



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA**

LETÍCIA CARDOSO DOS PASSOS

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE
ENZIMAS XILANASE E β -GLICOSIDASE NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE
MANDIOCA**

Belém - PA

2015

LETÍCIA CARDOSO DOS PASSOS

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE
ENZIMAS XILANASE E β -GLICOSIDASE NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE
MANDIOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para Faculdade de Química,
Instituto de Ciências Exatas e Naturais,
Universidade Federal do Pará com vista a
obtenção do título de Bacharel em Química
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

Belém - PA

2015

LETÍCIA CARDOSO DOS PASSOS

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE
ENZIMAS XILANASE E β -GLICOSIDASE NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE
MANDIOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para Faculdade de Química,
Instituto de Ciências Exatas e Naturais,
Universidade Federal do Pará Com vista a
obtenção do título de Bacharel em Química
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

Data da Apresentação: **13 de fevereiro de 2015.**

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos
Faculdade de Química/UFPA – Orientador

Prof. Dr. Marivaldo José Costa Corrêa
Faculdade de Química/UFPA - Membro

Prof.^aDr^a Simone de Aviz Cardoso
Faculdade de Biotecnologia/UFPA – Membro

Dedico à minha mãe Bernadete Cardoso e minha avó Maria de Jesus Cardoso pelo incentivo durante essa árdua caminhada no curso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força de vontade que me concedeu durante toda a trajetória do curso.

À minha família pelo apoio incondicional nessa caminhada, em especial minha mãe Bernadete Cardoso, minha avó Maria de Jesus e meus tios Luciano Morais, Luís Morais, Fernando Matos e Fábio Matos.

Ao Professor Dr. Alberdan Silva Santos pela grande orientação e amizade na realização deste trabalho.

À todos os amigos do grupo LabISIsBio, em especial Marcela, Márcia, Suelen, Giovanna e Elaine que me auxiliaram nas análises no laboratório.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e revisão de texto.

À Márcia Freitas pela amizade, conselhos e oportunidade de aprendizado contínuo durante os primeiros semestres do curso.

Aos colegas de curso Fabiane Trindade, Kelly Guimarães e os queridos amigos da Equipe Cão, Luciane Rocha, Lorena Soares, Jean Sanger e Luciano Vieira pela ajuda e amizade durante a graduação.

À Yuri Nascimento e seus pais Rosemary e Antônio Nascimento pelo apoio e incentivo durante essa jornada árdua e pelos conselhos valiosos concedidos.

À tia Frans, *in memoriam*, que se estivesse viva ficaria extremamente feliz por mais essa vitória em minha vida.

À família Passos que apesar da distância sempre me apoiou nas escolhas profissionais, em especial minha avó Léa pelo amor e carinho.

Aos meus eternos amigos, Frankley Marcelino e Cliciane Moura pela amizade/irmandade de longa data.

Aos meus amigos do cursinho Débora Calandrini, Thaís Neves, Ingrid Storch e Paulo Assunção que estiveram comigo antes de entrar na Universidade e permaneceram até hoje sempre me apoiando e incentivando.

Aos amigos Carlos Reis e Ronaldo Santos pela grande amizade e por todo carinho.

Às minhas quase mães Araci Santos, Nilciene Ribeiro e Ana Crispim que sempre estiveram comigo nas comemorações e momentos felizes.

Aos meus familiares e amigos que não foram citados mas que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

As enzimas extracelulares são macromoléculas que possuem função biocatalisadora e são secretadas por microrganismos que atualmente possuem grande aplicabilidade industrial, principalmente na hidrólise de resíduos industriais. Segundo a literatura, os fungos filamentosos possuem alta capacidade de produção dessas enzimas no qual apresentam atividades hidrolíticas. Dessa forma, objetivou-se selecionar linhagens de fungos possuam alto potencial de produção de concentrados xilanásicos e β -glicosidásicos que sejam capazes de hidrolisar resíduos ricos em celulose e hemicelulose. As linhagens selecionadas foram ativadas e induzidas a produzir as enzimas estudadas em meios semi-sólidos. Após a realização dos testes de detecção para as enzimas estudadas, avaliou-se as linhagens selecionadas através de cultivo submerso durante um período de 240 horas e a produção dos concentrados pelas linhagens de maior potencial de produção durante 16 dias em agitação e modo estático. Em suma, a avaliação inicial em cultivo submerso mostrou que as linhagens MIBA 0300, MIBA 0346 e MIBA 0769 ofereceram destaques na produção de β -glicosidase e xilanase. Sendo assim, a produção dos concentrados de β -glicosidase obteve maior atividade igual a 3,9U/mL pela a linhagem MIBA 0300 mantida sob agitação e observado a inibição da atividade em cultivo estático. Na avaliação da enzima xilanase, observou-se maior atividade com 3.000 U/mL e 2.750 U/mL para MIBA 0769 e MIBA 0346 respectivamente nas quais foram mantidas sob agitação. A partir dos dados obtidos conclui-se que os concentrados obtidos possuem grande capacidade de hidrolisar os materiais hemicelulolíticos e celulolíticos contidos no xilano de madeira e farelo de trigo respectivamente e grandes possibilidades de hidrolisar resíduos de matérias primas amiláceas, como a mandioca.

Palavras-chaves: atividade enzimática, fungos filamentosos, concentrados, biotecnologia, hidrólise.

ABSTRACT

Extracellular enzymes are macromolecules that have biocatalyst function and are secreted by microorganisms that currently have great industrial applicability, especially in the hydrolysis of industrial waste. According to the literature, filamentous fungi have a high capacity of production of the enzymes present in which hydrolytic activities. Thus, the objective was to select strains of fungi have high potential for production of concentrates of xylanase and β -glucosidase capable of hydrolyzing residues rich in cellulose and hemicellulose. The strains selected were activated and induced to produce the enzymes studied in semisolid medium. After completion of the screening tests for enzymes studied, we evaluated the lines selected by submerged cultivation for a period of 240 hours and the production of concentrates by the strains of greatest potential for production for 16 days in agitation and static mode. In short, the initial evaluation in submerged cultures showed that fungal strains MIBA 0300, MIBA MIBA 0346 and 0769 highlights offered in the production of β -glucosidase and xylanase. Thus, the production of concentrates of β -glucosidase had higher activity at 3,9 U/mL for strain 0300 MIBA the stirring and the inhibition of the activity observed in static culture. In assessing the xylanase enzyme, there was increased activity of 3,000 U/mL and 2,750 U/ mL for MIBA 0769 and 0346 respectively in which were kept under stirