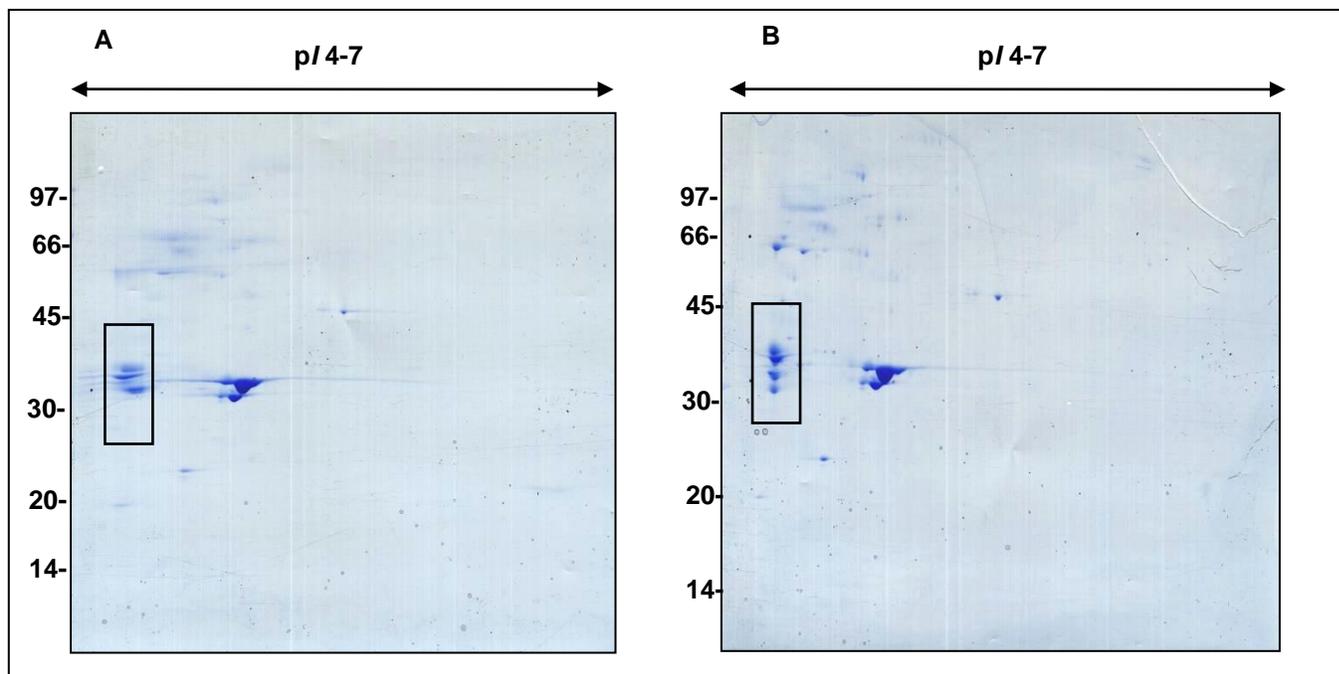


Figura 9. Perfil bidimensional do filtrado de *A. nidulans* cultivado em SSF usando bagaço de cana como fonte de carbono. Cada gel correu em strips pH 4-7 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 8%-15%, na segunda dimensão. Os géis correspondem a amostras tratadas sem digestão com PNGase F (A) e amostras digeridas com a enzima PNGase F (B). No quadro, exemplos de *spots* com maior resolução após o tratamento enzimático.

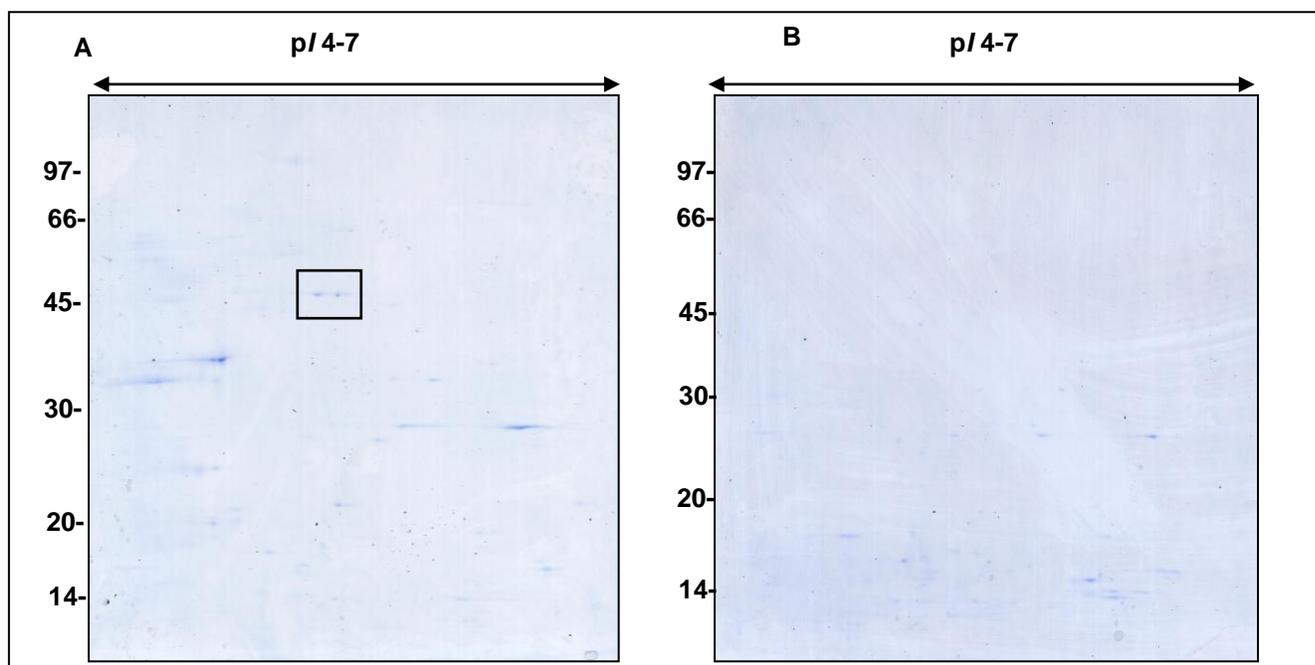


Figura 10. Perfil bidimensional do filtrado de *A. terreus* cultivado em SSF usando bagaço de cana como fonte de carbono. Cada gel correu em strips pH 4-7 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 8%-15%, na segunda dimensão. Os géis correspondem a amostras tratadas sem digestão com PNGase F (A) e amostras digeridas com a enzima PNGase F (B). No quadro, exemplos de *spots* que desapareceram após o tratamento enzimático.

4. Conclusões

O resíduo lignocelulósico engaçado de bananeira foi a fonte de carbono que teve maior relevância na produção de holocelulases com *A. terreus* no cultivo submerso (SmF) e com *A. oryzae* no cultivo SSF. No entanto, o bagaço de cana-de-açúcar e o piolho-de-algodão apresentaram valores expressivos, principalmente para as atividades de xilanase e pectinase. As celulases, como FPase e avicelase, não apresentaram, de modo geral, valores consideráveis de atividades, tanto nos tratamentos de SmF e SSF, como também nos ensaios com os substratos não tratados. Porém, as atividades de CMCase (endoglicanase) foram relevantes em *A. terreus*-engaçado (SmF) e em *A. oryzae*-engaçado na condição SSF.

Entre as condições de cultivo, as atividades de pectinase foram as que tiveram maior relevância em SSF, quando comparadas com o sistema SmF. As características quanto à temperatura e pH ótimos das holocelulases variaram, dependendo da forma de cultivo, do fungo e da fonte de carbono lignocelulósica utilizada nos tratamentos. Porém, maiores atividades, de modo geral, foram na faixa de 45° a 60°C, enquanto os pHs variaram entre ácido e neutro (celulases – CMCase, FPase e avicelase – xilanase e mananase), e alcalino, para maioria das pectinases, principalmente no cultivo submerso. O substrato engaçado de bananeira também apresentou os maiores teores de proteína total e açúcar redutor, contudo, assumiu uma coloração escura, mesmo após o pré-tratamento com autoclavagem e lavagem em ambos os tipos de cultivos. Esta característica é um fator importante, por apresentar teores significativos de extrativos totais, que podem interferir na confecção de gel para análise proteômica (uni ou bidimensional).

A eletroforese bidimensional dos filtrados fúngicos revelou perfis bidimensionais diferentes para cada espécie e quando comparados entre os tipos de cultivo (SmF e SSF), assim como diferenças resultantes do tratamento com a enzima PGNase. Porém, os estudos

proteômicos foram apenas preliminares, pois este trabalho continuará com o término da confecção de perfis uni e bidimensionais dos tratamentos que ainda não foram analisados, assim como a identificação de proteínas por espectrometria de massas.

5. Referências Bibliográficas

- ALI, S., A. SAYED. 1992. Regulation of cellulase biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **World Journal Microbiology & Biotechnology**. 8:73–75.
- ANDREAUS, J.; FERREIRA-FILHO; E.X.; BON, E.P.S. 2009. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: HOU, C.T; SHAW, J-F. **Biocatalysis and Bioenergy**. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey. pp. 196-229.
- BAGGA, P. S., D. K. SANDHU, AND S. SHARMA. 1990. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal Applied Bacteriology**. 68:61–68.
- BAIG, M.M.V.; BAIG, M.L.B., BAIG, M.I.A.; YASMEEN, M. 2004. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. **African Journal of Biotechnology**, 3: 447-450.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51:326-338
- BERKA, R.M.1991. Systems and approaches for expression and secretion of heterologous proteins in the filamentous fungus *Aspergillus niger* var. awamori: current status. **Ann New York Acad. Science**, 646:207–211.
- BHAT, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advanced.**, 18, 355-383.
- BONNIN, E., J. VIGOUREUX, AND J.-F. THIBAUT. 1997. Kinetic parameters of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by an exo- β -(1,4)-galactanase. **Enzyme Microbiology Technology**. 20:516–522.
- BUKHTOJAROV, F.E., USTINOV, B.B., SALANOVICH, T.N., ANTONOV, A.I., GUSAKOV, A.V., OKUNEV, O.N., SINITSYN, A.P. 2004. Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. **Biochemistry** (Moscow) 69:542-551.
- CHAUFON, S.M.; BATISTA, L.R. 2003. **Fungos associados a frutos e grão de café: *Aspergillus e Penicillium***. Embrapa Informação Tecnológica, 69p.

- COSTA, R. B.; SILVA, M.V.A.; FREITAS, S.P.; ALVES, F.C.; LEITÃO, V.S.F.; LACERDA, P.S.B.; FERRARA, M.A.; BOM, E.P.S. 2007. Enzimas industriais e especiais: mercado nacional e internacional. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- de VRIES, R. P.; VISSER, J. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 65, 4; 497–522.
- DESHPANDE, N.; WILKINS, M.R.; PACKER, N.; NEVALAINEN, H. 2008. Protein Glycosylation Pathways in Filamentous Fungi. **Glycobiology**, 18 (8)Ç 626-637)
- DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAN, R.F; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.6, p.1363-1369, 2003.
- FERREIRA-FILHO, E.X. 1998. Hemicellulases and biotechnology. In: Pandalai SG (ed) **Recent research developments in microbiology**. Research Signpost, Trivandrum, pp 165–176
- FRYKSDALE, B.; JEDRZEJEWSKI,; WONG, D.; GAERTNER, A.; MILLER, B. Impact of deglycosylation methods on two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for proteomic analysis, *Electrophoresis* **23** (2002), pp. 2184–2193
- GHANEM, N.B.; YUSEF, H.H.; MAHROUSE, H.K. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett±Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**, 73:113±121.
- GÓMEZ, D.P.M. 2009. **Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.
- GORBACHEVA, I. V., AND N. A. RODIONOVA. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. I. Purification and characterization of endo-1,4- α -xylanase from *Aspergillus niger* str. 14. **Biochimistry Biophysic Acta**, 484:79–93.
- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSE van RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. 2003. Lignocelulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal Biotechnology**, 2, 602-619.
- HRMOVÁ, M., E. PETRA´KOVA´, AND P. BIELY. 1991. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. **Journal General Microbiology**. 137:541 547.
- IVANOVA, G. S., O. P. BELETSKAYA, O. N. OKUNEV, E. L. GOLOVLEV, AND I. S. KULAEV. 1983. Fractionation of cellulase complex of the fungus *Aspergillus terreus*. **Applied Biochemistry Microbiology**. 19:275–281.

- KAMRA, D.N.; ZADRAZIL, F. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pre treatment on fruit-body formation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. **Agriculture Wastes**, 18:1–17
- KHALIL, A.I. 2002. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 18(8):753-759.
- KIM, Y.; HENDRICKSON, R.; MOSIER, N.S.; LADISCH, M.R. 2009. Liquid Hot Water Pretreatment of Cellulosic Biomass. **Biofuels Methods and Protocols**, MIELENS, J.R. Humana Press, 581, 93-102.
- LÓPEZ, J.L.C.; PÉREZ, J.A.S.; SEVILLA, J.M.F.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; GRIMA, E.M.; CHISTI, Y.. 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production, **Enzyme and Microbial Technology**, 33(2-3), 270-277.
- MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** São Paulo : USP, 1990. 136 p. Dissertação de Mestrado.
- MEDINA, M., URBAN, A., AND FRANCISCO, W. 2004 Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, 41(3):327-335.
- MILLER G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426–428.
- MOREIRA, L.R.S.; FILHO, E.X.F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology Biotechnology**, 79:165–178
- MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, 96(18), 1986-1993.
- ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K. 2006. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 72(5): 3448–3457
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, 77:149–162.
- PARODA, S., MISHRA, M. M. 1984. Growth and enzyme production by *Aspergillus terreus* in holocellulose. **Ann. Microbiol.** 135A:397–302
- PEBERDY, J. 1994. Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box, *Trends Biotechnol.* 12, pp. 50–57.
- PUSHALKAR, S.; RAO, K.K.; MENON, K.. 1995. Production of β -glucosidase by *Aspergillus terreus*. *Current Microbiology.* 30:255–258.

- ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J.O. 2001. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 36, 6, 887-891.
- SHANKARANAND, V.S.; RAMESH, M.V.; LONSANE, B.K. 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. **Process Biochemistry**, 27(1):33–36.
- SILVA, D. 1990 . Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: UFV. Imprensa Universitária, p. 165.
- SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal Microbiology**, 36, 3.
- SINGH, T.G.; VERMA, R.N. 1996. Studies on carbon and nitrogen of *Lentinula lateritia* (Berk.) Pegler strains from northeastern India. In: Royse, D.J. (ed.). **Mushroom Biology and Mushroom Products**. University Park, Pennsylvania, 45-354.
- SIQUEIRA, F.G.; FERREIRA-FILHO, E.X. 2010. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, 7, 54-60.
- STEWART, J.C.; PARRY, J. B.. 1981. Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). **Jounal Gen. Microbiol.** 125:33–39.
- THOM, C.; RAPER, K. B.. 1945. **A manual of the aspergilli**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- VINIEGRA-GONZALEZ G, FAVELA-TORRES E, AGUILAR CN, ROMERO-GOMEZ SJ, DIAZ-GODINEZ G, AUGUR, C. 2002. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. 1997. Solid state fermentations: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B.K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. eds. **Advances in Solid State Fermentation**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp 5–18.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. 2004. Basic Principles for the Production of Fungal Enzymes by Solid-State Fermentation. In: ARORA, D. K. 2004. Handbook of Fungal Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded, edited by National Bureau of Agriculturally Important Microorganisms New Delhi, India.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; , RÓMERO-GOMEZ, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ; G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, pp. 157–167, 2003.

- WONG, K. K.Y.; SADDLER, J. N. 1993. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G.P. (Eds.). **Hemicellulose and Hemicellulases** (pp. 127-143). London: Portland Press Research Monograph.
- XU, Z.; WANG, Q.; JIANG, Z.; YANG, X.-X.; JI, Y. 2007. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, 31 (2-3), 162-167.
- ZANETTI, A.L.; RANAL, M.A. 1997. Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. 'Florida'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32, 959-964.
- ZHANG, Y.-H.P.; HIMMEL, M.E. MIELENZ, J.R. 2006. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Adv.* 24, 452-481.

Capítulo VIII

Prospecção e Utilização de Fungos Filamentosos do Cerrado para Hidrólise Enzimática de Resíduos Agroindustriais

Félix Gonçalves de Siqueira¹; Eliane Gonçalves de Siqueira¹; Ingrid de Matos¹; Alan Thiago Jensen¹, Gilvan Caetano Duarte¹, Paula Marcela Duque Jaramillo¹, Antonielle Vieira Monclaro¹, Luís Roberto Batista², Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹;

¹Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular – Universidade de Brasília – UnB; ²Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Universidade Federal de Lavras – UFLA

RESUMO

A biodiversidade do Cerrado Brasileiro é descrita, na literatura, como muito rica em plantas e animais, porém, poucos trabalhos mencionam a riqueza dos microrganismos deste bioma, em especial os fungos filamentosos. Desse modo, o projeto de bioprospecção de fungos filamentosos do Cerrado, aprovado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e coordenado pelo Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, está buscando, junto a diferentes fitofisionomias do cerrado, como cerradão, mata de galeria, cerrado *sensu strictu*, campo sujo e campo limpo, fungos filamentosos com potencial biotecnológico. Neste primeiro trabalho, foram isolados quase duzentos fungos filamentosos do solo, serrapilheira e troncos em decomposição crescidos em três meios seletivos com temperaturas diferentes. Após a confirmação da viabilidade dos isolados mantidos e conservados em meios

com glicerol 18%, óleo mineral e água salina 0,9%, todos em temperatura ambiente e também em criotubos com glicerol 18% a -80°C, estes foram cultivados em meio líquido, com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono para a determinação do potencial de holocelulases. Atividade de xilanase foi a que mais se destacou para a maioria dos isolados, tanto a 28° quanto a 38°C, porém, alguns isolados mostraram valores significativos para endoglucase (CMCase) quando crescido, por exemplo, em engaço de bananeira a 38°C.

1. Introdução

O cerrado ocupa 21% do território nacional, sendo o segundo maior bioma brasileiro, apenas superado em área pela região da Amazônia. O termo “cerrado” é utilizado na designação do conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campo e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central. O clima é estacional, sendo caracterizado por um período chuvoso (de outubro a março) seguido de seca (de abril a setembro). A precipitação média anual é de 1.500 mm³ e as temperaturas médias anuais ficam entre 22°C e 27°C. Os solos desse ecossistema são ácidos e desprovidos de nutrientes, sendo, no entanto, muito ricos em alumínio. Apesar da pobreza dos solos, grandes extensões de terra dentro do bioma Cerrado vêm sendo cada vez mais ocupadas pela agricultura e pecuária. Dentre os 2 milhões de km² de bioma nativo, 55% já foram desmatados ou transformados pela ação humana (Klink & Machado, 2005).

As crescentes transformações ocorridas no Cerrado causam graves consequências ambientais, como fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e, possivelmente, modificações climáticas regionais (Klink & Machado, 2005).

O Cerrado apresenta grande biodiversidade e alto nível de endemismos, o que o caracteriza como a savana tropical mais diversificada do mundo. Há 7.000 espécies de plantas, 199 de mamíferos, 837 de aves, 180 de répteis, 150 de anfíbios e 1.200 espécies de peixes (Klink & Machado, 2005). Além disso, há grande diversidade de microrganismos, como fungos, algas, actinomicetos, protozoários e de invertebrados, como artrópodes, insetos, anelídeos, nematoides e moluscos (Dutra *et al.*, 2005).

A microbiota fúngica é um elemento muito importante dentro da ecologia das comunidades, devido à sua função crucial na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e remoção de toxinas. Os fungos saprófitos atuam na decomposição de polímeros estruturais de plantas, como celulose, hemicelulose e lignina, contribuindo para a manutenção global do ciclo de carbono. Eles também produzem moléculas orgânicas e enzimas de interesse comercial, sendo cada vez mais utilizados na biotecnologia (Carvalho, 2008).

Dentre os numerosos fungos não patogênicos produtores de enzimas hidrolíticas úteis, os fungos filamentosos se destacam, dados seu fácil cultivo e sua alta produção de enzimas extracelulares com amplo potencial de aplicação industrial. Uma importante aplicação do potencial biotecnológico desses fungos é a produção de enzimas a partir da hidrólise de resíduos agrícolas, que são acumulados em grandes depósitos, todos os anos. Esses resíduos são matéria-prima lignocelulósica para a produção enzimática, sendo, ao mesmo tempo, fonte de carbono (energia) para os fungos. A aplicação biotecnológica de enzimas fúngicas para a degradação de resíduos agrícolas agrega valor à matéria-prima antes inutilizada, promovendo o estímulo à reciclagem desses materiais e criando novas perspectivas de produção de insumos industriais de maneira menos tóxica ao meio ambiente.

Com função estrutural e de proteção contra patógenos e contra herbivoria, a lignocelulose da parede celular é o maior componente da biomassa vegetal, compreendendo cerca da metade do produto fotossintético das plantas e representa a fonte orgânica mais abundante no solo. Ela é formada pelos três tipos de polímeros já citados, a celulose, a hemicelulose e a lignina (Figura 1). Estes polímeros estão fortemente interligados e quimicamente atraídos por forças não covalentes e por ligações covalentes cruzadas (Sánchez, 2009).

A parede celular é composta de lamela média, parede primária e parede secundária. A celulose compõe, em massa seca, cerca de 15% a 30% da parede primária e 40% da parede secundária. É um polímero composto de monômeros de D-glicose conectados por ligações glicosídicas β -1,4, formando o dímero celobiose, formando longas cadeias ligadas por pontes de hidrogênio e forças de *van der Waals*. A celulose (Figura 1), em geral, é encontrada como uma forma cristalina e com pequena quantidade de cadeias desorganizadas compostas de celulose amorfa. Nesta conformação, a celulose é mais suscetível à degradação enzimática. Na natureza, a celulose aparece associada com outros componentes vegetais e essa associação pode afetar a sua biodegradação (Sánchez, 2009).

A hemicelulose é um polissacarídeo de menor peso molecular do que a celulose (Figura 1). É formada de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose e dos ácidos 4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico. A composição de hemicelulose na planta, dependendo da espécie, pode ser de 20% a 40% da parede celular. Os açúcares estão ligados por ligações glicosídicas β -1,4 e, às vezes, por β -1,3 (Sánchez, 2009).

A lignina constitui cerca de 10% a 25% da parede secundária e é ligada tanto à celulose quanto à hemicelulose, formando uma barreira com função de suporte estrutural,

impermeabilização e resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo (Figura 1). É um heteropolímero amorfo, insolúvel em água, formado por unidades de fenilpropano unidas entre si por ligações não hidrolisáveis (Sánchez, 2009) que, por sua vez, são ligados a uma rede de celulose e xilose por ligações éster, fenil ou covalentes (Morais et al., 2005).

Outro componente da parede celular é a pectina, que representa cerca de 35% da massa seca da planta e é composta de vários polissacarídeos, contendo, caracteristicamente, açúcares ácidos, como ácido galacturônico e açúcares neutros, tais como ramnose, galactose e arabinose. Na parede, elas são moléculas muito grandes e complexas, compostas de diferentes domínios de polissacarídeos pécticos, presumivelmente unidos por ligações covalentes e não-covalentes (Taiz & Zaiger, 2009). Os papéis exercidos pela pectina são a troca de íons entre as células, o ajuste de pH, o estabelecimento da porosidade da parede celular, assim como a sinalização para a presença de microrganismos ou insetos.

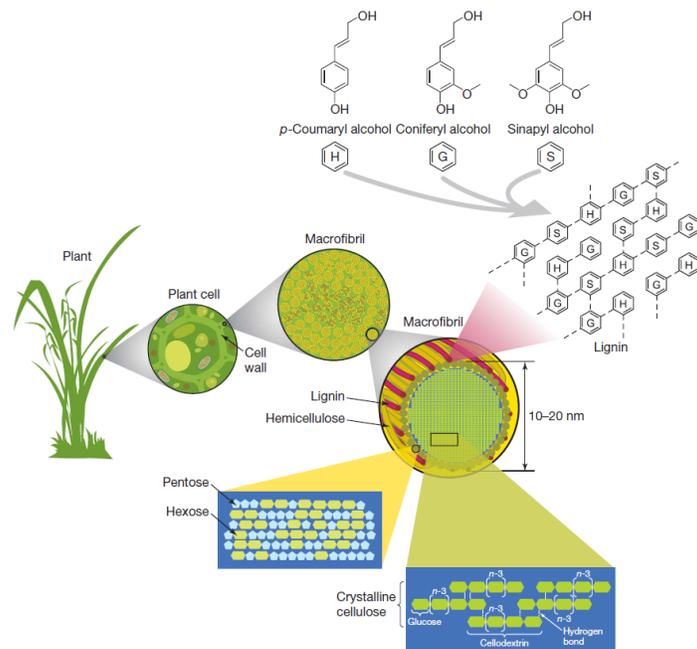


Figura 1. Composição de resíduos lignocelulósicos da parede celular da planta (Imagem: RUBIN, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. Nature, v. 454.).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de proceder o isolamento e à identificação de fungos filamentosos produtores de celulases e hemicelulases, provenientes de diferentes camadas de compostagem natural de manchas de cerrado preservado, situado no entorno do Distrito Federal. Pretendeu-se fazer um levantamento da biodiversidade da microbiota fúngica do Cerrado, tendo em vista o seu potencial biotecnológico, por meio do cultivo das cepas isoladas em meio submerso com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, determinando as atividades enzimáticas das holocelulases nos extratos brutos.

2. Materiais e Métodos

O local escolhido para a realização da coleta dos materiais em decomposição foi uma fazenda de 600 hectares, com uma área de cerrado muito bem preservado (80%), situada entre os municípios Planaltina de Goiás, Água Fria, Padre Bernardo e Mimoso, numa região próxima ao povoado Mato Seco, no entorno do Distrito Federal. A coleta desse material contou com a valiosa participação do proprietário da Fazenda. As amostras de compostagem natural para o isolamento dos fungos foram coletadas do solo (10 cm de profundidade – tubo cilíndrico de metal), serrapilheira e troncos em decomposição. Cada tipo de amostra foi retirado de diferentes fitofisionomias do Cerrado, como cerradão, mata ciliar, cerrado *sensu stricto* denso, campo sujo e campo limpo. Juntamente com essas amostras, foram coletados cogumelos diversos.

Na figura 2 é apresentada organograma geral da coleta de amostras de solo, serrapilheira e troncos em decomposição até o cultivo em meios de cultura, em diferentes temperaturas de incubação.

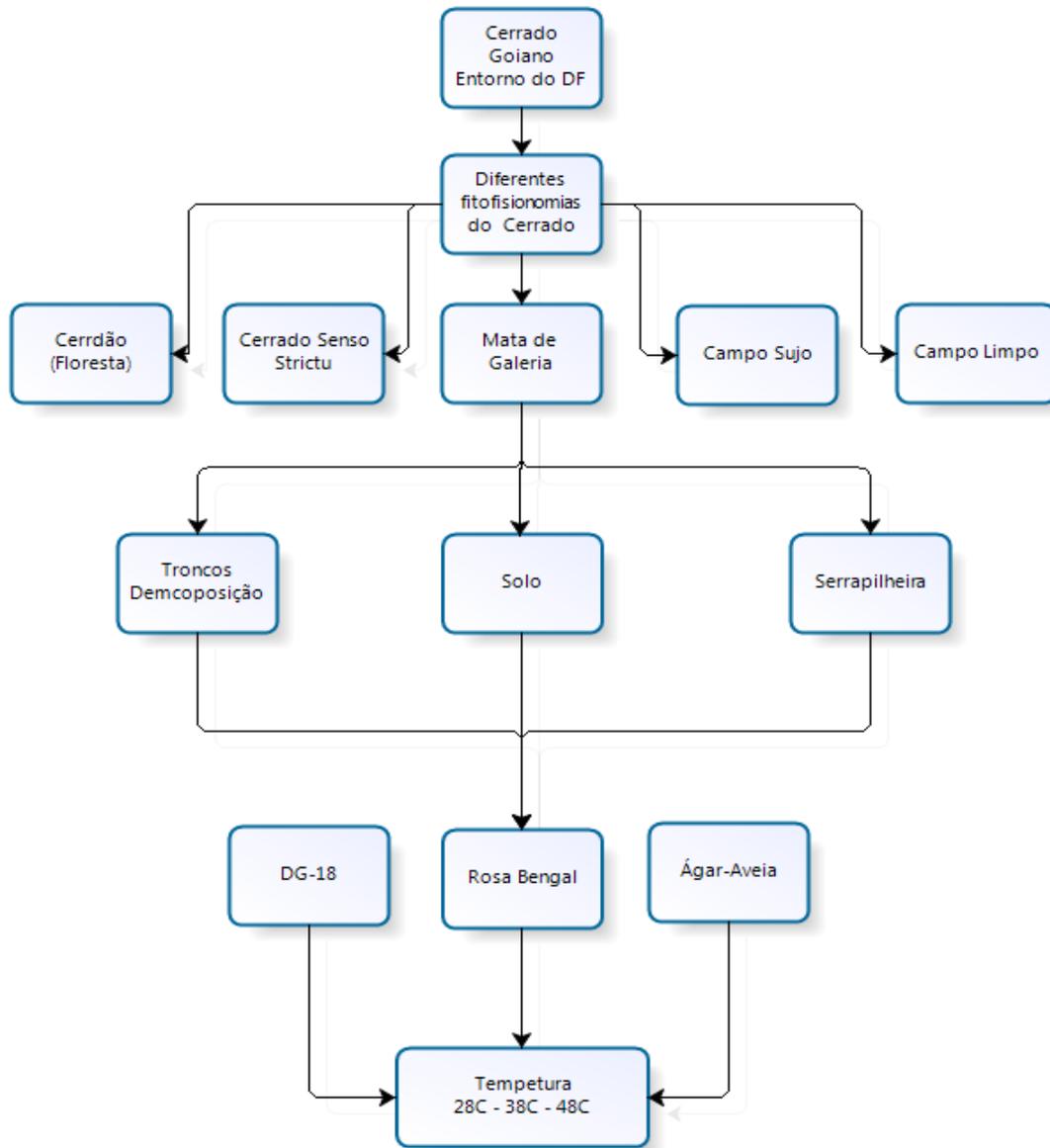


Figura 2. Organograma geral da coleta das amostras do solo, serrapilheira e troncos em decomposição, até o cultivo em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação do crescimento micelial

2.1 Preparo das amostras de compostagem natural

As amostras de solo, serrapilheira e tronco foram moídas e homogeneizadas durante doze horas em um moedor de bolas e, depois, trituradas num triturador elétrico (Skymesen).

2.2 Isolamento dos fungos filamentosos

Para realizar o isolamento dos fungos, foi utilizado o método de plaqueamento direto e diluição seriada em placas de Petri, contendo os seguintes meios de cultura:

- DRCB (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol), (King *et al.*, 1979);
- DG 18 (Dicloran Glicerol 18%), (Hocking & Pitt, 1980);
- Ágar aveia 4% (20 g de farinha de aveia, 12,5 g de ágar) contendo antibiótico 100 ppm (streptomicina, penicilina ou tetraciclina).

A diluição seriada foi realizada pesando-se 100 g de amostra de tronco moído (e depois solo peneirado), que veio ser misturada a 900 ml de solução salina 0,9% autoclavada. A diluição é prosseguida até 10^3 . São retiradas alíquotas de 100 μ l de cada diluição (10^0 , 10^2 e 10^3) para o plaqueamento direto nos meios de culturas já citados. A diluição e o plaqueamento foram feitos em triplicata. As placas foram incubadas a três temperaturas, 28°C, 38°C e 45°C. Aquelas contendo meio ágar-aveia permaneceram incubadas por cerca de três dias, sendo este o tempo médio para aparecimento das colônias. Já as placas contendo meio DRBC e DG18 permaneceram incubadas entre cinco e sete dias. Ao término do tempo de incubação, foi feita a contagem de colônias e extraída a raiz quadrada do número de colônias. No valor resultante, foi baseada a escolha de quantas diferentes colônias seriam repicadas para se proceder ao isolamento.

Adotou-se também o procedimento de inóculo direto de pequenas quantidades de amostra de compostagem (solo, tronco e serrapilheira) em placas contendo meio de cultura como alternativa adicional ao isolamento de colônias, visto que nem sempre o plaqueamento direto das três diluições resultou em colônias numerosas.

As diferentes colônias escolhidas (tanto das placas submetidas a plaqueamento direto quanto aquelas submetidas a inóculo direto de amostra) foram submetidas a subculturas periódicas até a purificação de cada morfoespécie. Os critérios para a obtenção das subculturas basearam-se na macromorfologia das colônias, como cor, textura, presença ou não de esporos e grau de crescimento (lento ou rápido).

2.3 Isolamento dos cogumelos

Os cogumelos foram desinfetados por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 1%, sendo depois seccionados radialmente, para a retirada uma porção menos contaminada e mais preservada do corpo de frutificação visando, seu cultivo no meio ágar-aveia 4%, contendo antibiótico 100 ppm (streptomicina, penicilina ou tetraciclina).

Os micélios que foram se desenvolvendo nas placas foram também submetidos a subculturas periódicas, até a purificação de cada morfoespécie.

Os fungos filamentosos que se desenvolviam nas placas de subcultura durante o isolamento dos cogumelos também foram isolados, da mesma forma descrita antes para o isolamento de fungos filamentosos, exceto por terem sido incubados apenas à temperatura de 28°C em placas contendo apenas meio ágar-aveia 4% com antibiótico.

2.4 Conservação dos fungos filamentosos

- À temperatura ambiente

Cada fungo filamentoso foi repicado em três pequenos tubos (penicilina frascos) contendo 5 mL (inclinado) do respectivo meio de cultura do qual foi isolado. Quando a colônia atingiu um crescimento ótimo, foram adicionados aos respectivos tubos água salina estéril 0,9 %, glicerol 18% e óleo mineral.

- Em deep-freezer a -80°C

Ainda em fase de teste, o estocamento em -80°C é feito a partir do crescimento do fungo em meio de serragem (1,5 g de serragem moída, lavada e autoclavada; 0,45g de farelo de arroz e 3,5 ml de água destilada ajustada para 64%) e em meio de aveia (seguindo o mesmo protocolo do meio de serragem, exceto por substituir a serragem por 1,5 g de farelo de aveia) por cerca de 3 semanas (sendo uma semana no escuro e duas no claro), com posterior adição de um agente crioprotetor (glicerol 10%) e transferência direta para o deep-freezer a -80°C, sem pré-congelamento linear (Kitamoto *et al.*, 2002).

2.5 Identificação dos fungos

Os fungos isolados que apresentaram resultados significativos para a produção de holocelulases com xilanase, mananase, pectinase FPase, CMCase e avicelase foram enviados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para serem identificados, sob a supervisão do professor Dr. Luís Roberto Batista.

2.6 Cultivo em condições submersas

Inoculou-se 1 mL de solução de esporos em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido com 1% de fonte de carbono (resíduos lignocelulósicos). Cada cultivo em cada fonte de carbono foi feito em triplicata.

- Meio de cultura líquido (1 L): KH_2PO_4 (7 g); K_2HPO_4 (2 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); extrato de levedura 0,6 g.
- Fontes de carbono: bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e piolho-de- algodão-sujo (resíduo da indústria de re-beneficiamento de fibras de algodão).

O cultivo de cada fungo foi realizado na mesma temperatura do isolamento, durante 5 dias, sob agitação de 120 rpm, em agitador rotatório (*Shaker*) de bancada.

2.7 Obtenção do extrato bruto

Após os cinco dias de cultivo, o material foi filtrado a vácuo com papel filtro, separando o extrato bruto dos resíduos do meio de cultura e micélio. Os extratos brutos foram armazenados em tubos Falcon a 4°C (em triplicata), após a adição de azida nos frascos, para evitar o crescimento de microrganismos.

2.8 Ensaio enzimáticos

Os ensaios enzimáticos para CMCase, mananase, xilanase, pectinase, FPase e avicelase foram executados conforme os protocolos descritos no Capítulo II.

3. Resultados e discussões

O número de fungos isolados no fitofisionoma cerrado foi de quase duzentos, sendo divididos de acordo com o local de coleta, o meio de cultura de plaqueamento e a temperatura de incubação (Tabela 1). O meio rosabengal apresentou o maior número de isolados, principalmente provenientes do solo e troncos em decomposição, à temperatura de 28°C. Neste mesmo meio ocorreu o isolamento de algumas cepas capazes de crescer a temperaturas de 38° e 45°C, como também no meio ágar-aveia, enquanto o DG-18 apresentou poucos isolados a 38°C e nenhum a 45°C. Fungos filamentosos com capacidade de crescer em temperaturas acima de 40°C podem ser importantes para processos biotecnológicos e apresentar metabólitos primários e secundários capazes de suportar temperaturas elevadas que podem ocorrer em processos industriais (Sánchez, 2009; Moreira *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2001).

Tabela 1. Número de fungos filamentosos isolados na prospecção do fitofisionoma cerrado-floresta do Cerrado Brasileiro.

Meio de cultura (isolamento)	Local de coleta na fitofisionomia Cerradão-Floresta									Número total de isolados
	Solo			Serrapilheira			Troncos em decomposição			
	Temperatura (°C)									
	28°C	38°C	45°C	28°C	38°C	45°C	28°C	38°C	45°C	
Ágar-aveia	18	8	9	3	-	-	1	8	7	54
Rosa bengal	30	7	6	8	2	1	21	12	5	86
DG-18	17	8	-	12	6	-	9	3	-	55

Os fungos isolados do fitofisionoma foram submetidos a métodos de conservação após crescimento nos respectivos meios de cultura do isolamento inclinado em tubos (frascos de

penicilina). Após a total colonização do meio de cultura, cada isolado foi coberto com óleo mineral, ou glicerol 18%, ou água salina 0,9% estéril, de acordo com protocolos estabelecidos na literatura (Ryan *et al.*, 2000; Lima & Borba, 2001; Nakasone *et al.*, 2004; Diogo *et al.*, 2005). Os isolados também foram mantidos em criotubos com glicerol 18%, à temperatura de -80°C (Deep-Freezer). Após confirmação da viabilidade dos isolados nas diferentes formas de manutenção, estes foram enviados para identificação. Também foram realizados os cultivos dos mesmos em meio submerso com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono.

Os resultados das holocelulases dos extratos brutos obtidos dos isolados em ágar-aveia, DG-18 e Rosa-Bengal estão listados, respectivamente, nas tabelas 2, 3 e 4. Oito isolados de ágar-aveia que apresentaram viabilidade no processo de manutenção, dos quais quatro foram cultivados a 28°C e mais quatro a 38°C, tiveram os resultados mais expressivos para xilanase, dentre as holocelulases testadas. O isolado ACFS_14 foi o que apresentou os melhores resultados para esta atividade enzimática, principalmente quando crescido a 28°C em bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira (Tabela 2). No entanto, o pilho-de-algodão-sujo teve valores relevantes nos isolados ACFSP-05 e ACFSP-06, quando crescido a 38°C e a 28°C, respectivamente. O destaque para a atividade de pectinase também foi o isolado ACFS_14, nas mesmas condições descritas para xilanase, enquanto as atividades de mananase e celulase (CMCase, FPase e avicelase) não apresentaram valores relevantes.

Foram cultivados treze isolados do meio de cultura DG-18, sendo nove a 28°C e quatro a 38°C (Tabela 3). Novamente, a atividade de xilanase foi mais expressiva, porém, alguns extratos brutos apresentaram valores consideráveis para mananase, pectinase, CMCase e FPase. Os isolados D_CFS_11; D_CFS_P_6; D_CFS_P_8 e D_CFT_P_6 foram os que mais se destacaram para estas atividades enzimáticas mencionadas. O isolado D_CFS_11 teve destaque para

atividade de CMCase, como também para xilanase e manase, nas três fontes de carbono testadas (Tabela 3). O bagaço de cana-de-açúcar foi o substrato mais eficiente para atividade de xilanase dos extratos brutos dos isolados do meio DG-18, principalmente a 28°C. No entanto, foi na temperatura de 38°C, com o isolado D_CFS_P_7 crescido em bagaço de cana-de-açúcar, que se obteve o maior valor para xilanase, com 1,036 UI.mL⁻¹, como também o D_CFS_P_6, para os três substratos, com valores acima de 0,73 UI.mL⁻¹ (Tabela 3).

O meio de cultura rosa-bengal foi o que apresentou o maior número de isolados de fungos filamentosos, dentre os três meios de isolamento testados (Tabela 1). Do montante de isolados neste meio, onze foram cultivados nas condições descritas neste trabalho (Tabela 4), sendo a atividade de xilanase a mais expressiva, como foi visto também com os outros fungos isolados dos outros dois meios de isolamento. O tratamento que levou engaço de bananeira como fonte de carbono para o isolado RCFSP2 (T16) a 38°C foi que teve maior relevância para as atividades de xilanase, mananase, pectinase, CMCase e FPase (Tabela 4). Estas duas últimas atividades foram as mais expressivas dentre todos os tratamentos testados, nas diferentes condições mencionadas nas tabelas 2, 3, e 4, com valores de 0,31 UI.mL⁻¹ e 0,240 UI.mL⁻¹, respectivamente, mostrando, assim, que este isolado, RCFSP2 (T16), pode ser um fungo com potenciais biotecnológicos, merecendo maior atenção em estudos futuros, principalmente por ter condição de cultivo próximo de 40°C. Segundo Turner *et al.* (2007), enzimas extracelulares, geralmente, apresentam alta termoestabilidade, tendo algumas enzimas termoestáveis sido identificados a partir de cultivos de microrganismos em temperaturas mais baixas. Entre as razões fundamentais para escolher as enzimas termoestáveis em processos de biotransformação estão possibilidade do uso em processos em temperaturas elevadas, maior tolerância a solventes orgânicos e risco reduzido de contaminação (Turner *et al.*, 2007).

A busca por enzimas mais estáveis para aplicações biotecnológicas faz parte do contexto de muitas pesquisas, na atualidade. Com isso, cresce o interesse por enzimas fúngicas extracelulares com características físico-químicas termoestáveis que possam baratear os custos de produção de materiais industriais, como xilanases, por exemplo, em tratamento de polpa de papel kraft (Medeiros *et al.*, 2003; Palaniswamy *et al.*, 2008). Palaniswamy *et al.*, (2008) isolaram 53 fungos filamentosos degradadores de serrapilheira de diferentes ecossistemas da Índia, os quais apresentaram consideráveis atividade de xilanase, como endo- β -1,4-xylanase (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8) e β -D-xylosidase (1,4- β -xylan xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.37), quando crescidos em meio submerso com arabinoxilana como fonte de carbono. Quarenta fungos filamentosos foram isolados de solo, húmus, compostos para produção de cogumelos, resíduos de plantas do cerrado e resíduos das plantações de cana-de-açúcar do estado de São Paulo, Brasil, dos quais 23 apresentaram atividades relevantes para xilanase, pectinase e outras enzimas (Guimarães *et al.*, 2006).

Tabela 2. Atividades de holocelulases dos extratos brutos dos fungos filamentosos isolados do fitofisionoma cerradão-floresta do Cerrado brasileiro, usando método de espalhamento em meio de cultura em placa de Petri com o meio específico ágar-aveia.

Isolados e Fontes de Carbono	Temperatura de isolamento e cultivo (°C)	Hemicelulases & pectinases						Celulases											
		Atividades (UI.mL ⁻¹)																	
		Xilanase		Mananase		Poligalacturonase		CMCase		FPase		Avicelase							
T1_ACFSP-06_Bag		0,306	±	0,078	0,023	±	0,004	0,033	±	0,013	0,032	±	0,003	0,012	±	0,005	0,000	±	0,000
T2_ACFSP-06_Eng	38	0,053	±	0,006	0,018	±	0,005	0,052	±	0,014	0,007	±	0,013	0,003	±	0,001	0,000	±	0,000
T3_ACFSP-06_Alg		0,046	±	0,011	0,015	±	0,003	0,075	±	0,064	0,024	±	0,012	0,007	±	0,009	0,000	±	0,000
T4_ACFS-15_Bag		0,068	±	0,013	0,115	±	0,014	0,067	±	0,026	0,025	±	0,017	0,009	±	0,012	0,000	±	0,000
T5_ACFS-15_Eng	28	0,035	±	0,014	0,083	±	0,067	0,067	±	0,055	0,018	±	0,005	0,008	±	0,011	0,000	±	0,000
T6_ACFS-15_Alg		0,035	±	0,018	0,064	±	0,021	0,067	±	0,022	0,015	±	0,004	0,010	±	0,014	0,000	±	0,000
T7_ACFS-14_Bag		0,613	±	0,037	0,013	±	0,001	0,146	±	0,031	0,023	±	0,003	0,014	±	0,010	0,000	±	0,000
T8_ACFS-14_Eng	28	0,508	±	0,048	0,017	±	0,001	0,223	±	0,101	0,024	±	0,001	0,012	±	0,005	0,000	±	0,000
T9_ACFS-14_Alg		0,282	±	0,044	0,019	±	0,004	0,213	±	0,051	0,019	±	0,008	0,019	±	0,006	0,000	±	0,000
T10_ACFSP-05_Bag		0,189	±	0,044	0,021	±	0,006	0,075	±	0,010	0,015	±	0,003	0,011	±	0,015	0,000	±	0,000
T11_ACFSP-05_Eng	38	0,042	±	0,014	0,017	±	0,002	0,062	±	0,063	0,022	±	0,009	0,009	±	0,009	0,000	±	0,000
T12_ACFSP-05_Alg		0,451	±	0,028	0,025	±	0,004	0,055	±	0,058	0,023	±	0,010	0,016	±	0,004	0,000	±	0,000
T13_ACFT-06_Bag		0,100	±	0,038	0,025	±	0,007	0,070	±	0,032	0,016	±	0,002	0,010	±	0,014	0,000	±	0,000
T14_ACFT-06_Eng	28	0,085	±	0,005	0,062	±	0,018	0,069	±	0,071	0,014	±	0,005	0,021	±	0,033	0,000	±	0,000
T15_ACFT-06_Alg		0,503	±	0,319	0,049	±	0,005	0,148	±	0,035	0,033	±	0,019	0,014	±	0,012	0,000	±	0,000

T16_ACFSP-05_Bag		0,028 ± 0,040	0,012 ± 0,000	0,050 ± 0,056	0,018 ± 0,007	0,011 ± 0,005	0,000 ± 0,000
T17_ACFSP-05_Eng	38	0,089 ± 0,059	0,012 ± 0,000	0,052 ± 0,038	0,017 ± 0,005	0,010 ± 0,013	0,000 ± 0,000
T18_ACFSP-05_ Alg		0,040 ± 0,012	0,012 ± 0,000	0,051 ± 0,049	0,019 ± 0,004	0,013 ± 0,008	0,000 ± 0,000
T19_ACFTP-01_Bag		0,185 ± 0,076	0,016 ± 0,005	0,082 ± 0,021	0,013 ± 0,014	0,010 ± 0,011	0,000 ± 0,000
T20_ACFTP-01_Eng	38	0,059 ± 0,021	0,012 ± 0,000	0,086 ± 0,005	0,013 ± 0,001	0,011 ± 0,010	0,000 ± 0,000
T21_ACFTP-01_ Alg		0,261 ± 0,017	0,012 ± 0,000	0,076 ± 0,023	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,013	0,000 ± 0,000
T22_ACFS-02_Bag		0,017 ± 0,005	0,012 ± 0,000	0,057 ± 0,050	0,012 ± 0,000	0,014 ± 0,006	0,000 ± 0,000
T23_ACFS-02_Eng	28	0,026 ± 0,013	0,014 ± 0,004	0,044 ± 0,057	0,012 ± 0,000	0,009 ± 0,011	0,000 ± 0,000
T24_ACFS-02_ Alg		0,136 ± 0,021	0,014 ± 0,003	0,045 ± 0,059	0,014 ± 0,003	0,009 ± 0,011	0,000 ± 0,000

Tabela 3. Atividades de holocelulases dos extratos brutos dos fungos filamentosos isolados do fitofisionoma cerradão-floresta do Cerrado brasileiro, usando método de espalhamento em meio de cultura em placa de Petri com o meio específico DG-18.

Isolados e	Temperatura de isolamento e cultivo (°C)	Hemicelulases & pectinases						Celulases					
		Atividades (UI.mL ⁻¹)											
		Xilanase		Mananase		Poligalacturonase		CMCase		FPase		Avicelase	
T1_D_CFS_P_4_Bag	38	0,042 ± 0,009	0,036 ± 0,003	0	± 0,028	0,027 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,004 ± 0,003					
T2_D_CFS_P_4_Eng		0,049 ± 0,018	0,027 ± 0,001	0,006 ± 0,018	0,021 ± 0,006	0,013 ± 0,004	0,003 ± 0,001						
T3_D_CFS_P_4_Alg		0,269 ± 0,016	0,037 ± 0,010	0,052 ± 0,026	0,039 ± 0,004	0,008 ± 0,003	0,004 ± 0,003						
T3_D_CFS_11_Bag	28	0,790 ± 0,041	0,137 ± 0,022	0,026 ± 0,020	0,263 ± 0,023	0,102 ± 0,012	0,021 ± 0,003						
T4_D_CFS_11_Eng		0,825 ± 0,028	0,280 ± 0,025	0,034 ± 0,013	0,251 ± 0,016	0,091 ± 0,007	0,033 ± 0,001						
T5_D_CFS_11_Alg		0,780 ± 0,006	0,188 ± 0,014	0,067 ± 0,019	0,227 ± 0,024	0,071 ± 0,003	0,006 ± 0,001						
T6_D_CFS_10_Bag	28	0,044 ± 0,006	0,029 ± 0,009	0,056 ± 0,015	0,025 ± 0,003	0,001 ± 0,003	0,010 ± 0,002						
T7_D_CFS_10_Eng		0,029 ± 0,007	0,033 ± 0,003	0,044 ± 0,019	0,029 ± 0,002	0,000 ± 0,004	0,009 ± 0,002						
T8_D_CFS_10_Alg		0,028 ± 0,003	0,028 ± 0,001	0,034 ± 0,018	0,032 ± 0,001	0,000 ± 0,004	0,007 ± 0,003						
T9_D_CFS_9_Bag	28	0,049 ± 0,007	0,020 ± 0,005	0	± 0,020	0,031 ± 0,007	0,006 ± 0,002	0,011 ± 0,002					
T10_D_CFS_9_Eng		0,584 ± 0,008	0,282 ± 0,019	0,254 ± 0,024	0,129 ± 0,013	0,070 ± 0,006	0,009 ± 0,001						
T11_D_CFS_9_Alg		0,159 ± 0,008	0,017 ± 0,005	0	± 0,012	0,041 ± 0,019	0,008 ± 0,003	0,005 ± 0,003					
T12_D_CFF_P_5_Bag	28	0	± 0,007	0	± 0,009	0	± 0,015	0	± 0,004	0,007 ± 0,002	0,009 ± 0,003		
T13_D_CFF_P_5_Eng		0,439 ± 0,008	0	± 0,023	0,053 ± 0,003	0	± 0,008	0,155 ± 0,010	0,009 ± 0,001				
T14_D_CFF_P_5_Alg		0	± 0,008	0	± 0,016	0,110 ± 0,035	0	± 0,017	0,139 ± 0,006	0,005 ± 0,003			
T15_D_CFS_P_6_Bag	38	0,889 ± 0,058	0,092 ± 0,003	0,009 ± 0,019	0,186 ± 0,016	0,134 ± 0,008	0,009 ± 0,002						
T16_D_CFS_P_6_Eng		0,863 ± 0,034	0,129 ± 0,015	0,115 ± 0,020	0,207 ± 0,011	0,156 ± 0,012	0,008 ± 0,001						
T17_D_CFS_P_6_Alg		0,732 ± 0,018	0,023 ± 0,005	0,009 ± 0,013	0,128 ± 0,016	0,086 ± 0,005	0,006 ± 0,001						
T18_D_CFS_8_Bag	28	0,676 ± 0,008	0,024 ± 0,011	0,114 ± 0,015	0,045 ± 0,014	0,042 ± 0,002	0,002 ± 0,002						
T19_D_CFS_8_Eng		0,070 ± 0,007	0,020 ± 0,002	0,041 ± 0,016	0,007 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,002						
T20_D_CFS_8_Alg		0,139 ± 0,029	0,040 ± 0,007	0,052 ± 0,019	0,019 ± 0,006	0,005 ± 0,003	0,001 ± 0,001						

T21_D_CFF_P_2_Bag		0,696 ± 0,012	0,087 ± 0,008	0,101 ± 0,008	0,106 ± 0,002	0,070 ± 0,005	0,011 ± 0,001
T22_D_CFF_P_2_Eng	38	0,306 ± 0,004	0,036 ± 0,005	0,089 ± 0,019	0,031 ± 0,002	0,009 ± 0,003	0,008 ± 0,001
T23_D_CFF_P_2_Alg		0,256 ± 0,037	0,011 ± 0,001	0,089 ± 0,002	0,023 ± 0,007	0,008 ± 0,001	0,010 ± 0,000
T24_D_CFS_P_7_Bag		1,019 ± 0,036	0,120 ± 0,018	0,123 ± 0,018	0,142 ± 0,011	0,063 ± 0,002	0,034 ± 0,001
T25_D_CFS_P_7_Eng	38	0,062 ± 0,019	0,076 ± 0,004	0,138 ± 0,023	0,069 ± 0,008	0,009 ± 0,002	0,029 ± 0,002
T26_D_CFS_P_7_Alg		0,029 ± 0,028	0,053 ± 0,008	0,109 ± 0,010	0,055 ± 0,019	0,010 ± 0,001	0,036 ± 0,001
T27_D_CFS_P_8_Bag		0,833 ± 0,017	0,260 ± 0,008	0 ± 0,005	0,177 ± 0,013	0,149 ± 0,008	0,045 ± 0,002
T28_D_CFS_P_8_Eng	28	0,112 ± 0,027	0,063 ± 0,013	0,006 ± 0,015	0,046 ± 0,003	0,017 ± 0,004	0,033 ± 0,002
T29_D_CFS_P_8_Alg		0,106 ± 0,028	0,062 ± 0,011	0,047 ± 0,005	0,067 ± 0,014	0,022 ± 0,002	0,032 ± 0,002
T30_D_CFT_2_Bag		0,219 ± 0,008	0,030 ± 0,000	0,093 ± 0,016	0,022 ± 0,000	0,011 ± 0,003	0,002 ± 0,001
T31_D_CFT_2_Eng	28	0,077 ± 0,017	0,048 ± 0,004	0,156 ± 0,024	0,039 ± 0,009	0,008 ± 0,005	0,001 ± 0,003
T32_D_CFT_2_Alg		0,109 ± 0,042	0,045 ± 0,005	0,196 ± 0,017	0,045 ± 0,006	0,013 ± 0,002	0,002 ± 0,003
T33_D_CFT_P_6_Bag		0,977 ± 0,024	0,072 ± 0,009	0,110 ± 0,020	0,085 ± 0,008	0,073 ± 0,008	0,002 ± 0,001
T34_D_CFT_P_6_Eng	28	0,477 ± 0,021	0,041 ± 0,018	0,059 ± 0,024	0,058 ± 0,013	0,019 ± 0,005	0,000 ± 0,001
T35_D_CFT_P_6_Alg		0,891 ± 0,017	0,058 ± 0,012	0,173 ± 0,009	0,077 ± 0,002	0,054 ± 0,002	0,002 ± 0,002

Tabela 4. Atividades enzimáticas de holocelulases dos extratos brutos dos fungos filamentosos isolados do fitofisionoma cerrado-floresta do Cerrado brasileiro, usando método de espalhamento em meio de cultura em placa de Petri com o meio específico Rosa-Bengal.

Isolados e fontes de carbono	Temperatura de isolamento e cultivo (°C)	Hemicelulases & pectinases				Celulases			
		Atividades (UI.mL ⁻¹)							
		Xilanase	Mananase	Poligalacturonase	CMCase	FPase	Avicelase		
T1_RCFS1_Bag	38	0,607 ± 0,021	0,059 ± 0,003	0,131 ± 0,020	0,116 ± 0,004	0,096 ± 0,005	0,046 ± 0,003		
T2_RCFS1_Eng		0,591 ± 0,020	0,058 ± 0,009	0,181 ± 0,039	0,104 ± 0,007	0,081 ± 0,005	0,044 ± 0,002		
T3_RCFS1_Alg		0,499 ± 0,012	0,015 ± 0,005	0,056 ± 0,012	0,041 ± 0,006	0,041 ± 0,001	0,052 ± 0,003		
T4_RCFS6_Bag	28	0,525 ± 0,036	0,086 ± 0,006	0,083 ± 0,014	0,123 ± 0,003	0,085 ± 0,006	0,006 ± 0,002		
T5_RCFS6_Eng		0,151 ± 0,016	0,044 ± 0,006	0,118 ± 0,027	0,062 ± 0,009	0,034 ± 0,005	0,002 ± 0,002		
T6_RCFS6_Alg		0,334 ± 0,009	0,061 ± 0,004	0,030 ± 0,008	0,081 ± 0,005	0,045 ± 0,001	0,002 ± 0,002		
T7_RCFS5_Bag	28	0,032 ± 0,013	0,035 ± 0,004	0,017 ± 0,008	0,026 ± 0,007	0,019 ± 0,002	0,010 ± 0,002		
T8_RCFS5_Eng		0,016 ± 0,005	0,027 ± 0,008	0 ± 0,017	0,018 ± 0,004	0,012 ± 0,002	0,005 ± 0,002		
T9_RCFS5_Alg		0,024 ± 0,007	0,037 ± 0,003	0,007 ± 0,018	0,029 ± 0,004	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001		
T10_RCFS3_Bag	28	0,559 ± 0,042	0,025 ± 0,000	0,073 ± 0,007	0,042 ± 0,014	0,033 ± 0,001	0,004 ± 0,002		
T11_RCFS3_Eng		0,442 ± 0,020	0,014 ± 0,000	0,017 ± 0,013	0,013 ± 0,008	0,017 ± 0,003	0,005 ± 0,001		
T12_RCFS3_Alg		0,481 ± 0,026	0,014 ± 0,002	0,050 ± 0,016	0,012 ± 0,002	0,031 ± 0,005	0,003 ± 0,001		
T13_RCFS7_Bag	28	0,082 ± 0,048	0,041 ± 0,004	0,070 ± 0,004	0,029 ± 0,005	0,011 ± 0,003	0,005 ± 0,002		
T14_RCFS7_Eng		0,042 ± 0,004	0,038 ± 0,002	0,060 ± 0,006	0,027 ± 0,003	0,004 ± 0,002	0,008 ± 0,001		
T15_RCFS7_Alg		0,036 ± 0,005	0,035 ± 0,002	0,034 ± 0,007	0,030 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,002		

T16_RCFSP2_Bag		0,847 ± 0,050	0,065 ± 0,013	0,071 ± 0,005	0,187 ± 0,021	0,180 ± 0,015	0,006 ± 0,002
T17_RCFSP2_Eng	38	0,884 ± 0,019	0,144 ± 0,013	0,237 ± 0,016	0,315 ± 0,027	0,240 ± 0,008	0,014 ± 0,002
T18_RCFSP2_Alg		0,804 ± 0,034	0,069 ± 0,002	0,108 ± 0,014	0,192 ± 0,021	0,158 ± 0,012	0,007 ± 0,002
T19_RCFS4_Bag		0,463 ± 0,024	0,057 ± 0,003	0,060 ± 0,004	0,046 ± 0,005	0,021 ± 0,005	0,004 ± 0,002
T20_RCFS4_Eng	28	0,454 ± 0,030	0,093 ± 0,018	0,099 ± 0,020	0,130 ± 0,014	0,061 ± 0,003	0,004 ± 0,000
T21_RCFS4_Alg		0,512 ± 0,045	0,115 ± 0,006	0,073 ± 0,019	0,144 ± 0,012	0,054 ± 0,004	0,005 ± 0,001
T22_RCFT4_Bag		0,367 ± 0,010	0,042 ± 0,011	0,075 ± 0,003	0,037 ± 0,006	0,007 ± 0,004	0,006 ± 0,001
T23_RCFT4_Eng	38	0,047 ± 0,028	0,049 ± 0,006	0,060 ± 0,012	0,037 ± 0,006	0,004 ± 0,002	0,001 ± 0,001
T24_RCFT4_Alg		0,028 ± 0,005	0,045 ± 0,010	0,044 ± 0,010	0,025 ± 0,002	0,010 ± 0,003	0,006 ± 0,001
T25_RCFTP2_Bag		0,056 ± 0,008	0,049 ± 0,006	0,060 ± 0,005	0,040 ± 0,005	0,012 ± 0,003	0,004 ± 0,002
T26_RCFTP2_Eng	38	0,051 ± 0,004	0,040 ± 0,003	0,017 ± 0,004	0,028 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001
T27_RCFTP2_Alg		0,467 ± 0,054	0,240 ± 0,012	0,183 ± 0,019	0,098 ± 0,010	0,041 ± 0,005	0,003 ± 0,000
T28_RCFS11_Bag		0,796 ± 0,060	0,081 ± 0,005	0,118 ± 0,003	0,059 ± 0,006	0,057 ± 0,004	0,010 ± 0,002
T29_RCFS11_Eng	28	0,647 ± 0,022	0,075 ± 0,007	0,121 ± 0,019	0,055 ± 0,006	0,043 ± 0,006	0,003 ± 0,002
T30_RCFS11_Alg		0,793 ± 0,022	0,089 ± 0,017	0,180 ± 0,017	0,067 ± 0,008	0,054 ± 0,004	0,005 ± 0,001
T31_RCFS14_Bag		0,031 ± 0,021	0,030 ± 0,007	0,037 ± 0,010	0,020 ± 0,005	0,019 ± 0,001	0,005 ± 0,003
T32_RCFS14_Eng	28	0,029 ± 0,006	0,025 ± 0,004	0,043 ± 0,016	0,017 ± 0,003	0,011 ± 0,003	0,004 ± 0,001
T33_RCFS14_Alg		0,034 ± 0,004	0,024 ± 0,000	0,036 ± 0,005	0,025 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,001

4. Conclusões-perspectivas

Foi comprovado, pelo teste de inoculação direta das amostras de cerradão-floresta nos meios de cultura, a existência de uma enorme biodiversidade de microrganismos nesse tipo de fitofisionoma do cerrado brasileiro, com temperaturas de crescimento diferentes, que podem ser isolados e testados como potenciais produtores de celulases, hemicelulases e pectinases. Os isolados que apresentaram, até o momento, viabilidade após aplicação de técnicas de conservação e manutenção foram cultivados em meio líquido com substratos lignocelulósicos. Alguns desses isolados-cultivados mostraram atividades de holocelulases significativas, como xilanases e celulases (CMCase e FPase). Observados os testes com potenciais produtores de celulases e hemicelulases, alguns fungos obtiveram resultados satisfatórios para atividade de xilanase e endoglicanase e foram enviados para identificação na Universidade Federal de Lavras.

O desenvolvimento deste primeiro trabalho comprova a grande diversidade de microrganismos existente no Cerrado e amostras de outras fitofisionomias do cerrado estão sendo avaliadas nos mesmos moldes deste, tendo, assim, a perspectiva de apresentar, em alguns anos, a vasta diversidade de fungos filamentosos deste bioma. Assim, espera-se que a bioprospecção desses microrganismos do cerrado sirva de incentivo para a preservação deste bioma, dado que pode trazer benefícios econômicos àqueles que tomem a iniciativa de conservar manchas de cerrado dentro de suas terras.

5. Referências Bibliográficas

- CARVALHO, V.G. 2008. **Comunidades de fungos em solo do cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão**. Lavras: UFLA, 2008. 62. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- DIOGO, H.C.; SARPIERI, A.; PIRES, M.C. 2005. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros Dermatologia**, 80(6):591-4.
- DUTRA, P.F.F.; ARRUDA, A.L.A.; ZUCCO, C.A.; MARIA RITA MARQUES, M.R. 2005. **Levantamento da microbiota fúngica de solo em matas de galeria da reserva biológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus Campo Grande**. VII Congresso da Sociedade de Ecologia do Brasil, Caxambu-MG.
- 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.; POLIZELI, M.L.T.M. 2006. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, 3, 474-480.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. 1980 Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. **Applied Environmental Microbiology**. 39, 488-492.
- KING, D.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. 1979. Dichloran-rose Bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. **Applied Environmental Microbiology**. 37, 959-964.
- KITAMOTO, Y. SUZUKI, A.; SHIMADA, S.; YAMANAKA, K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. **Mycoscience**. 43: 143-149.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. 2005. O Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, 1, 1, 147-155.
- LIMA, R.F.; BORBA, C.M. 2001. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 191-196.
- MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E.X. 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 52, 2, 97-100
- MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. 2005. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis1. **R. Árvore**, v.29, n.3, p.461-470.
- MOREIRA, L.R.S.; MATTOS, I.; MONCLARO, A.V.; SANTOS, S.S.T.; JENSEN, A.T.; SIQUEIRA, F.G.; FILHO, E.X.F. 2009. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, 10(2):35-45.
- NAKASONE, K.K.; PETERSON, S.W.; JONG, S-C. Preservation and distribution of fungal cultures. 2004. **Biodiversity of Fungi**. www.rmmn.org/documnts/pdf2004/fpl_2004.

- PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B.V.; SATHYA, R.; ANGAYARKANNI, J. 2008. Isolation, identification and screening of potential xylanolytic enzyme from litter degrading fungi. **African Journal of Biotechnology**, 7 (11), 1978-1982.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LEO, J.A.R.; NIGAM, P. **Solid-state Fermentation in Biotechnology**, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, 2001, p. 221.
- RYAN, M.J.; SMITH, D.; JEFFRIES P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 16: 183±186.
- SÁNCHEZ, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. 27: 185-194.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. 5 Ed. Benjamin Cummings, Redwood City.
- TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E.N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, 6:9.

Capítulo IX

Enzymatic Conversion of Liquid Hot Water Pre-treated Cellulosic Substrates in the Presence of Surface Active Additives, Laccase and Protease Inhibitors

Artigo submetido, em abril de 2010, à revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB)* durante o 32nd *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*

Felix G. Siqueira⁴, Eduardo A. Ximenes^{1,2}, Youngmi Kim^{1,2}, Mary Slininger^{1,2}, Edivaldo X. Ferreira-Filho⁴, Nathan S. Mosier^{1,2}, and Michael R. Ladisch^{1,2,3}

¹*Laboratory of Renewable Resources Engineering, Potter Engineering Center, 500 Central Drive, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2022, USA*

²*Department of Agricultural and Biological Engineering, 225 S. University Street, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2093, USA*

³*Weldon School of Biomedical Engineering, 206 S. Martin Jischke Drive, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2032, USA*

⁴*Laboratorio de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, CEP 70910 900, Brazil*

RESUMO

A estabilidade da enzima é das características de maior importância para os processos de sacarificação da celulose e produção de biocombustíveis. Os surfactantes têm sido sugeridos como agentes capazes de aumentar a digestibilidade enzimática da celulose. O principal mecanismo por trás desta ação, segundo a literatura, está relacionado com a prevenção de adsorção inespecífica de enzima sobre a lignina, que está intimamente associada com a celulose e a hemicelulose na estrutura da parede celular vegetal. Albumina bovina (BSA) tem sido sugerida para reduzir a adsorção de celulasas e β -glucosidase sobre a lignina e a melhoria da degradabilidade da celulose. Resultados contraditórios em relação à degradabilidade da celulose na literatura têm sido relatados para o

tratamento de material celulósico pré-tratado, quando incubado com lacases, antes da hidrólise da celulose. Proteases que podem contribuir também com o efeito de inativação de preparados de enzimas utilizadas para a sacarificação de celulose podem estar presentes nestas preparações. Os efeitos combinados são complexos e, portanto, foram estudados em um delineamento experimental sistemático, variando os tipos e as concentrações de aditivos de superfície ativa, lacases e inibidores de proteases adicionados durante hidrólise enzimática de material celulósico pré-tratado com água quente em banho de areia (*LHW – Liquid Hot Water*). Melhoria na conversão de celulose (mais de ~20%) em glicose foi observada após 48 horas de hidrólise enzimática de resíduos da colheita de milho pré-tratados com LHW e, então, adicionados os aditivos: lacase, PEG 4000 (poli-etileno-glicol 4000) e detergentes não-iônicos polioxietileno-sorbitol (Tween 20 ou 80) (Tween 20 e 80), juntamente com as celulases. Os aditivos PEG 4000, Tween 20 e 80 podem estabilizar as enzimas.

ABSTRACT

Enzyme stability is of great significance for a practical process such as cellulose saccharification for biofuel production. Surfactants have been reported in the literature to increase enzymatic digestibility of cellulose. The main mechanism behind their action is believed to be related to prevention of unspecific adsorption of enzyme on the substrate lignin. BSA has been suggested to reduce adsorption of cellulases and β -glucosidase on lignin, improving cellulose degradability. Contradictory results for cellulose degradability in the literature have been reported for treatment of pre-treated cellulosic material incubated with laccases prior to cellulose hydrolysis. Proteases that can also contribute to inactivation effect of enzyme preparations used for cellulose saccharification may be present in the preparations themselves. The combined effects are complex and hence were studied in a systematic experimental design that varied types and concentrations of surface active additives, laccases and protease inhibitors in the enzyme hydrolysis of liquid hot water pre-treated cellulosic material. Improvement in cellulose conversion (~20%) after 48h was

observed for enzyme hydrolysis of liquid hot water pre-treated corn stover treated with laccase and PEG 4000.

Index Entries: cellulose, pre-treatment, cellulases, enzyme hydrolysis, additives, laccase, protease inhibitors

INTRODUCTION

Enzymes constitute a major cost in the bioconversion of cellulose to ethanol [Houghton *et al.*, 2006]. Factors that reduce enzyme activity include: nonproductive adsorption of enzyme onto lignocellulosic substrates prior to reaction; intermediate and end-product inhibition; mass-transfer limitations affecting the transport of the enzyme to and from insoluble substrates; the distribution of lignin in the cell wall; the presence of hemicellulose, phenolic compounds, proteins and fats; lignocellulose particle size; and crystallinity and degree of polymerization of the cellulose substrate [Ladisich *et al.*, 2010].

Several studies reported in the literature have also shown that enzyme hydrolysis of pre-treated cellulosic materials slows as the concentration of solid biomass increases, even if the ratio of enzyme to cellulose is kept constant [Kumar and Wyman, 2009A; Ximenes *et al.*, 2010]. This form of inhibition is distinct from substrate and product inhibition, and has been observed in lignocellulosic materials such as wood, corn stover, switchgrass, and corn wet cake at solids concentrations above 10 g/L [Ximenes *et al.*, 2010, Ladisich *et al.*, 2010].

Several approaches have been tried aiming to improve enzyme hydrolysis of cellulose to ethanol conversion. Addition of surfactants such as non-ionic detergents and protein has been shown to significantly increase the enzyme conversion of cellulose into soluble sugars [Castanon *et al.*, 1981; Helle *et al.*, 1993; Kristensen *et al.*, 2007]. Studies on steam-treated softwood substrate propose that the dominant mechanism responsible may be the influence of surfactants on cellulase interaction with lignin surfaces [Eriksson *et al.*, 2002]. Other mechanisms proposed include: 1-

surfactant being able to change the nature of the substrate, thereby increasing the available cellulose surface area, and promoting reaction sites for cellulases to adsorb onto [Helle *et al.*, 1993; Yang and Wyman, 2004]; 2- they may have a stabilizing effect on the enzymes, effectively preventing enzyme denaturation during the hydrolysis [Kristensen *et al.*, 2007].

Laccase have been used to decrease the toxicity of industrial mill effluents with high phenoxy radicals that lead to proliferation into high-molecular-mass products [Casa *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2005]. Contradictory reports for the beneficial effect of treatment with laccases on cellulose hydrolysis have been reported [Palonen and Viikari, 2004; Jurado *et al.*, 2009].

Enzyme preparations used in the bioconversion of cellulose to ethanol are not purified, and they may contain materials that can contribute to their inactivation, including proteases which are often involved in the degradation of other enzymes, usually under conditions unfavorable to that enzyme. In this sense, depending on the nature of the enzyme preparation, protease inhibitors may be helpful for improving cellulose hydrolysis [Feder *et al.*, 1978; Reese and Mandels, 1980].

Previous studies have focused on determine how additives (Bovine albumin (BSA), Tween-20 and poly ethylene glycol (PEG 6000)) affect glucose and xylose release after 72 h enzyme hydrolysis of untreated and hot water washed pre-treated corn stover solids by different methods, including liquid hot water (LHW) pre-treatment. Pure Avicel glucan was used as a control [Kumar and Wyman, 2009B]. Here we extend this investigation by evaluating the effect of additives (BSA, PEG 4000, Tween- 20 and 80), laccase and protease inhibitors on liquid hot water (LHW) pre-treated corn stover and switch grass not previously washed, using solka flocc cellulose as control. The goal was: 1- to gain further knowledge on the beneficial (or not) effects of the compounds in alleviating nonproductive adsorption of enzyme onto LHW pre-treated cellulosic substrates; 2- improvement (or not) of enzyme stability under possible unfavorable conditions, such as the presence of inhibitors generated after pre-treatment and/or proteases.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Spezyme CP (cellulase) and Laccase were provided by Genencor, Danisco Division (Palo Alto, CA). Novozyme 188 (β -glucosidase from *Aspegillus niger*, Novozyme, Davis, CA) and a protease inhibitor cocktail (for use with fungal and yeast extract) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Cat. No. C6150). Unless otherwise noted, reagents and chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). All the experiments were performed at least in triplicate and are reported as averages and their respective standard deviations.

Compositional Analysis

Composition of samples from corn stover and switchgrass were analyzed by using NREL standard analysis procedures [Templeton and Ehrman, 1995; Ehrman, 1994, 1996 A, 1996B; Ruiz and Ehrman, 1996] (Table 1). To calculate polysaccharide composition, monomer sugars were analyzed by HPLC after acid hydrolysis of the samples was carried out. HPLC analysis of liquid samples was performed on a system consisting of a Varian 9010 solvent delivery system, Waters 717plus Autosampler, Aminex HPX-87H column (Biorad, Hercules, CA), Waters 2414 refractive index detector, Waters 2487 Dual k Absorbance Detector, and a Hewlett Packard HP3396G integrator. The mobile phase was 5 mM H₂SO₄ filtered through 0.2 μ m nylon filter (Millipore) and degassed. The mobile phase flow rate was 0.6 mL/min and the column temperature was maintained at 60°C by an Eppendorf CH-30 column heater controlled by an Eppendorf TC-50.

Rapid Detection of Cellulose Degradability in Pre-treated Cellulosic Feedstocks

A- Pre-treatment and Enzyme Hydrolysis

Pre-treatment was carried out by pressure cooking 50 mg cellulosic material (solka floc cellulose, corn stover or switch grass) in 1.5 mL water at 200°C for 10 min and 30 sec. (Fig. 1)

placing the tube in a Tecam® SBL-1 fluidized sand bath (Cole-Parmer, Vernon Hills,IL) at 200 °C for 10.5 min (0.5 min heat-up time and 10 min hold time). The pressure within the tube was held at the saturation vapor pressure of water in order to keep the water in a liquid state [Weil et al. 1997, 1998, Ladisch et al., 1998, Mosier et al., 2005, Kim et al., 2008, 2009]. The samples were cooled before the addition of 1.5 mL 100 mM citrate buffer, pH 4.8, bringing the final volume to 3 mL (therefore, the final concentration for subsequent enzyme hydrolysis is ~ 2% (wt/v)). Commercial cellulase at 0.1 FPU/mL or 15 FPU/g glucan (Spezyme CP) and β-glucosidase at 0.2 CBU/ml or 40 CBU/g glucan (Novozymes 188) were added, and hydrolysis was carried out for different times at 50°C and pH 4.8 in an incubator shaker (New Brunswick Scientific CO., Inc., Edison, NJ) (Fig. 1). The ratio of enzyme to solids was equivalent to 4 FPU/g total solids and 13 CBU cellobiose/ g total solids, and 10 mg protein per g total solids. As a control, enzyme hydrolysis using untreated solka floc cellulose was done in a microplate assay with all the amounts for substrate and enzyme loading reduced 10 times (Fig. 1).

Table 1. Partial composition of corn stover and switch grass by cellulosic biomass compositional analysis.

Lignocellulosic Substrate	Glucan (%)	Xylan (%)	Arabinan (%)	Acetyl (%)	Total Lignin (%)
Corn Stover	31.9	19.4	0.1	3.2	18.5
Switchgrass	31.6	19.3	2.9	2.5	20.5

B- Enzymatic Conversion of Cellulosic Substrates in the Presence of Surface Active Additives, Laccase and Protease Inhibitors

The loading of surface active additives (BSA, PEG 4000, Tween-20 and 80) laccase and protease inhibitors were based on previous observations in the literature indicating optimal concentrations (Table 2) (Goldstein and Swain, 1965; Reese and Mandels, 1980; Yang and Wyman, 2006, Börjesson et al., 2007; Kristensen et al., 2007; Jurado et al., 2009) or manufacturer

recommendation (Sigma- Protease inhibitors). The assays were done either with pre-incubation of pre-treated material with additives, laccase and protease inhibitors (1-2h) or not prior enzyme hydrolysis. No washing step was included.

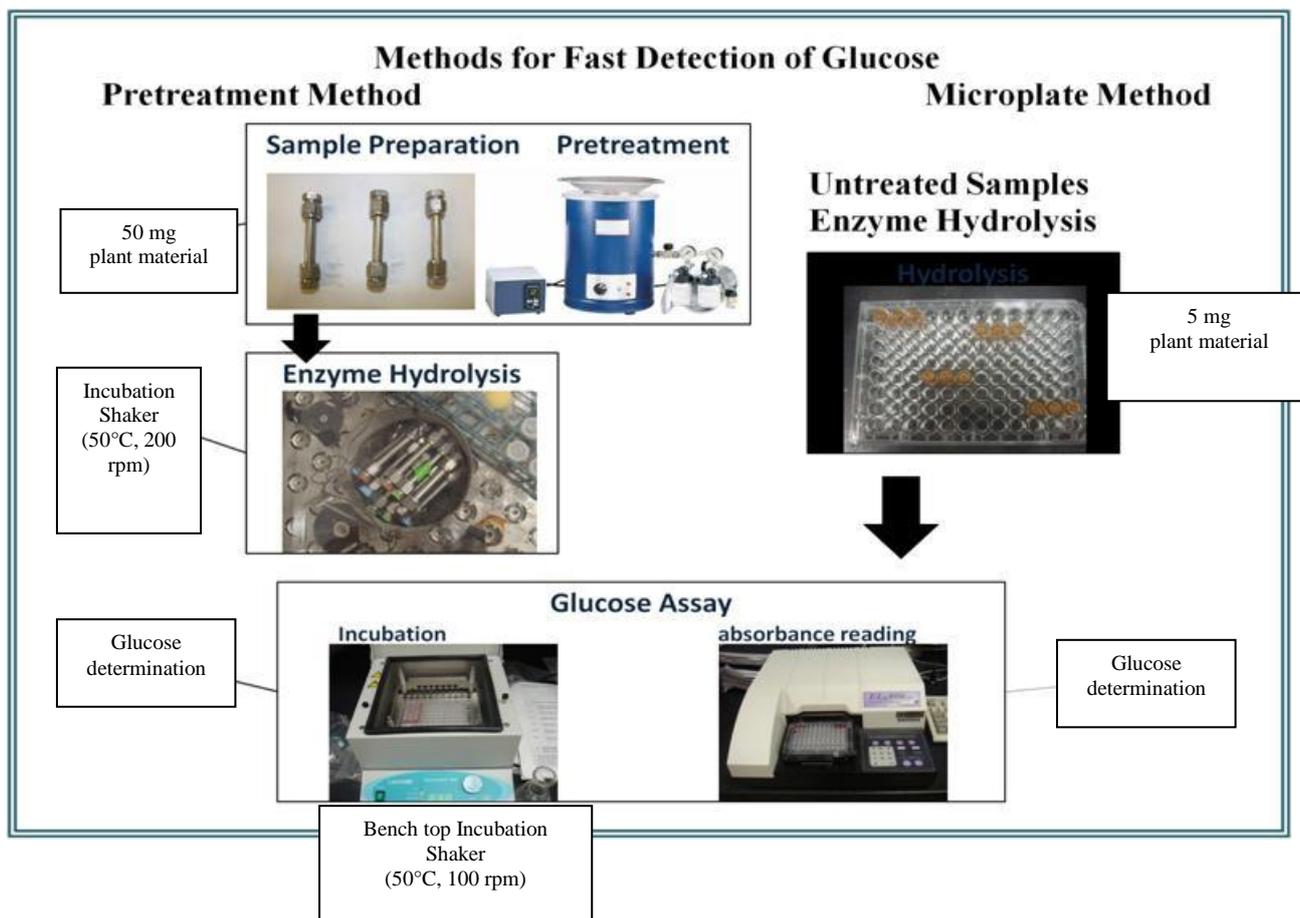


Fig. 1. Schematic view of the method for detection of cellulose hydrolysis of untreated and pretreated plant material in short or extended enzyme hydrolysis incubation times.

Table 2. Concentration of laccase, surface active additives and protease inhibitors used in this work.

Compounds	Concentration
BSA (%)	1
Laccase (IU/g protein)	40
Protease inhibitors (% v/v)	2
Poly ethylene glycol (PEG 4000) (% wt/v)	0.2
Non-ionic surfactants (Tween 20 and 80) (%)	2

C- Liquid Analysis for Sugars for Glucose Determination

Glucose detection was also carried out using a D-glucose (GOPOD Format) assay kit from Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Co. Wicklow, Ireland). The original colorimetric assay conditions recommended by the manufacturer were modified by reducing the amount of substrate, buffer and enzyme 10 times, so that the assay could be done in a microplate.

RESULTS AND DISCUSSION

Kumar and Wyman [2009 B] reported their observations for the effect of additives (BSA, Tween 20 and PEG 6000) for the enzyme hydrolysis of LHW pre-treated corn stover, previously hot water washed before addition of enzymes (16.1 mg of protein/g glucan in the raw biomass, corresponding to 7.5 FPU/ g original glucan, supplemented with β -glucosidase at a CBU to FPU ratio of ~ 2). Improvement for glucose and xylose release between 5-20% was observed. They also reported that sugar release did not increase with additives concentration, and use of additives in combination provided no benefit over employing them individually. It was suggested that the additives used in their study may not play different roles in enzymatic hydrolysis of the substrate tested.

Here our work differ, and therefore provide further information, of this previous work by evaluating the effect not only of additives, but also of laccase and protease inhibitors on liquid hot water (LHW) pre-treated corn stover and switch grass, not previously washed before enzyme hydrolysis. The enzyme loading was also higher (15 FPU/ g glucan) than the used in the work of Kuman and Wyman [2009B] but similar to others described in the literature [Yang and Wyman, 2006]. The goal was to gain further knowledge on the beneficial (or not) effects of the compounds tested in alleviating nonproductive adsorption of enzyme onto LHW pre-treated cellulosic substrates, and also to investigate improvement (or not) of enzyme stability under possible unfavorable conditions, such as the presence of inhibitors generated after pre-treatment and/or

proteases. The results are reported and discussed in the following sections by describing the effects of each compound tested (additives, laccases and protease inhibitors) individually. No difference in results was found in all cases pre-incubating (1-2h) or not the compounds tested with the pre-treated substrate prior enzyme hydrolysis.

A- BSA

Enzyme hydrolysis of untreated solka floc cellulose was improved by 20% in the presence of BSA in the first 24 h of enzyme hydrolysis, however after 48h the glucose yield was similar for enzyme hydrolysis in presence or not of this additive (Figure 2). No improvement was observed for the enzyme hydrolysis of LHW pre-treated solka floc cellulose. These results are in agreement with those from Yang and Wyman [2006] that reported a negligible effect of BSA on glucose release from Avicel at a cellulase loading of 15 FPU/ g glucan (same enzyme loading used in our studies here). On the other hand, positive effect was observed by Kumar and Wyman [2009] for the hydrolysis of the same substrate using lower enzyme loading (7.5 FPU/ g glucan). They suggest that this result may be due to the effect of BSA improving yields by enhancing the stability, availability and or activity of enzymes, in addition to reducing non-productive binding of cellulase to lignin.

BSA had also no positive effect on the enzyme hydrolysis of LHW pre-treated corn stover and switch grass (Fig. 1). Although not causing a significant improvement (10-15%), BSA has been reported to be more effective than Tween 20 and PEG 6000 for the hydrolysis of LHW pre-treated corn stover, hot water washed prior enzyme hydrolysis. Interestingly, for reasons not clear to us yet, it seems that BSA may cause a slight decrease in glucose yields for the hydrolysis of pre-treated corn stover. Eriksson *et al.* [2002] observed that surfactants only enhanced the digestibility of lignin containing substrates for enzyme loadings of ~ 27.6 FPU/g glucan.

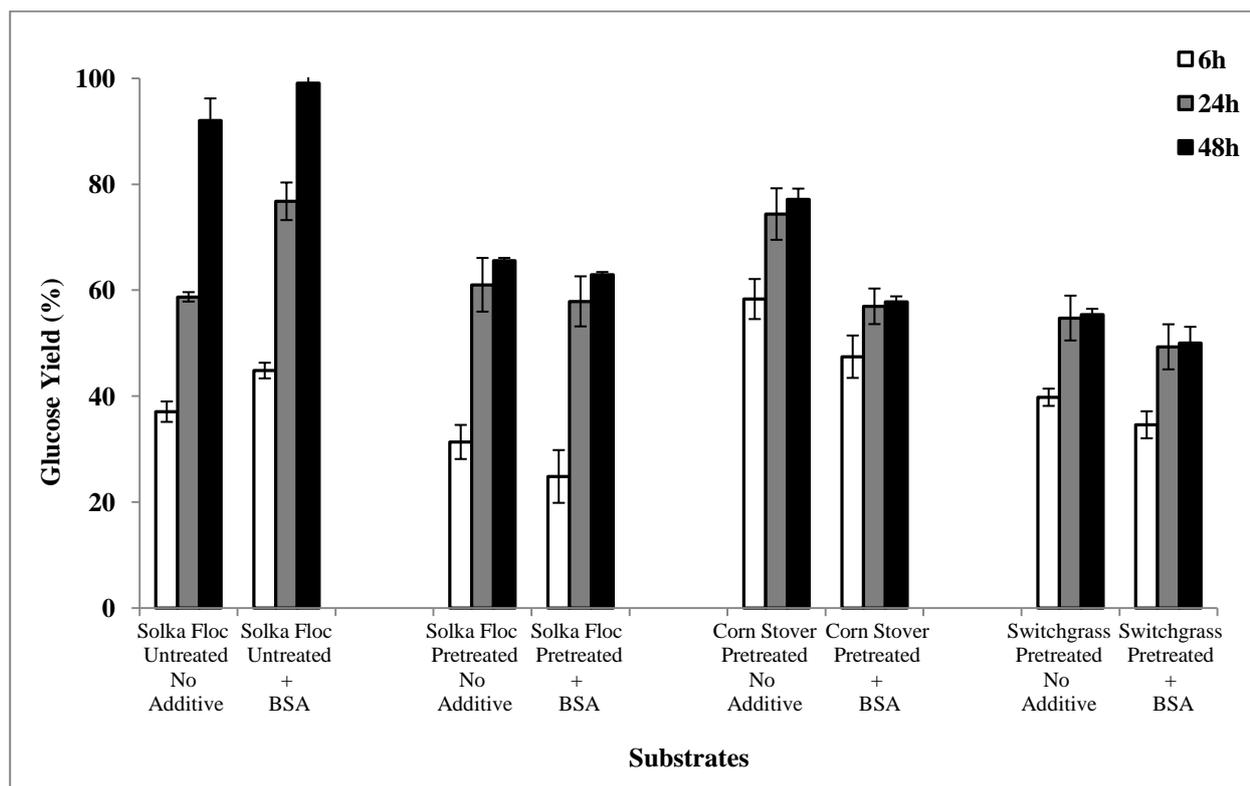


Fig. 2. Enzyme hydrolysis (2% (wt/vol)) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pre-treated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188) in the presence of 1% (wt/vol) BSA. Enzyme Loading: 15 FPU/ g glucan and 40 CBU/ g glucan (except for untreated and LHW pre-treated solka floc cellulose hydrolysis, where was used half of this enzyme loading).

B- Tween 20 and 80

Kaar and Holtzaple [1998] showed that addition of Tween to hydrolysis of corn stover lowered the kinetic constants related to substrate affinity and enzyme binding sites on the substrate in a way that helps the enzyme maintain affinity for the substrate. They suggest that Tween can protect enzymes from thermal denaturation in hydrolysis conducted at higher temperatures. Balasteros et al. (1998) showed that addition of Tween- 80 increased the conversion of steam exploded poplar by modifying the adsorption and desorption of enzymes.

Our results show that, similar to what happened in the presence of BSA, enzyme hydrolysis of untreated solka floc cellulose was improved in the presence of Tween (20 or 80) in the first 24 h of enzyme hydrolysis, and after 48h the glucose yield was similar for enzyme hydrolysis with their

addition or not. No improvement was observed for enzyme hydrolysis of LHW pre-treated solka floc cellulose (Fig. 3). Small increase in glucose yield (5-10%) was observed for the hydrolysis of LHW pre-treated corn stover and switch grass in the presence of any of these surfactants (Fig.3). These results are similar to those obtained for the enzyme hydrolysis of LHW pre-treated and hot water washed corn stover in the presence of Tween 20 (Kumar and Wyman, 2009 B).

C- PEG 4000

Ethylene oxide polymers such as poly ethylene glycol (PEG) has been shown to be effective additives improving enzyme hydrolysis of cellulosic substrates [Börjesson et al., 2007]. They have also been shown to help preventing inhibition of enzymes by phenolic compounds [Goldstein and Swain, 1965].

The results for the enzyme hydrolysis of untreated or LHW pre-treated solka floc cellulose in the presence of PEG 4000 were similar to those discussed in the previous sections for the other two additives (BSA and Tweens, Figs 2 and 3, respectively) (Fig. 4). Improvement of glucose yield of ~ 20% was observed for the enzyme hydrolysis of corn stover in the presence of this additive (Fig. 4). No improvement was observed during the hydrolysis of switch grass under similar experimental conditions. In an experiment using lower enzyme loading (7.5 FPU/ g glucan as opposed to 15 FPU/ g glucan used in our work), PEG 6000 was less effective for the hydrolysis of LHW pre-treated and hot water washed corn stover [Kumar and Wyman, 2009].

D- Laccase and Protease Inhibitors

Laccase catalyzes the oxidation of phenolic units in lignin and a number of phenolic compounds and aromatics amines to radicals, with molecular oxygen as the electron acceptor that is reduced to water [Saparrat et al., 2002]. There are reports in the literature on the use of laccases for detoxification of pre-treated lignocellulosic substrates, but several of them performed after cellulose hydrolysis (Jurado et al., 2009). Also to our knowledge, there is no report of the use of these

enzymes before cellulose hydrolysis of liquid hot water pre-treated substrates. In this sense, we developed the interest to investigate the effect of a treatment with such enzyme, after LHW pre-treatment of cellulosic substrates, prior enzyme hydrolysis by cellulases and β -glucosidases.

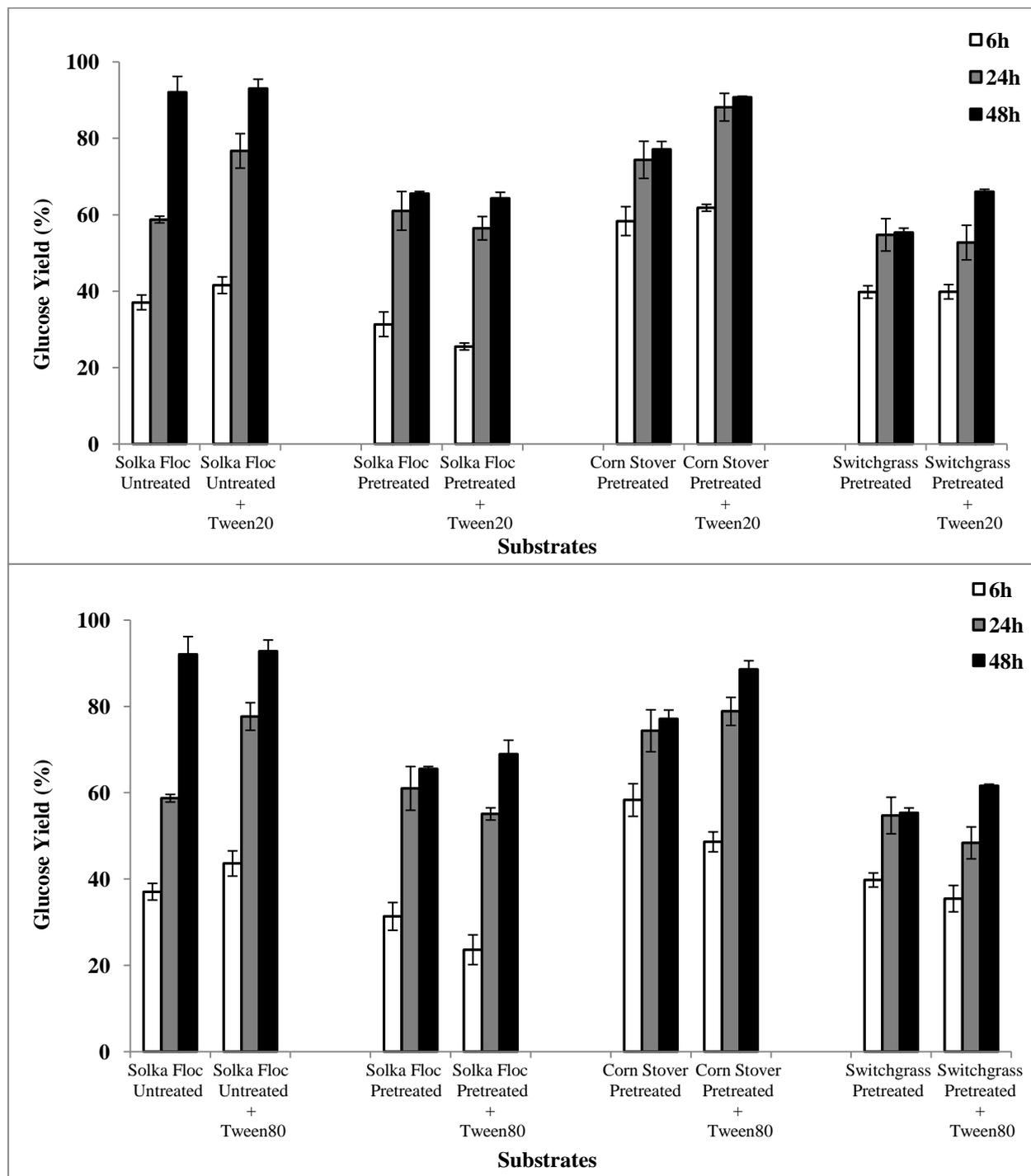


Fig. 3. Enzyme hydrolysis (2% (wt/vol) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pre-treated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188) in the presence of 2% (wt/v) non-ionic surfactants (Tween 20 and Tween 80). Enzyme Loading : 15 FPU/ g glucan and 40 CBU/ g glucan (except for untreated and LHW pre-treated solka floc cellulose hydrolysis, where was used half of this enzyme loading).

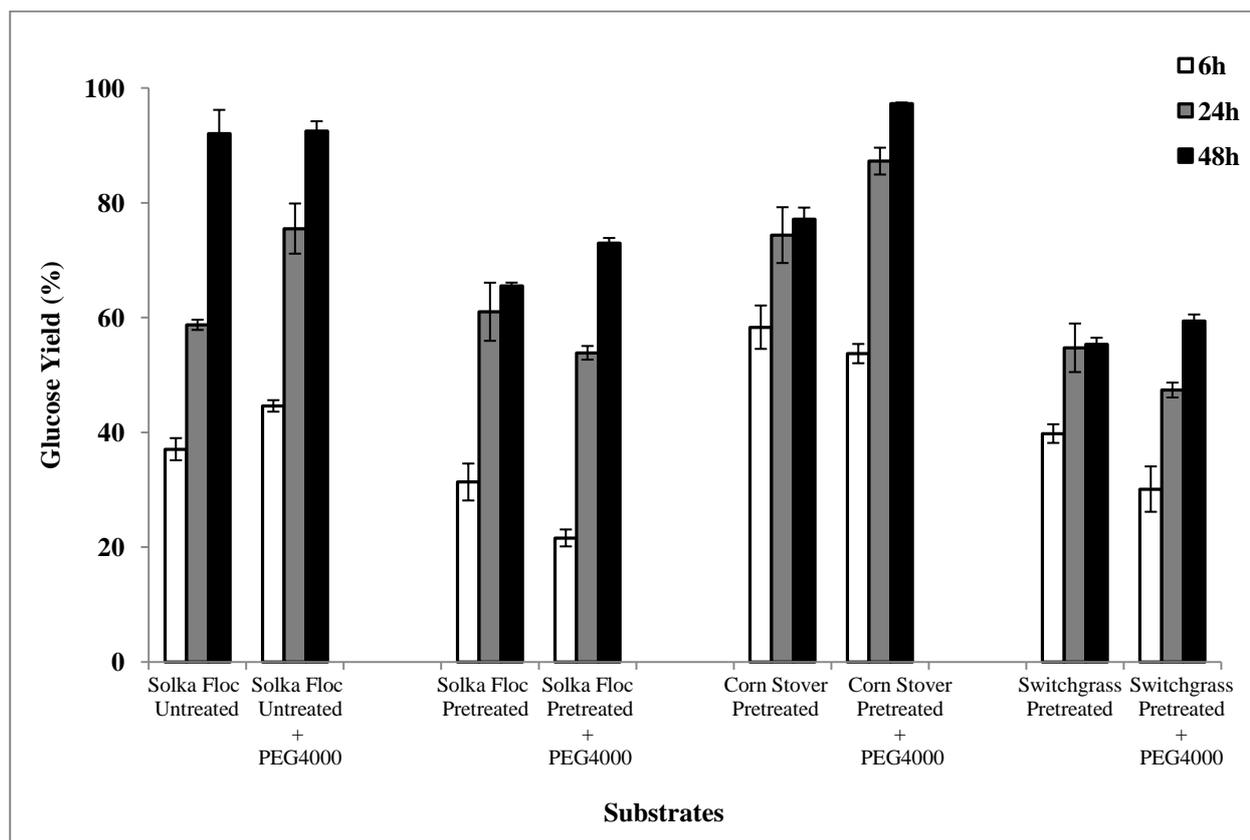


Fig. 4. Enzyme hydrolysis (2% (wt/vol)) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pre-treated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188) in the presence of 1% (wt/vol) poly ethylene glycol (PEG 4000). Enzyme Loading : 15 FPU/ g glucan and 40 CBU/ g glucan (except for untreated and LHW pre-treated solka floc cellulose hydrolysis, where was used half of this enzyme loading).

No improvement for glucose yield was observed for the enzyme hydrolysis of untreated and LWH pre-treated solka-floc cellulose and LWH pre-treated switch grass (Fig. 5). Similar to observed when using PEG 4000, an improvement of glucose yield of ~ 20% was observed for the enzyme hydrolysis of LWH pre-treated corn stover after pre-treatment with laccase (Fig. 5). Contradictory results have been reported in the literature for the use of laccase before cellulose hydrolysis. Lower glucose yield have been shown for enzyme hydrolysis of stem-exploded wheat straw previously treated with laccase. [Tabka et al., 2006; Jurado et al., 2009]. The results have been explained by the release of phenolic compounds, which can inhibit cell wall degrading enzymes [Gamble *et al.*, 2000]. On the other hand, hydrolysis of cellulose was improved by laccase treatment

of steam-exploded softwood, and a decrease in the unproductive binding of cellulases to lignin after laccase treatment has been suggested [Palonen and Viikari, 2004].

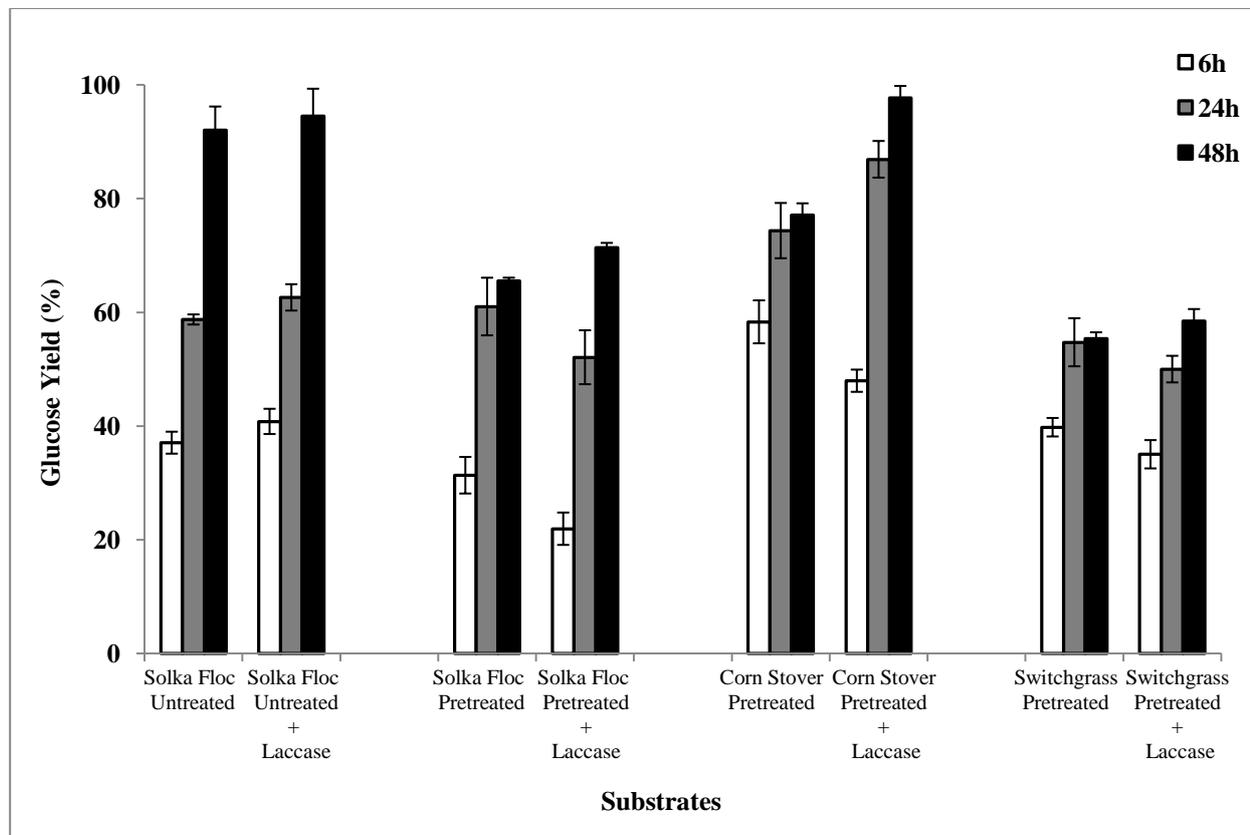


Fig. 5. Enzyme hydrolysis (2% (wt/vol)) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pretreated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188), previously treated in the presence of laccase (40 IU/ g protein) for 6 h at 50 °C , pH 6.0. Enzyme Loading : 15 FPU/ g glucan and 40 CBU/ g glucan (except for untreated and LHW pretreated solka floc cellulose hydrolysis, where was used half of this enzyme loading).

When we used protease inhibitors (a mixture of compounds with broad specificity for inhibition of serine, cysteine, aspartic and metallo-proteases) as a treatment before enzymes hydrolysis of cellulose, no improvement of glucose yield was observed for any of the untreated and LHW pre-treated substrates tested (Fig. 6). These results indicate that proteases may not be present or are in concentrations levels in the commercial enzyme preparations that do not affect enzymes involved in cellulose hydrolysis.

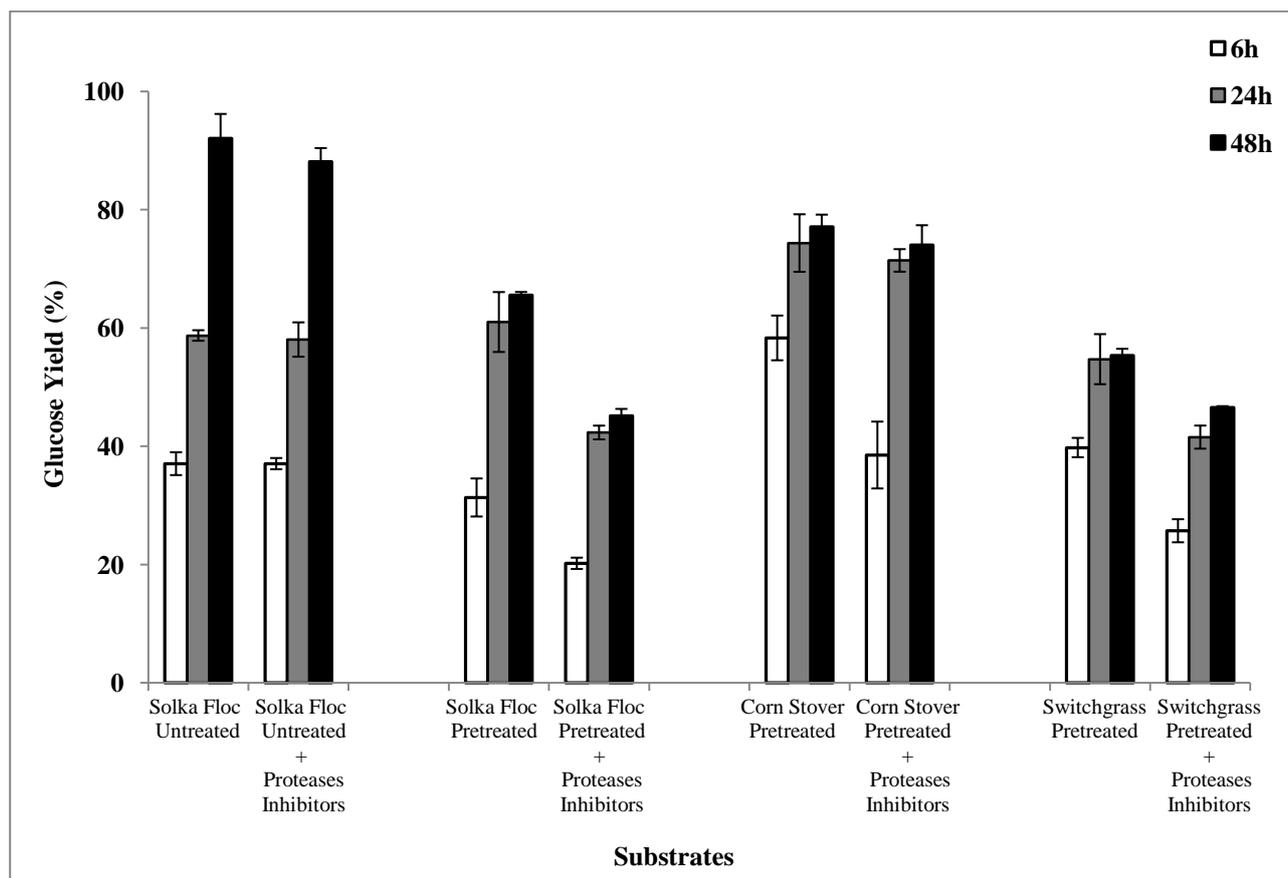


Fig. 6. Enzyme hydrolysis (2% (wt/vol)) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pre-treated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188) in the presence of 2% (wt/vol) protease inhibitors. Enzyme Loading : 15 FPU/ g glucan and 40 CBU/ g glucan (except for untreated and LHW pre-treated solka floc cellulose hydrolysis, where was used half of this enzyme loading).

E- Effect of Reducing Enzyme Loading and Adding More Additive and Laccase.

Since the best results for improvement of enzyme hydrolysis of the LHW pre-treated substrates tested here were obtained with treatments using PEG 4000 and laccase for enzyme hydrolysis of LHW pre-treated corn stover, we investigated further the effect on enzyme hydrolysis of this substrate by adding these compounds at the same or higher concentration and reducing enzyme loading.

When PEG 4000 and Laccase were added at the same concentrations used in the previous reported and discussed experimental results (Table 2), and the enzyme loading was reduced, no

significant difference was observed in the pattern of cellulose hydrolysis (Fig.7). Also no improvement of cellulose hydrolysis was observed when they were added in 5 times higher concentration and the enzyme loading was reduced also 5 times (data not shown). Kumar and Wyman [2009], when studying the effect of additives on the digestibility of corn stover following pre-treatment by leading technologies, reported that “little enhancement in sugar release was possible beyond a loading of 150 mg additives/ g glucan for most pre-treatments, and combinations did not improve sugar release much over use of additives alone for all except SO₂”.

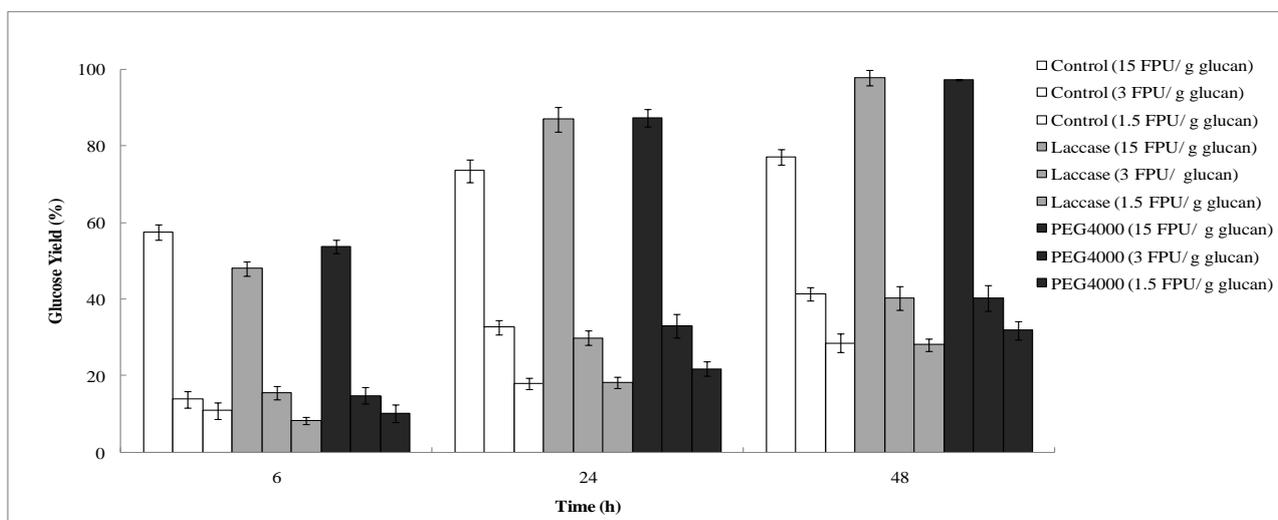


Fig. 7. Enzyme hydrolysis of Corn Stover (2% (wt/vol) at 50°C, pH 4.8 of untreated and liquid hot water pre-treated (4% (wt/vol)) cellulosic material by cellulases (Spezyme CP) and β-glucosidase (Novozyme 188) added in different concentrations, previously treated in the presence of laccase (40 IU/ g protein) for 6 h at 50 °C , pH 6.0 or in the presence of 1% (wt/vol) poly ethylene glycol (PEG 4000) . Control : no addition of laccase or PEG 4000.

CONCLUSION

Based on our results presented here and from others in the literature, the beneficial effect of using additives, laccase and protease inhibitors for improvement of cellulose hydrolysis will be conditioned to several factors, including: 1- the type of cellulosic substrate and pre-treatment methodology chosen; 2- the nature of the enzymes that will be used as well as the respective process of their preparation; 3- the choice of experimental conditions before enzyme hydrolysis,

such as washing or not substrates, pre-incubation (and the optimal time for that) or not with the compounds to be tested, among others.

In agreement to these observations, from the compounds tested, laccase and PEG 4000 have the most beneficial effect for improvement of cellulose hydrolysis of LHW pre-treated corn stover, but the effect may differ for different cellulosic substrates. For instance, no significant improvement is achieved in their presence for the hydrolysis of LHW pre-treated solka floc cellulose and switch grass under similar experimental conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Xingya (Linda) Liu, Rick Hendrickson and Thomas Kreke, for their excellent technical assistance. We thank Genencor for their gift of enzymes. The material in this work was supported by DOE grant #DE-AC36-99GO10337; DOE BES Project 0012846, DOE Grant #DE-FG02-06ER06-03, #GO12O26-174 DOE grant #DE-FG02-06ER64301 and USDA IFAFS contract #00-52104-9663, and Mascoma Sponsored Research Agreement.

Statement of Competing Interest: Michael Ladisch is Chief Technology Officer at Mascoma Corporation.

REFERENCES

1. Houghton, J., C., Weatherwax, S., and Ferrell, J. (2006), Publication No. DOE/ **SC-0095**, U.S. Dept. of Energy, Washington, DC (2006).
2. Ladisch, M., Mosier, N., Kim, Y., Ximenes E. and Hogsett, D.(2010), *CEP* **106 (3)**, 56-63.
3. Kumar, R. and Wyman, C.E. (2009), *Biotechnol. Bioeng.* **102 (2)**, 45–67.
4. Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., and Ladisch M. (2010), *Enzyme Microb. Technol.* **46**, 170-176.
5. Castanon, M. and Wilke, C.R. (1981), *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1365-1372.
6. Helle, S.S., Duff, S.J.B., and Cooper D.G (1993), *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 611-617.
7. Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jørgensen, H. (2007), *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 888-895.
8. Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. (2002), *Enzyme Microb. Technol.* **31(3)**, 353-364.
9. Yang, B. and Wyman, C.E. (2004), United States Patent Application Publication. US2004/0185542A1.

10. Casa, R., d'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Sermani, G, and Lo Cascio, B. (2003), *Chemosphere* **50**, 959-966.
11. Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2005), *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 478-486.
12. Palonen, H. and Viikari, L. (2004), *Biotechnol. Bioeng.* **86** (5), 550-557.
13. Feder, J., Kochavi, D., Anderson, R.G., and Wildi, B.S. (1978), *Biotechnol. Bioeng.* **20** (12), 1865-1872.
14. Reese ,E. and Mandels, M. (1980). *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 323-335.
15. Kumar, R. and Wyman, C.E. (2009), *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1544-1557.
16. Templeton, D. and Ehrman, T. (1995), NREL analytical procedure: LAP 003 determination of acid-insoluble lignin in biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
17. Ehrman, T. (1994), NREL analytical procedure: LAP005 standard method for ash in biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
18. Ehrman, T. (1996 a), NREL analytical procedure: LAP001 standard method for determination of total solids in biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
19. Ehrman, T. (1996b), NREL analytical procedure: LAP004 determination of acid-soluble lignin in biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
20. Ruiz, R. and Ehrman T. (1996), NREL analytical procedure: LAP 002. Determination of biomass in biomass by high performance, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
21. Weil, J., Sarikaya, A., Rau, S.-L., Goetz, J., Ladisch, C., Brewer, M., Hendrickson, R. and Ladisch, M. R. (1997), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **68**, 21-40.
22. Weil, J. R., Brewer, M., Hendrickson, R., Sarikaya, A. and Ladisch, M. R. (1998), *Appl Biochem. Biotechnol.*, **70-72**, 99-111.
23. Ladisch, M. R., Kohlmann, K., Westgate, P., Weil, J. and Yang, Y. (1998), Processes for treating cellulosic material. U.S. Patent 5,846,787.
24. Mosier, N. S., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N. W. Y., Sedlak, M., Dreschel, R., Welch, G., Dien, B. S., Aden, A. and Ladisch, M. R. (2005), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **125**, 77-85.
25. Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N. S., Bals, B., Balan, V., Dale, B. and Ladisch M. R. (2008), *Bioresour. Technol.*, **99**, 5206-5215.
26. Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N. S. and Ladisch, M. R. (2009), *Methods Mol. Biol.* **581**, 93-102.
27. Goldstein, J.L. and Swain, T. (1965), *Phytochemistry* **4**, 185-192.
28. Yang, B. and Wyman, C.E. (2006), *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 611-617.
29. Börjesson, J., Peterson, R., and Tjerneld, F. (2007), *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 754-762.
30. Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, Á, Martínez,, Á.T., and Martínez, M.J.(2009), *Bioresour. Technol.***100**, 6378-6384.
31. Kaar, W.E and Holtzapple, M. (1998), *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 419-427.
32. Ballesteros, I, Oliva, J.M., Carrasco, J., Cabanas, A., Navarro, A.A., and Ballesteros, M. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70** (2), 369,381.
33. Saparrat, M.C.N, Guillén, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2002), *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1534-1540.
34. Tabka, M.G., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., and Sigoillot, J.C. (2006), *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 897-902.
35. Gamble, G.R., Snook, M.E., Henriksson, G., and Akin, D.E. (2000), *Biotechnol. Lett.* **22**, 741-746.

Artigos como coautor - Colaboração

Capítulo X

*The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainana**

Artigo publicado como co-autor em 2008 na revista: *Current Topics in Biochemical Research*

Leonora Rios de Souza Moreira, Ingrid de Mattos, Antonielle Vieira Monclaro, Sheila Souza Thurler dos Santos, Alan Thiago Jensen, Félix Gonçalves de Siqueira and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910 900, Brazil

RESUMO

Este artigo foi resultado da colaboração junto ao grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia da UnB que está integrado ao Projeto Bioetanol, tendo a FINEP e o CNPq como agências de fomento. O Laboratório de Enzimologia tem como função, neste projeto, realizar a purificação e a caracterização de enzimas fúngicas de extratos brutos provenientes de meios de cultura com menor custo de produção. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de proceder à caracterização enzimática de extratos brutos do fungo termofílico *Acrophialophora nainiana*, quando crescido em meio líquido, tendo como variável três substratos lignocelulósicos diferentes como fonte de carbono (engajo de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo). Também foi avaliada a habilidade de adsorção das xilanases de todos os extratos brutos junto a celulose microcristalina (avicel), sugerindo a presença do módulo de ligação a carboidratos (CBM – *Carbohydrate Binding Module*) em suas estruturas. Combinações diferentes com os três extratos

brutos foram realizadas, para avaliar o sinergismo das atividades para xilanases, chegando a aumentar em mais de 300% a atividade para esta enzima, em algumas combinações. O perfil das xilanases foi determinado por purificação parcial dos extratos brutos, usando cromatografias de filtração em gel e análise por zimograma. O zimograma apresentou xilanases com massa molecular entre 66-26 e 97-26 kDa, para os extratos de bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira, respectivamente. O engaço de bananeira como fonte de carbono em cultivo submerso do *A. nainiana* mostrou resultados significativos para atividade de xilanase.

The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*

Leonora Rios de Souza Moreira, Ingrid de Mattos, Antonielle Vieira Monclaro, Sheila Souza Thurler dos Santos, Alan Thiago Jensen, Félix Gonçalves de Siqueira and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho*

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910 900, Brazil

ABSTRACT

The thermophilic fungus *Acrophialophora nainiana* produces extracellular xylan-degrading enzyme when grown in liquid-state media containing banana stem, wheat bran or sugar cane bagasse as carbon source. The pattern of enzyme induction was influenced by the type of lignocellulosic substrate present in the medium. Fractionation of crude extract samples on ultrafiltration and gel-filtration chromatography showed enzyme multiplicity, which was also evidenced by zymogram analysis of xylanase. Endoglucanase and xylanase were characterized for their optimal temperature and pH, thermostability and stability in optimal pH, K_m , adsorption on avicel and synergistic effect. Endoglucanase was more active at temperature of 40-50°C and pH 4.5-5.5 and xylanase, at 55-70°C and pH 5.5-7.0. Both activities were stable when pre-incubated at 50°C and 60°C and their half-life on optimal pH varied from 4 hours to above 15 days. Apparent K_m value varied from 0.22 to 14.47 mg.mL⁻¹. Synergistic effect was observed for xylanase activities from sugar cane bagasse, wheat bran and banana stem extracts. In addition, xylanases were able to bind to avicel.

KEYWORDS: *Acrophialophora nainiana*, xylan-degrading enzymes, agriculture residues, enzyme characterization

INTRODUCTION

Lignocellulose, the major component of biomass, makes up about half of the matter produced by photosynthesis. It consists of three types of polymers – cellulose, hemicellulose and lignin. The term holocellulose is used to describe the total carbohydrate content of lignocellulose [1] and the material that is obtained after the removal of lignin [2]. Enzymatic hydrolysis of holocellulose requires an arsenal of enzymes, including cellulases, hemicellulases and pectinases. A great variety of fungi and bacteria is able to degrade these macromolecules by using a battery of hydrolytic or oxidative enzymes [3]. The ability of some microorganisms to metabolize lignin, cellulose, and hemicelluloses make them potentially important to take advantage of vegetable residues [4].

Agriculture residues are rich sources of holocellulose available for exploitation as sources of fuels, food and chemical feedstocks and substrates for induction of holocellulose-degrading enzymes. Production of ethanol from agriculture residues is a good alternative to improve energy availability. In recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization

*Corresponding author
eximenes@unb.br

of agricultural residues for different applications, including among others biofuel production. In the Brazil, the major agriculture residue for ethanol production is sugar cane bagasse. Although, some other residues, such as banana stem, also display potential for biofuel production. Additionally, the agriculture residues represent an important alternative source for the microbial growth aiming the production of biomass or industrial enzymes [4, 5]. The application of enzymes in industrial processes can often eliminate the use of high temperatures, organic solvents and extremes of pH, while at the same time offering increased reaction specificity, product purity and reduced environmental impact [6].

It is known that the thermophilic fungus *Acrophialophora nainiana* is an efficient producer of holocellulose-degrading enzymes, such as cellulase, hemicellulase and pectinase, yielding a high expression of these activities [7-11]. Some previous report showed that it produces a xylan-degrading enzyme system with application in elemental chlorine-free bleaching for Eucalyptus pulp [9]. Thus, this microorganism can also be considered a good model system for studying the hydrolysis of agricultural residues with a view to industrial application, such as the generation of fermentative products, which includes process for ethanol production, prebleaching of cellulose pulp and improvement of animal feedstock digestibility. The objective of the present work is to evaluate the capacity of *A. nainiana* to produce xylan-degrading enzyme activity during growth on different lignocellulosic substrates. We also report biochemical properties of endoglucanase and xylanase activities.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All substrates were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Banana stem, sugar cane bagasse and wheat bran were from a local source.

Organism and enzyme production

A. nainiana was isolated from a hot-water spring in Brazil (Caldas Novas-GO, Brazil). The fungus was maintained in PDA medium (2.0% potato

broth, 2.0% dextrose and 2.0% agar). An aliquot (5 ml) of a spore suspension was inoculated in Erlenmeyer flasks containing 500 ml of liquid medium (0.7% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.06% yeast extract) at pH 7.0, and 1.0% (w/v) banana stem, sugar cane bagasse or wheat bran as the carbon source. The fungus was grown for 10 days, at 40°C, under agitation of 100 rpm. The media were then filtered through filter paper and the resulting filtrate, hereafter called crude extract, used as source of enzymes. For enzyme induction experiments, aliquots were harvested during 24 days and used to estimate the enzyme activities and protein concentration.

Preparation of substrates

Oat spelt xylan was previously treated with 20 ml of 1.0 M of NaOH and 20 ml of 1.0 M of HCl, and the volume was brought to 100 ml with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, followed by stirring for 1 h at 25°C. The insoluble xylan was removed by centrifugation for 20 min in a bench top instrument and the soluble fraction was used for xylanase assay. Galactomannan (locust bean), carboxymethyl cellulose (low viscosity) and pectin were diluted in distilled water. Filter Paper activity (FPase) assay was carried out with a strip of paper of 1x 6 cm Whatman number 1.

Enzyme assays

Endoglucanase, xylanase, pectinase and mannanase activities were carried out by mixing 50 μl of enzyme sample with 100 μl of substrate 1%, w/v (carboxymethyl cellulose, oat spelt xylan, and pectin respectively) and 0.5% w/v (galactomannan) at 50°C for 30 min. FPase assay was determined with filter paper as the substrate and 150 μl of enzyme at 50°C for 1 hour [7, 11]. The release of reducing sugars was measured using the dinitrosalicylic reagent method [12]. One unit is defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of reducing sugar under standard assay conditions. The enzyme activity was expressed in $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Glucose, xylose, mannose and galacturonic acid were used as the standards. The determination of optimum temperature of endoglucanase and xylanase was carried out in the temperature range of 30–90°C.

The optimum pH values were determined by incubating 25 μ l of enzyme sample with 25 μ l of substrate (carboxymethyl cellulose or xylan 2%, w/v) and 100 μ l of the following buffers: 50 mM sodium acetate (pH 3.0–6.0), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0–7.5) and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5–9.0). All buffers, regardless of pH, were adjusted to the same ionic strength with NaCl. The temperature and pH stabilities of endoglucanase and xylanase were determined by pre-incubating the enzyme samples at 50°C and 60°C and optimum pH values (4.5, 5.5, 6.5 and 7.0). Aliquots were removed at intervals to measure the activity as described above. For experiments of pH stability, the enzyme samples were previously dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, pH values of 4.5 (endoglucanase of crude extract from cultivation in banana stem) and 5.5 (endoglucanase of crude extracts from cultivations in sugar cane bagasse and wheat bran and xylanase from sugar cane bagasse), and 50 mM sodium phosphate buffer, pH values of 6.5 (xylanase of crude extract from cultivation in banana stem) and 7.0 (xylanase of crude extract from cultivation in wheat bran) and incubated at 50°C. The temperature stability was also performed in the presence of L-cysteine (0.1 M) and L-tryptophan (55.8 mM) at 50°C and pH 5.0. For kinetic experiments, K_m values were estimated from Michaelis-Menten equation with a non-linear regression data analysis program [13]. Each experiment above was repeated at least three times. The standard deviation was less than $\pm 20\%$ of the mean.

Protein concentration

Protein concentration was measured by the method of Bradford [14], using bovine serum albumin as standard.

Enzyme adsorption

The adsorption to avicel was determined by incubating 200 μ l of enzyme sample with 0.1 g of avicel in 800 μ l of 50 mM Sodium-citrate buffer, pH 6.0 at 4°C for 15 min. The incubation mixture was centrifuged at 8000 rpm for 10 min and the supernatant assayed for residual xylanase and endoglucanase activities [15].

Synergistic effect

The synergism between the xylanase samples from sugar cane bagasse, wheat bran and banana

stem crude extracts were determined through the quantification of the reducing sugars released during the oat spelt xylan breakdown. It was determined by incubating different proportions (30% – 70%, 40% – 60%, 50% – 50%, 60% – 40%, 70% – 30% and 33% – 33% – 33%) of enzyme samples with 100 μ l of substrate (oat spelt xylan).

Partial purification of xylanase

The partial purification steps were carried out at room temperature. The crude extract samples were concentrated by ultrafiltration using an Amicon System fitted with 300 kDa (PM 300) and 50 kDa (PM 50) cut-off-point membranes. Aliquots of the concentrate samples of PM 300 and PM 50 were fractionated by gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 (2.50 x 60.00 cm) and Sephacryl S-100 (3.00 x 40.00 cm) columns pre-equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and 0.15 M NaCl. Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 20 ml.h⁻¹. Fractions corresponding to xylanase activity were pooled and stored at 4°C.

Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as described by Laemmli [16] using a 12% gel. After denaturing electrophoresis, the gel containing 1% xylan was cut longitudinally into two pieces. One piece of the gel was silver stained for protein by the method of Blum *et al.* [17] and the other was treated with Triton X-100 (1%) for 30 min at 4°C and submitted to further incubation with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 for 10 min at 50°C. It was stained for xylanase activity by incubating with Congo red (0.1%) for 30 min at room temperature under agitation. After staining, the gel was washed with water to remove excess of Congo red and destained for 30 min with 1 M NaCl at room temperature. Acetic acid (100 mM) was added in order to obtain better band visualization [18].

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme production

From the point of view of economical holocellulose-degrading enzyme activity production, it is desirable to use an inexpensive carbon source.

In a previous article, *A. nainiana* was screened for its ability to produce holocellulose-degrading enzymes in a medium containing banana plant residue as the carbon source [19]. In this context, a comparison was made of the activity of holocellulose-degrading enzymes from *A. nainiana* during growth on different lignocellulosic substrates. For convenience, culture conditions (the amount of substrate, temperature, pH, inoculum and incubation period) and enzyme assays were the same for all substrates. The carbon sources included sugar cane bagasse, banana stem and wheat bran. A more pronounced effect of agriculture residues on the production of holocellulose-degrading enzyme activities was obtained by using banana stem. Superior enzyme activities were produced in the presence of banana stem as substrate. It is worth to mention that banana stem is a rich source of holocellulose, accounting as much as 45.6% of the dry weight of this component [20]. Banana plant residue was found to be a suitable substrate for production of holocellulose-degrading enzymes of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* strains and *Humicola grisea* var. *thermoidea* [19, 21]. In all present enzyme preparations, most of the best yield of activity was reported to xylanase followed by FPase and mannanase. However, low yields of holocellulose-degrading enzyme activities were obtained using sugar cane bagasse, except to pectinase activity.

The growth profile of *A. nainiana* on banana stem, sugar cane bagasse and wheat bran was accompanied by an inductive effect on xylanase, pectinase, mannanase, FPase and endoglucanase activities. The induction profile after growth on wheat bran, banana stem and sugar cane bagasse showed that xylanase, endoglucanase, FPase, mannanase and pectinase activities increased without a lag and were detected from the first day to the end of cultivation period. In case of banana stem as the carbon source, their highest values for most enzyme activities were reached at the fourth day of incubation, except to FPase activity which was accompanied by two major peaks at the fourth and twelfth days of incubation, while mannanase activity showed a rapid decrease after 4 day cultivation. For the growth on wheat bran and sugar cane bagasse, xylanase activity remained

constant after the fourth day of incubation. Pectinase activity reached its maximum at twelfth day of incubation with medium containing sugar cane bagasse.

Enzyme characterization

Enzyme activity is influenced by numerous factors such as temperature and pH. For comparative purposes, xylanase and endoglucanase activities from crude extract samples of sugar cane bagasse, banana stem and wheat bran were assayed at different pH and temperature values (Tables 1 and 2). The maximum xylanase activity varied from 55 to 70°C, being that the highest temperature was detected for xylanase activity from crude extracts samples of banana stem and wheat bran. In opposite to xylanase activity, a decrease in optimum temperature values was observed for all endoglucanase samples. Among them, the highest temperature value was observed for crude endoglucanase from sugar cane bagasse extract. The optimum pH profile showed that crude xylanase activity from wheat bran extract was more active at pH 7.0, while a maximum activity was obtained at pH 5.5 for crude xylanase from sugar cane bagasse. All endoglucanase samples were more active at acidic pH range.

Table 1. Optimal temperature for xylanase and endoglucanase activities from crude extract samples of *A. nainiana*.

Crude extract	Endoglucanase	Xylanase
Banana stem	40°C	70°C
Wheat bran	40°C	70°C
Sugar cane bagasse	50°C	55°C

Table 2. Optimal pH for xylanase and endoglucanase activities from crude extract samples of *A. nainiana*.

Crude Extract	Endoglucanase	Xylanase
Banana stem	4.5	6.5
Wheat bran	5.5	7.0
Sugar cane bagasse	5.5	5.5

The stability under different processing conditions (pH and temperature) was determined for crude xylanase and endoglucanase activities. Thermal and pH stabilities are considered to be important parameters to industrial application of holocellulose-degrading enzymes. Some applications of xylanases, including biobleaching process of paper pulp, require thermostable enzymes [22]. It is relevant to mention that xylanase activities from banana stem and wheat bran extracts exhibited high stability at their optimum pH (Table 3). In addition, crude xylanase from banana stem extract was also very stable at 60°C with a half-life of 264 h. In contrast, xylanase from sugar cane bagasse extract was much less stable. The addition of L-cysteine and L-tryptophan to the incubation mixtures at 50°C and 60°C did not result in an improvement of the enzyme stability (results not shown). It may note that L-cysteine had no influence on the half-life of xylanase from sugar cane bagasse extract. However, it caused a negative effect on xylanase activities of banana stem and wheat bran extracts. This was confirmed by a reduction of their half-lives. Although L-tryptophan is believed to be involved in the substrate binding of xylanases [23] all crude xylanases presented a decrease in their half-lives. We cannot discard unspecific interactions involving L-cysteine and/or L-tryptophan during incubation period.

Endoglucanase was less stable than xylanase from banana stem and wheat bran extracts (Table 3). However, crude endoglucanase from sugar cane bagasse extract exhibited half-life higher than xylanase. Incubation with L-cysteine increased the stability of endoglucanase from banana stem and wheat bran extracts, suggesting an influence of L-cysteine in the catalysis of cellulose (result not shown). Crude endoglucanase from sugar cane bagasse extract demonstrated a small decrease in its activity when incubated with L-cysteine. All crude endoglucanase exhibited an increase of their half-lives during incubation with L-tryptophan (results not shown), especially the endoglucanase activities from wheat bran and banana stem that showed half-lives of 96 and 144 h. Involvement of cysteine residue in the maintenance of the tertiary structure of the active site was reported for a xylanase from *Myrothecium verrucaria* [24].

Table 3. Stability (in hour) of xylanase and endoglucanase activities at their optimal pH and 50°C.

Crude Extract	Xylanase ($T_{1/2}$)	Endoglucanase ($T_{1/2}$)
Banana Stem	> 360	4
Wheat bran	264	6
Sugar cane bagasse	24	6

L-Tryptophan and L-cysteine were described to activate crude xylanase activities from *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum* [25].

Kinetic parameters of endoglucanase and xylanase over CMC and xylan (soluble and insoluble), respectively were carried out with crude extracts consisting of a pool of enzymes, probably competing for the same substrate and displaying different K_m values. Although the enzyme preparations are not pure, the results presented in Table 5 give some informations about the kinetic performance of an enzyme pool on specific substrates. The determination of kinetic parameters of xylanase samples acting on different xylyns showed that the enzyme from sugar cane bagasse extract had higher affinity for soluble and insoluble oat spelt xylyns than xylanases from banana stem and wheat bran extracts (Table 4). A significant difference in apparent K_m values for soluble and insoluble oat spelt xylyns was obtained for xylanase from banana stem extract. A highest K_m value was observed for insoluble xylan in the presence of xylanase from banana stem extract. It may be noted that the xylan breakdown is dependent on several factors, including enzyme synergism, the interaction with different subsites on the heterogeneous substrate, the interaction of the subunits within the xylanase and probable presence of binding molecules in addition to the catalytic modules (which show different affinities for soluble and insoluble xylan) [26]. Furthermore, it must be considered the difficulties to determine kinetic parameters with a polymeric and rather undefined substrate in which each molecule has a different number of attacking points. Besides, multiple enzymes are present,

Table 4. Km values (mg.ml⁻¹) of xylanase and endoglucanase activities from crude extracts of banana stem, wheat bran and sugar cane bagasse.

Crude extract	CMC	Soluble xylan	Insoluble xylan
Banana stem	5.47	4.21	14.47
Wheat bran	6.58	5.32	4.45
Sugar cane bagasse	0.22	1.87	1.53

Table 5. Synergism of xylanase activity from crude extract samples of wheat bran (WB), banana stem (BS) and sugar cane bagasse (SCB).

Crude enzyme	% increase	Crude enzyme	% increase
50%BS + 50%WB	346	70%BS + 30%SCB	122
60%BS + 40%WB	429	30%BS + 70%SCB	119
40%BS + 60%WB	352	50%WB + 50%SCB	145
70%BS + 30%WB	354	60%WB + 40%SCB	161
30%BS + 70%WB	357	40%WB + 60%SCB	161
50%BS + 50%SCB	101	70%WB + 30%SCB	143
60%BS + 40%SCB	67	30%WB + 70%SCB	153
40%BS + 60%SCB	129	33%BS + 33%WB + 33%SCB	0

most likely displaying different Km values. The most striking difference in K_m values was obtained for endoglucanase from sugar cane bagasse extract. In this case, the K_m value was much lower than those obtained for endoglucanase activity from banana stem and wheat bran. Data acquired with pure enzymes would be much more valuable and considered in a near future.

Adsorption of enzymes on avicel

Xylanases from all crude extract samples showed high binding ability toward microcrystalline cellulose (avicel), suggesting the presence of carbohydrate binding module (CBM) in their structures. Xylanase activities from wheat bran, banana stem and sugar cane bagasse extracts showed 74, 75 and 99% of binding percent to avicel, respectively. Xylanase is reported to present a modular architecture that comprises a catalytic module linked to one or more CBM [27]. This non-catalytic module mediates a prolonged

and intimate contact of the enzyme with avicel, eliciting efficient hydrolysis of the insoluble substrate.

Synergism

The efficient and extensive hydrolysis of holocellulose requires the cooperative interactions of a variety of main chains and side chain cleaving enzymes of different specificities. Synergy is observed when the amount of products formed by two or more enzymes acting together exceeds the arithmetic sum of the products formed by the action of each individual enzyme [28]. The activity of xylanase from crude extract samples of sugar cane bagasse, banana stem and wheat bran were tested in different combinations. Xylanase activity was a particular striking example of synergism (Table 5). The amount of reducing sugar released was increased when xylanase activities from crude extract samples of banana stem and wheat bran were used simultaneously. The best release was obtained for the following

combinations, respectively: 60% and 40%, 30% and 70% and 70% and 30%.

Partial purification of xylan-degrading enzyme

The xylanase obtained from *A. nainiana* when grown in lignocellulosic substrates were partially purified by a combination of ultrafiltration and gel filtration procedures. The concentrate and

ultrafiltrate samples were assayed for xylanase, mannanase, pectinase, endoglucanase, FPase and β -glucosidase activities as a matter of course. The ultrafiltration profiles with 300 and 50 kDa cut-off point membranes showed that xylanase, endoglucanase and mannanase activities could be found in all concentrate and ultrafiltrate samples, while FPase from sugar cane bagasse extract was

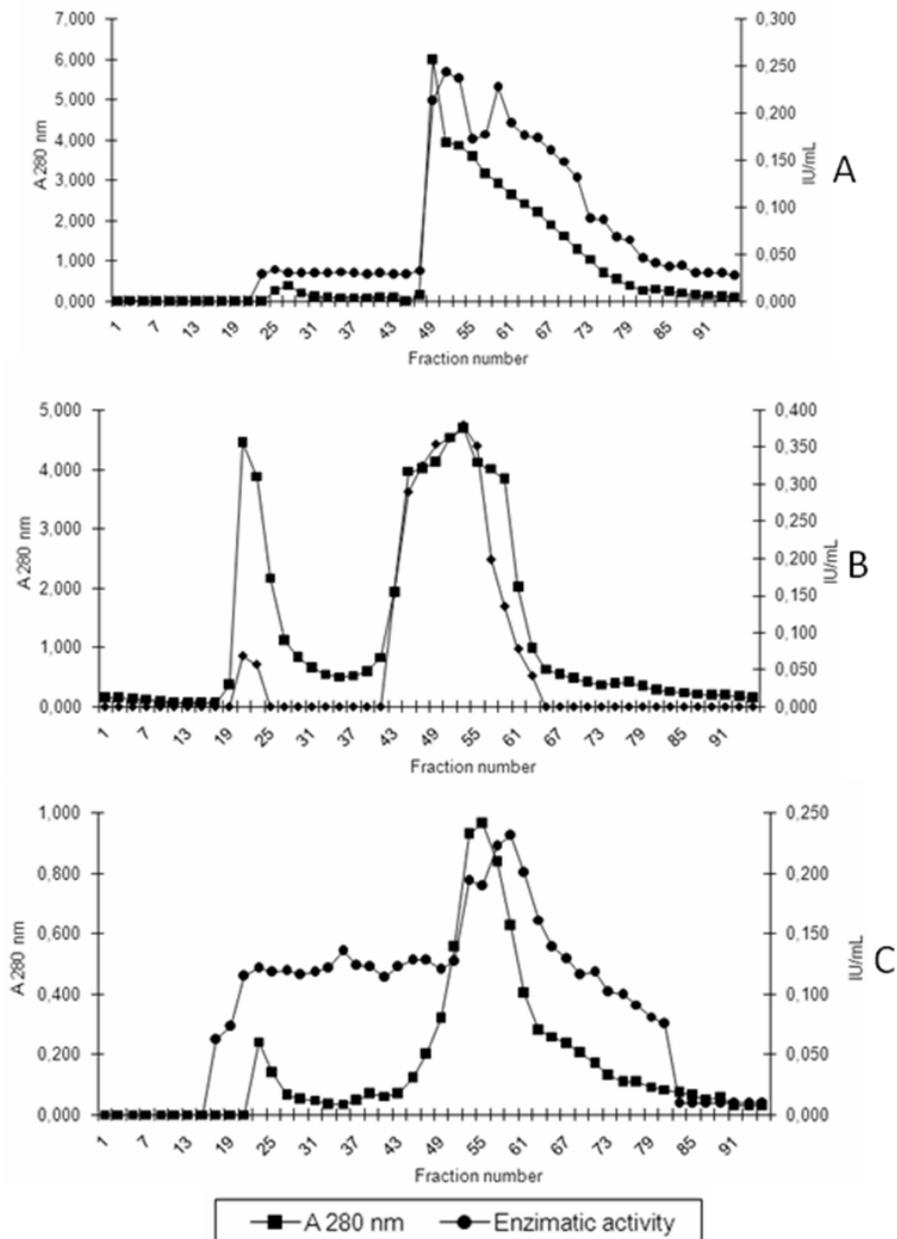


Figure 1. Elution profiles on Sephacryl S-400 of xylanase activity from concentrate samples of PM 300 membrane. Wheat bran (A), banana stem (B) and sugar cane bagasse (C).

only detected in the concentrate of PM 300. With respect to pectinase, it should be noted the absence of this activity in the ultrafiltrates of PM 50. The concentrate samples of PM 300 were responsible for the highest levels of

holocellulose-degrading enzyme activities, except to pectinase activity which, curiously, showed the best yield at concentrate samples of PM 50 (results not shown). In comparison to banana stem extract, a low level of β -glucosidase activity was

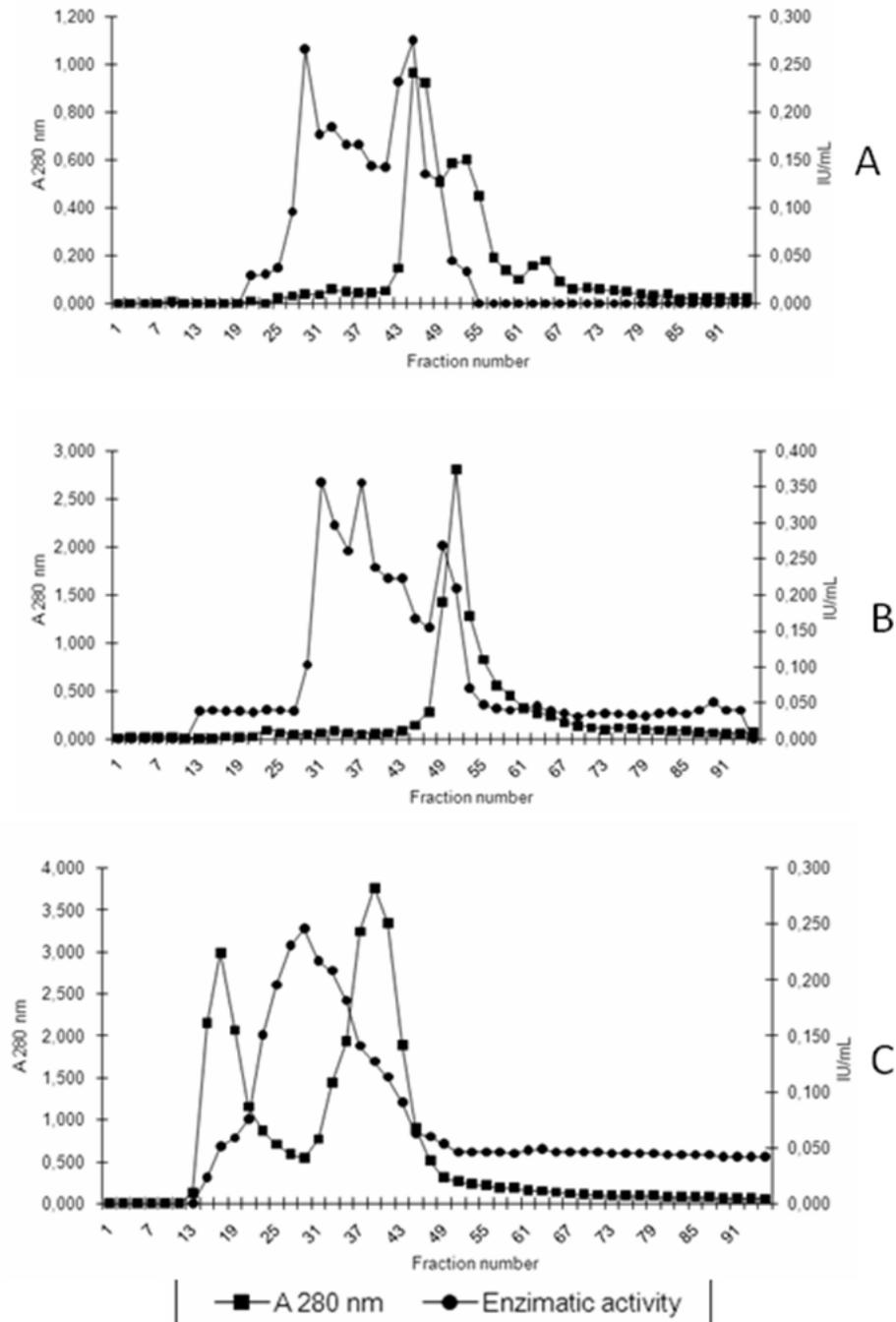


Figure 2. Elution profiles on Sephacryl S-100 of xylanase activity from concentrate samples of ultrafiltration on PM 50 membrane. Wheat bran (A), banana stem (B) and sugar cane bagasse (C).

obtained in the concentrates and ultrafiltrates samples of PM 300 and PM 50 when wheat bran extract was the enzyme source. The ultrafiltration of sugar cane bagasse extract on PM 300 showed no detectable activity in the ultrafiltrate. These results indicate that ultrafiltration is useful tool for separation of holocellulose-degrading enzymes. Some enzymes are able to diffuse through the pores of the ultrafiltration membrane. Perhaps this ability to penetrate the ultrafiltration membrane is due to their compact structures or to the nonuniformity of pore sizes in the membrane [24, 29]. Furthermore, the ability of some holocellulose-degrading enzymes to penetrate small pores would facilitate the interaction between the enzyme and the complex holocellulosic structure present in plant cell wall. This is advantageous, especially when we may consider the ability of such enzymes to diffuse through small pores in wood, and so to penetrate the holocellulose-lignin matrix [24].

The fractionation of crude extract samples by ultrafiltration showed an xylanase multiplicity and this was evidenced by gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 and S-100 of concentrate samples from ultrafiltration procedures using PM 300 and PM 50 membranes, respectively (Figs. 1 and 2). Holocellulose-degrading enzyme purification has generally used standard chromatographic methods such as gel filtration. The gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 and S-100 resulted in the separation of several peaks of others holocellulose-degrading enzyme activities, including mannanase, pectinase and endoglucanase activities (results not shown). Accordingly, the chromatography profiles of holocellulose-degrading enzymes on Sephacryl S-400 and S-100 displayed on figures 1 and 2 refer to the partial purification of xylanase activity. Several peaks of xylanase activity were resolved by gel filtration on Sephacryl S-400 and S-100. The chromatography profile showed some striking features, including high xylanase activity at low A_{280} (Figs. 1C, 2A and 2B). The complexity and nature of holocellulose require the presence of multiple holocellulose-degrading enzymes forms for efficient degradation of the structure. The

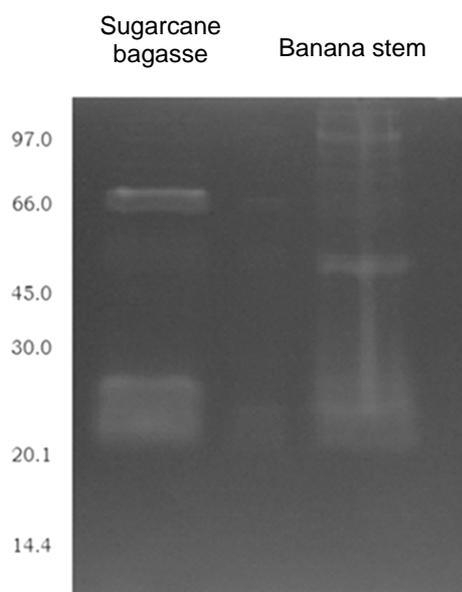


Figure 3. Zymogram analysis of crude xylanase from sugar cane bagasse and banana stem extracts.

xylanase multiplicity could also be detected by zymogram analysis of crude enzyme preparations after growth on sugar cane bagasse and banana stem (Fig. 3). The zymogram analysis was performed by renaturing the enzyme after electrophoresis and visualized by staining with Congo red. A clear hydrolysis activity zone was formed against a dark background. In this case, it revealed the presence of xylanases with molecular mass range of approximately 66-26 and 97-26 kDa for sugar cane bagasse and banana stem extracts, respectively. The identification of a 97 kDa band staining for xylanase activity suggest the involvement of an enzyme complex in banana stem degradation. Only a faint band of xylanase activity was detected by zymogram of wheat bran extract (result not shown). Besides, the chromatography profile of banana stem concentrate on S-400 showed one peak of protein co-eluted with xylanase, pectinase, endoglucanase and β -glucosidase activities in the void volume (result not shown). A number of findings indicate that not all extracellular holocellulose-degrading enzymes of fungi exists as uncomplexed individual entities [30]. A multiactivity preparation was isolated from *Penicillium capsulatum* [30]. The purified complex was able to degrade different

type of substrates, including β -glucan and β -laminarin.

CONCLUDING REMARKS

Despite their obvious importance in the degradation of holocellulose and the fact that the holocellulose-degrading enzyme activities are known to be produced by various fungi and bacteria, the characterization of those enzyme systems is a strategic issue, especially when it deals with lignocellulosic substrates from different sources. The results obtained suggest the suitability of using such cheap sources such as banana stem for production of holocellulose-degrading enzymes. Taken together, the results from thermostability and pH stability strongly suggest stable enzymes for pH and temperature, especially for xylanase activity. Further work will be carried out to purify and determine the role of the purified xylan-degrading enzyme on the hydrolysis of sugar cane bagasse, wheat bran and banana stem.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from FINEP (Bietanol) and CNPq (processes 470067/2006-3 and 470358/2007-6). E. X. F. F. and L. R. S. M. acknowledge receipt of a research fellowship from CNPq and FINEP, respectively. A. V. M. acknowledges receipt of undergraduate research fellowship from CNPq.

REFERENCES

- Freer, S. N., Skory, C. D., and Bothast, R. J. 1998, Recent Research Developments in Microbiology, Panadalai, S. G. (Ed.) Reserch Signpost, Trivandrum, India, 201.
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., and Mielenz, J. R. 2006, *Biotechnol. Adv.*, 24, 452.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., la Rubia, T., and Martinez, J. 2002, *Int. Microbiol.*, 5, 53.
- Silva, R., Lago, E. S., Merheb, C. W., Macchione, M. M., Park, Y. K., and Gomes, E. 2005, *Brazilian J. Microbiol.*, 36, 235.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., and Soccol, V. T. 2000, *Biores. Technol.*, 74, 69.
- Cherry, J. R., and Fidantsef, A. L. 2003, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 14, 438.
- Cardoso, O. A. V., and Filho, E. X. F. 2003, *FEMS Microbiol. Lett.*, 223, 309.
- Celestino, S. M. C., Freitas, S. M., Medrano, F. J., Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. 2006, *J. Biotechnol.*, 123, 33.
- Medeiros, R. G., Silva Jr, F. G., Salles, B. C., Estelles, R. S., and Filho, E. X. F. 2002, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 204.
- Salles, B. C., Cunha, R. B., Fontes, W., Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. 2000, *J. Biotechnol.*, 81, 199.
- Salles, B. C., Medeiros, R. G., Bão, S. N., Silva Jr, F. G., and Filho, E. X. F. 2005, *Process Biochem.*, 40, 343.
- Miller, G. L. 1959, *Anal. Chem.*, 31, 426.
- Leatherbarrow, R. J. 1987, *Enzfitter: A Non-Linear Regression Data Analysis Program for the IBM PC*. Biosoft, London, 1.
- Bradford, M. M. 1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248.
- Badhan, A. K., Chadha, B. S., Kaur, J., Saini, H. S., and Bhat, M. K. 2007, *Biores. Technol.*, 98, 504.
- Laemmli, U. K. 1970, *Nature*, 227, 680.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, B. 1987, *Electrophoresis*, 8, 93.
- Nascimento, R. P., Coelho, R. R. R., Marques, S., Alves, L., Gírio, F. M., Bon, E. P. S., and Amaral-Collaco, M. T. 2002, *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 549.
- Medeiros, R. G., Soffner, M. L. A. P., Thomé, J. A., Cacaís, A. O. G., Estelles, R. S., Salles, B. C., Ferreira, H. M., Neto, S. A. L., Silva Jr, F. G., and Filho, E. X. F. 2000, *Biotechnol. Progress*, 76, 522.
- Soffner, M. L. A. P., *Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira*. Master dissertation, 2001, University of São Paulo, Brasil.
- Krishna, C. 1999, *Biores. Technol.*, 69, 231.
- Filho, E. X. F. 1998, Recent Research Developments in Microbiology, Panadalai, S. G. (Ed.), Reserch Signpost, Trivandrum, India, 165.
- Coughlan, M. P. 1992, Xylan and xylanases, Visser, J., Beldman, G., van Someren, M. A. K., and van Voragen, A. G. J. (Eds), *Elevier Science*, Amsterdam, 111.
- Filho, E. X. F., Puls, J., and Coughlan, M. P. 1993, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 535.

25. Medeiros, R. G., Hanada, R., and Filho, E. X. F. 2003, *Int. Biodet. Biodegrad.*, 52, 97.
26. Vieira, W. B., Moreira, L. R. S., Neto, A. M., and Filho, E. X. F. 2007, *Brazilian J. Microbiol.*, 38, 237.
27. Fontes, C. M. G. A., Ponte, P. I. P., Reis, T. C., Soares, M. C., Gama, L. T., Dias, F. M. V., and Ferreira, L. M. A. 2004, *British Poultry Sci.*, 45, 648.
28. Coughlan, M. P., Tuohy, M. G., Filho, E. X. F., Puls, J., Claeysens, M., Vranská, M., and Hughes, M. M. 1993, *Hemicellulose and hemicellulases*, Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P. (Eds), Portland Press, London, 53.
29. Grabski, A. C., Forrester, I. T., Patel, R., and Jeffries, T. W. 1993, *Prot. Express Purification*, 4, 120.
30. Connelly, I. C., Filho, E. X. F., Healy, A. M., Fleming, M., Griffin, T. O., Mayer, F., and Coughlan, M. P. 1993, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 470.

Capítulo XI

*Activity Profile And Saccharification Potential Of Sugarcane Bagasse Of An Enzyme Preparation From *Acrophialophora nainiana* When Grown On Different Carbon Sources.*

Resumo expandido publicado como coautor, em 2009, no VIII

Simpósio de Hidrólise Enzimática Biomassa (SHEB)

Marcos H. L. Silveira¹; Martinho Rau.¹; Larissa da Silva¹; Felix G. Siqueira², Edivaldo F. F. Ximenes² and Jürgen Andreaus^{1}.*

¹*Department of Chemistry, Regional University of Blumenau, 89010-971, Blumenau, Brazil.*

²*Department of Cellular Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil.*

RESUMO

O perfil das atividades de xilanase, pectinase, FPases (celulase total) e CMCase (endoglicanase), como também o potencial de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelos extratos brutos de *Acrophialophora nainiana* crescido em quatro fontes de carbono diferentes, foram realizados no Laboratório de Química Têxtil (FURB). A contribuição como colaborador neste trabalho foi dada pela coleta dos resíduos lignocelulósicos, em fazendas da região do Distrito Federal e entorno, para a realização dos cultivos do fungo em meios submersos com estes resíduos como fonte de carbono, como também purificação parcial dos extratos brutos com caracterização enzimática preliminares. Dados parciais deste trabalho foram apresentados no VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática Biomassa (SHEB), realizado na cidade de Maringá, PR, em 2009.

1. Introduction

Filamentous fungi are good cellulase producers and these enzymes can be used for the production of biofuels and the processing of textiles and in food industry. *Acrophialophora*

nainiana, is a thermotolerant ascomycete, found in the central region of Brazil, a good producer of carbohydrases including cellulases [1], xylanases and pectinases which are important for the total enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials [3].

In the present work the enzyme profile and the saccharification potential of sugarcane bagasse of enzyme preparations from *Acrophialophora nainiana* grown on different carbon sources were studied.

2. Materials and Methods

Acrophialophora nainiana was grown on 4 different carbon sources, including 2 agro-industrial wastes: cellulose, banana stem, cotton and sugarcane bagasse. The enzymatic profile was characterized at 50°C assaying for xylanase, pectinase, filter paper activities, FPA_{tot} , FPA_{sol} and FPA_{insol} , and CMCase activity. Xylanase, pectinase and CMCase activities were determined by reacting 250 μ L of 1% (w/v) substrate solutions of xylan and pectin and 4% (w/v) carboxymethyl cellulose solution, respectively, with 250 μ L of enzyme culture for 30 minutes. Glucose, xylose and galacturonic acid were used as standards. Filter paper activities (FPA) were analyzed as described [2] using Whatman filter paper N°1 as substrate. Sugarcane bagasse hydrolysis experiments were carried out with untreated and pre-treated (acid, steam exploded) sugar cane bagasse at pH 5.0 (acetate buffer 0.1M) and 50°C for 48h.

3. Results and Discussion

a. Total Protein

The total protein content of the different enzyme preparations is shown in *Figure 1*. The highest protein yield was achieved with banana stem as carbon source (1.56 ± 0.05 and mg.mL^{-1}), followed by cellulose (1.03 ± 0.02 and mg.mL^{-1}).

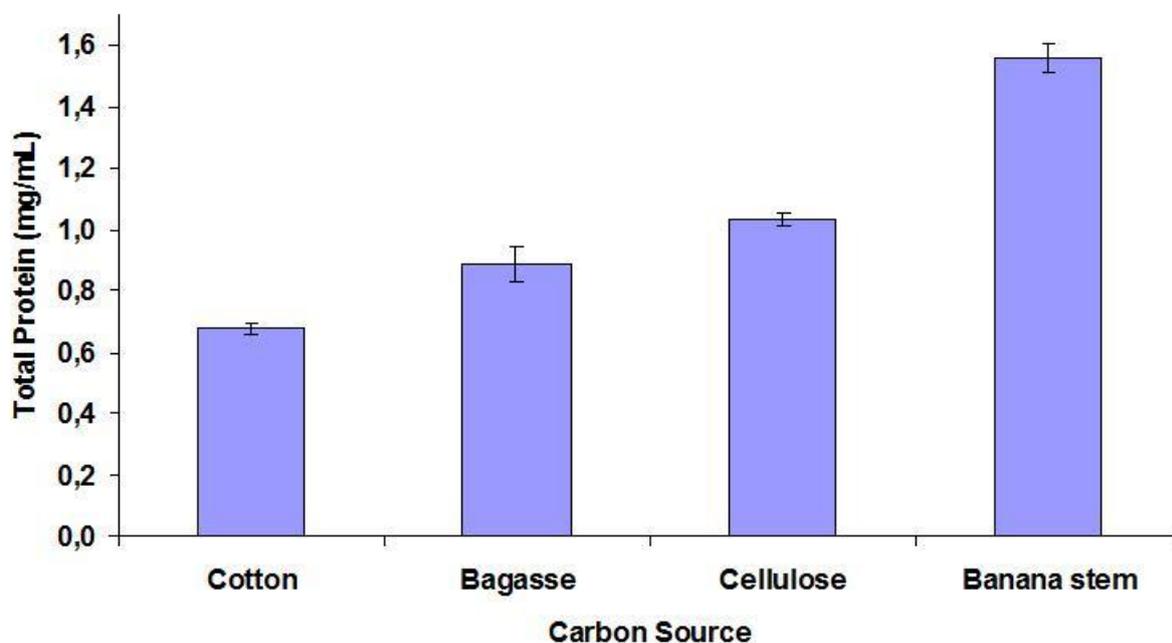


Figure 1. Total protein content of enzyme preparations from *A. nainiana* when grown on different carbon sources.

b. Enzymatic Profile

Figure 2 shows the activity profile for xylanase, pectinase, CMCCase, FPA_{tot}, FPA_{sol}, FPA_{insol} of the different enzyme preparations. Xylanase and pectinase activity were predominant in all enzyme preparations, except for banana stem as carbon source where CMCCase activity was higher than pectinase activity. The banana stem enzyme preparation showed the best activity profile with regard to xylanase ($0,077 \pm 0,001$ IU), FPA_{tot} ($0,0108 \pm 0,001$ IU), FPA_{sol} ($0,0104 \pm 0,001$ IU), FPA_{insol} ($0,025 \pm 0,001$ IU) and CMCCase ($0,038 \pm 0,0010$ IU).

The highest total filter paper activity was observed for sugarcane bagasse and banana stem as carbon source. Results are in good agreement with the literature that reports *A. nainiana* as a good xylanase and pectinase producer [1].

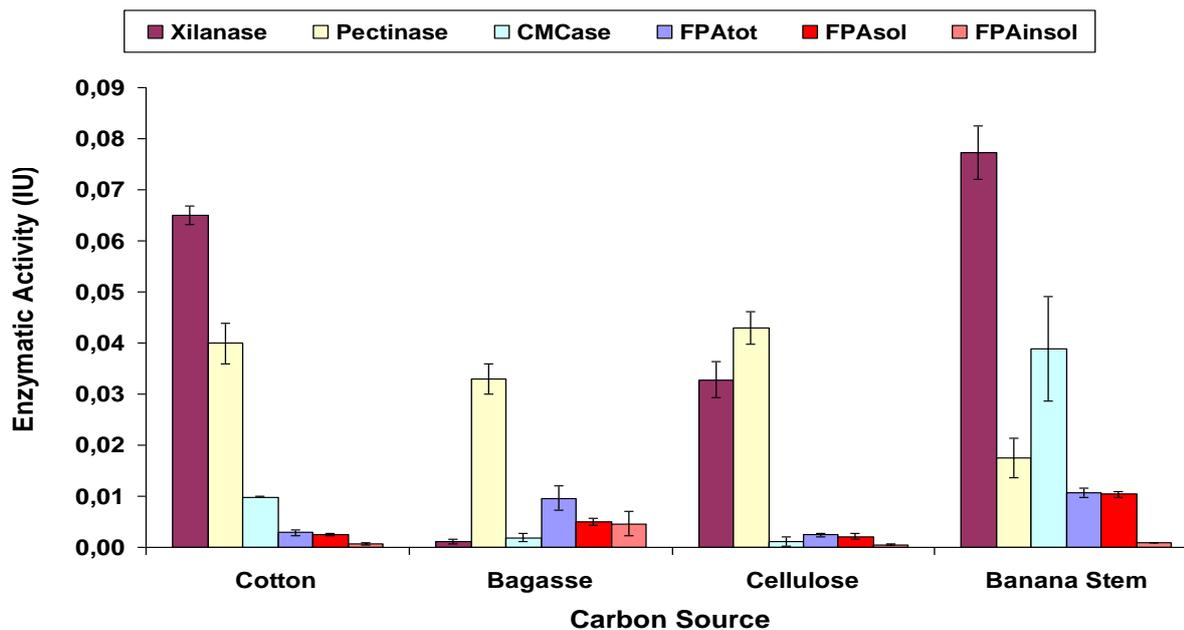


Figure 2: Enzymatic activity profile of enzyme preparations of *A. nainiana* grown on different C-sources.

c. Sugarcane Bagasse Saccharification

Figure 3 shows the hydrolysis results of differently pretreated sugarcane bagasse during 48 h with the enzyme preparations from *A. nainiana* grown on banana stem.

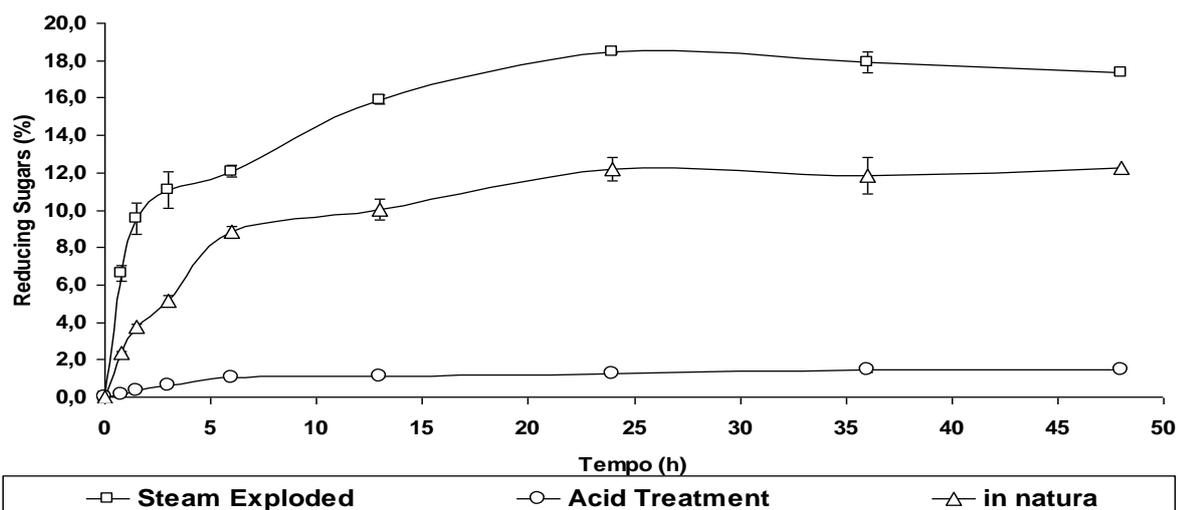


Figure 3. Enzymatic hydrolysis (% conversion in reducing sugars; given as glucose equivalents) of sugar cane bagasse (in natura - untreated; steam exploded; treated with sulphuric acid) with banana stem grown *A. nainiana* preparation.

The highest initial hydrolysis rate (until 3h) and final conversion (after 48 h) into reducing soluble sugars (RS) ($17,37 \pm 0,55$ %) were obtained for steam pre-treated sugarcane bagasse, followed by untreated (*in natura*) bagasse ($12,29 \pm 0,96$ % of total conversion). The low conversion obtained for the acid treated bagasse $1,47 \pm 0,10$ % may be partly attributed to the removal of hemicellulases in the acid pre-treatment step enriching percentual of lignin on substrate sugarcane bagasse.

4. Conclusions

The enzyme preparation from *A. nainiana* grown on banana stem showed the most interesting carbohydrase activity profile, with high xylanase and CMCase activity. Despite of a high initial saccharification rate a relatively low conversion after 48 h of steam exploded sugarcane bagasse was obtained with this preparation. The low overall conversion observed with the banana stem enzyme preparation of *A. nainiana* can be ascribed to the low enzyme activity of the enzyme preparation, the low enzyme load per mass bagasse and the high hemicellulase but relatively low cellulase activity.

5. Acknowledgements

FINEP, CNPq, CAPES, FURB

6. References

1. RAU, M.; HEIDEMANN, C.; PASCOALIN, A.M.; FILHO, E.X.F.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. ; CHAGAS, C.F.; ANDREAUS, J. **Biocat. And Biotransf.**, 26, 1-8, 2008.
2. SILVEIRA, M.H.L.; RAU, M.; ANDREAUS, J. **Anal. Biochem.**, submitted, 2009.
3. ANDREAUS, J.; FILHO, E.X.F.; BON, E.P.S. In: Hou, C. T.; Shaw, J-f. **Biocatalysis and Bioenergy. Hodoken: John Wiley & Sons.** Cap 11. p. 197-230. 2008.

Capítulo XII

*Purification and characterization studies of an acidic thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*.*

Artigo publicado como coautor, em 2010, no periódico *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*

Ricardo S. S. Teixeira^{1*}, Félix G. Siqueira², Marcelo V. Sousa³, Edivaldo X. F. Filho², Elba Bon¹.

¹Enzyme Technology Laboratory, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro;

²Laboratory of Enzymology, University of Brasilia; ³Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, University of Brasilia.

RESUMO

Por meio da colaboração entre o Laboratório de Enzimologia da UnB e o Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFRJ foram realizadas a purificação e a caracterização enzimática de uma β -xilanase do *A. awamori* crescido em meio submerso, tendo como fonte de carbono o farelo de trigo. A purificação foi realizada por meio de ultrafiltração por membrana, coluna cromatográfica de exclusão molecular e troca iônica, utilizando-se géis de eletroforese e zimograma para conferir o grau de pureza. A confirmação da massa molecular desta enzima foi realizada por espectrometria de massa. A enzima purificada foi incubada com diferentes agentes químicos e aminoácidos, para verificar o comportamento da atividade enzimática, como também ocorreu a incubação com íons metálicos e EDTA. A enzima apresentou aumento de atividade superior a 37%, quando incubada com L-triptofano e 34% com adição de íons de $MnCl_2$. Esta enzima também apresentou atividade significativa após 20 dias de incubação a 50°C, em pH 5, desmostrando também manter atividade enzimática significativa, mesmo em temperatura acima de 60°C.

RESEARCH PAPER

This paper will be submit to the journal “Enzyme and Microbial Technology”

ISSN:0141-0229 - imprint: ELSEVIER

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION STUDIES OF AN ACIDIC
THERMOSTABLE β -XYLANASE FROM *Aspergillus awamori***

**Ricardo S. S. Teixeira^{1*}, Félix G. Siqueira², Marcelo V. Sousa³, Edivaldo X.
F. Filho², Elba P. S. Bon¹.**

¹Enzyme Technology Laboratory, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro; ²Laboratory of Enzymology, University of Brasilia; ³Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, University of Brasilia.

*Corresponding Author

Elba P. S. Bon

Enzyme Technology Laboratory

Biochemistry Department - IQ/UFRJ

Tel: +55 21-2562-7359

CT - Bloco A - Ilha do Fundão - CEP 21949-900

Rio de Janeiro – RJ

E-mail: elba1996@iq.ufrj.br

Abstract

This study presents data on the production, purification and properties of a β -xylanase produced by *Aspergillus awamori*. The enzyme was purified to homogeneity from the culture supernatant of the filamentous fungus that was grown as submerged culture containing wheat bran as carbon source. The supernatant was fractionated by ultrafiltration using membranes with 300 and 100 kDa cut-off point. The enzyme preparation corresponding to the 100 kDa retentate was further purified by gel filtration (Sephacryl S-200) and ion-exchange chromatography (Q-Sepharose). This purification sequence allowed the isolation of a SDS-PAGE homogeneous xylanase preparation (PXII-1) whose molecular mass, determined by MS, was of 32.87 kDa. The specific activity of PXII-1 xylanase (490 IU mg^{-1}) was 17 fold higher than the specific activity of the culture supernatant. This preparation presented K_m (mg mL^{-1}) values of 11.8 and 9.45 for soluble oat spelts and birchwood xylan, respectively. Regardless of the enzyme purification degree, maximum activity was found at 50°C and in the pH range 5.0-5.5. This acidic PXII-1 xylanase showed 80% activity retention, upon incubation at pH 5.0, 50°C , for at least 16 days. However the incubation at pH 7.0, 50°C resulted on 50% activity loss within 3 days and within 1 hour at 55°C . PXII-1 xylanase stability, at pH 7.0, was greatly improved in the presence of 20 Mm L-cysteine as it was observed 85% activity retention for 25 days at 50°C , and for 1 day at 55°C .

Keywords: *Aspergillus awamori*, β -xylanase, acidic and thermostable xylanase, xylanase purification, xylanase characterization, L-cysteine xylanase stabilization.

Capítulo XIII

Inhibition of Cellulolytic Enzymes Due to Products of Hemicellulose

Hydrolysis

Artigo submetido, em abril de 2010, à revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB)* durante o 32nd *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*

Eduardo A. Ximenes², Youngmi Kim², Félix G. Siqueira¹, Edivaldo X. Ferreira-Filho¹, Nathan S. Mosier² and Michael R. Ladisch³.

¹Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Laboratory of Renewable Resources Engineering, Purdue University (LORRE), West Lafayette, IN, ³LORRE/Ag. and Bio. Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN.

RESUMO

Este trabalho foi realizado no LORRE (Purdue University) como colaborador, com o objetivo de avaliar a liberação de glicose por meio de hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos (*corn stover*) previamente pré-tratados com LHW, utilizando-se enzimas comerciais com diferentes combinações. Os resultados deste como a tabela 1 e as figuras 1 e 2, entre outros resultados, serão submetidos, em forma de artigo, à revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (JIMB)*, durante o 32nd *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, em abril de 2010.

Abstract

Hemicellulose products are inhibitory to cellulose hydrolysis. Xylose causes greater inhibition than xylan, but less than xylo-oligomers. Arabinose may be inhibitory to β -glucosidases. Our previous work indicated that β -glucosidase in Novozyme 188 may moderate cellulase inhibition by cellobiose when hydrolyzing it to glucose. However it may also release other inhibitors for cellulolytic enzymes due to the hydrolytic action of other enzyme components present in commercial β -glucosidases. To further investigate this hypothesis, we tested the hydrolysis of untreated and liquid hot water pretreated corn stover by the combined action of Spezyme CP and a purified *Aspergillus niger* β -glucosidase, and compared the results to the combined action of the former enzyme to Novozyme 188 and purified hemicellulases (xylanase and α -arabinofuranosidases) (Table 1; Figure 1 and 2). The results obtained show inhibitory effect in the presence of Novozyme 188, and the inhibition increases progressively by the simultaneous addition of the hemicellulases up to a maximum of 30% when combining xylanase and α -arabinofuranosidases. This work shows that inhibition is a complex phenomenon that is defined by both the chemical heterogeneous of corn stover and properties of β -glucosidases.

CONCLUSÕES FINAIS

E

PERSPECTIVAS

Considerações Finais e Perspectivas

Com os trabalhos descritos nesta tese demonstrou-se que os fungos filamentosos *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* e *Emericella nidulans*, *Acrophialophora nainiana*, *Pleurotus ostreatus* H1 e *Agaricus brasiliensis* CS1 são potenciais produtores de holocelulases quando crescidos em meios de cultivo com resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono. A atividade de xilanase e a poligalacturonase são as enzimas que mais se destacam nos cultivos desses fungos com estas fontes de carbono, tanto em condições de cultivo submerso quanto sólido (Tabela 1).

Os resíduos lignocelulósicos engaçó de bananeira, resíduos do re-beneficiamento de algodão (piolho-de-algodão), bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho são fontes de carbono que podem induzir a produção significativa de holocelulases no cultivo submerso ou sólido de fungos filamentosos, podendo sofrer pré-tratamento ou não (Tabela 1). A exploração da parede celular das plantas para a produção de holocelulases fúngicas continuará por meio da formação de uma “residoteca”, a qual levará em conta a disponibilidade dos resíduos agroindustriais da região e o montante produzido anualmente.

O pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos também será um dos focos para a continuidade desta tese. A autoclavagem seguida de lavagem dos substratos lignocelulósicos mostrou ser eficiente neste trabalho, porém, os custos desse tipo de pré-tratamento inviabilizam o processo em escala industrial. O *Pleurotus ostreatus* e o *Agaricus brasiliensis* CS1 utilizados como produtores de holocelulases nesta tese serão utilizados em uma pesquisa como agentes degradadores parciais de biomassa vegetal, ou seja, pré-tratamento biológico. Outros fungos filamentosos denominados como fungos de podridão-branca serão utilizados também como agentes de pré-tratamento biológico.

Tabela 1. Resumo das principais enzimas-características dos fungos utilizados neste trabalho, nas diferentes condições cultivos e fontes de carbono lignocelulósicas.

Espécie	Local de isolamento ou Origem	Enzima	Atividade (UI.mL ⁻¹)	Fonte de carbono lignocelulósica	Pré-tratamento (fontes de carbono lignocelulósica)	Forma de cultivo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>P. corylophilum</i>	Troncos em decomposição (Amazônia)	Xilanase (filtração gel S-200)	0,345	Resíduos da Colheita de Milho	SPT	SmF	ND	ND
<i>A. flavus</i>	Troncos em decomposição (Cerrado)	Xilanase (filtração gel S-400)	0,801	Engaço de Bananeira	SPT	SmF	4,5-5,5	50
<i>A. flavus</i>	Troncos em decomposição (Cerrado)	Poligalacturonase (extrato bruto)	4.547,6	Resíduos da Colheita de Milho	SPT	SSF	ND	ND
<i>A. flavus</i>	Troncos em decomposição (Cerrado)	Endoglicanase (extrato bruto)	439,9	Engaço de bananeira	SPT	SSF	ND	ND
<i>A. terreus</i>	Compostagem de resíduos do beneficiamento de algodão	Xilanase (extrato bruto)	3.510,1	Engaço de Bananeira	SPT	SmF	ND	ND
<i>A. terreus</i>	Compostagem de resíduos do beneficiamento de algodão	Xilanase (extrato bruto)	3.014,4	Bagaço de cana-de-açúcar	Autoclavagem-Lavagem	SmF	55-60	4,5-5,5
<i>A. oryzae</i>	Compostagem de resíduos do beneficiamento de algodão	Poligalacturonase (extrato bruto)	2.324,2	Engaço de bananeira	Autoclavagem-Lavagem	SSF	55	7,0-7,5
<i>E. nidulans</i>	Compostagem de resíduos do beneficiamento de algodão	Arabinofuranosidase (filtração gel S-400)	0,509	Piolho-de-algodão-sujo	SPT	SmF	ND	ND
<i>A. brasiliensis</i> CS1	Laboratório de Cogumelos Comestíveis da UFLA	Endoglucanase (extrato bruto)	315,3	Piolho-de-algodão-sujo	SPT	SSF	ND	ND
<i>P. ostreatus</i> H1	Laboratório de Cogumelos Comestíveis da UFLA	Poligacturonase (extrato bruto)	3.965,4	Bagaço de cana-de-açúcar	SPT	SSF	ND	ND

Legenda: SPT (Sem Pré-tratamento); SSF (Fermentação em Estado Sólido); SmF (Fermentação em Estado Líquido); ND (Não Determinado)

O engaço de bananeira foi uma das fontes de carbono que mais se destacaram na produção de poligacturonase e outras holocelulases dos fungos filamentosos. No entanto, a pigmentação escura produzida durante o cultivo dos fungos causam algumas dificuldades para purificação total, por interagirem com os géis de eletroforese, por exemplo. Também causam manchas em tecidos quando em aplicações de extratos brutos enzimáticos em processos têxteis. Por outro lado, esta pigmentação do engaço abre um leque para explorá-lo como corante natural de tecidos de algodão.

As xilanases de extratos brutos dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* cultivados em engaço de bananeira, resíduos da colheita de milho, bagaço de cana-de-açúcar ou piolho-de-algodão abrem a perspectiva de aplicação destas na indústria de polpa de papel kraft. Outra perspectiva que é visualizada é o estudo para aplicação de poligacturonase (pectinase) do fungo *A. oryzae* crescido em bagaço de cana-de-açúcar e outras cascas de frutas para aplicação na indústria alimentícia (produção de sucos naturais). Como também a purificação de arabinofuranosidase de *Emiricella nidulans* quando crescido em piolho-de-algodão-sujo como fonte de carbono.

A identificação dos *spots* protéicos dos géis bidimensionais dos *A. terreus*, *A. oryzae* e *E. nidulans* crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e piolho-de-algodão-sujo serão finalizados, por meio da continuidade do trabalho em conjunto com o Laboratório de Bioquímica e Proteômica da UnB.

O isolamento de mais de 20 fungos filamentosos da compostagem natural de resíduos de re-beneficiamento de algodão apresentou microrganismos com potenciais para a produção de holocelulases que podem ser ter diversas aplicações biotecnológicas. Estes fungos fazem parte hoje da micoteca do Laboratório de Enzimologia da UnB, da mesma forma que estão sendo agregados os isolados de fungos filamentosos do fitofisionoma Cerradão-Floresta do Cerrado brasileiro. A formação da micoteca terá continuação com o isolamento de estirpes de fungos filamentosos do solo, serrapilheira e troncos em decomposição das fitofissionomas Mata de Galeria, Cerrado Sensu Strictu, Campo Sujo e Campo Limpo. Estes isolados serão armazenados em óleo mineral, água

salina 1% e glicerol 18% em temperatura ambiente, como também em criotubos com glicerol 18% a -80°C (Deep-Freezer).

Por fim, no que tange à pesquisa de aplicação básica, esforços devem ser concentrados para encontrar um fungo ou fungos que possibilitem a produção de celulases, hemicelulases e pectinases capazes de hidrolisar a parede celular dos resíduos lignocelulósicos de forma eficiente, possibilitando, assim, a produção de bioetanol de segunda geração por meio de fermentação das hexoses provenientes desses resíduos lignocelulósicos e a utilização das pentoses para a produção de outros produtos, reforçando o conceito de biorrefinaria.

ANEXOS

Michael R. Ladisch, Ph.D.
Distinguished Professor and Director

January 14, 2010

Professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Head of Enzymology Laboratory
Cellular Biology Department
University of Brasília
70910-900 Brasília, DF Brazil

Dear Professor Filho:

Felix Siqueira spent the last 5 months in our laboratory carrying out fundamental research in the area of characterizing the inhibition of fungal celluolytic enzymes. It was a pleasure to have Felix to be part of our team, although the time went very quickly. Felix was very productive, and worked closely with other researchers in the laboratory to develop a rapid and high throughput assay for characterizing enzymatic activities. He worked very hard, while at the same time interacting with others in the LORRE in a manner that was most constructive for the progress of our overall research program. He helped to communicate the exciting research that is being carried out in your laboratory and Brazil. I was impressed not only by his capabilities, but also by his ability to quickly fit into a new laboratory, a new country, and a new research area. Felix has a standing invitation to return to the Laboratory of Renewable Resources Engineering to carry out further research on cellulose conversion and cellulase enzymes once he has completed his Ph.D. exams.

Thank you for arranging for this visit. It was wonderful to have the opportunity to become acquainted with a student from your laboratory, and specifically to have Felix join our group to initiate our cooperation. I hope there will be future opportunities for other students from Brazil, such as Felix, to come to Purdue University, and to exchange students to your laboratory in Brazil. I just wanted to convey to you my delight at Felix's work, and my appreciation for making the arrangements to have him work in our laboratory over the last 5 months. I look forward to our continued cooperation in the cellulose and cellulase enzyme areas.

Please give my best regards to Felix and my best wishes to both of you as he completes his Ph.D. thesis.

Sincerely yours,



Michael R. Ladisch
Distinguished Professor and Director

cc: B. Engel

MRL/csc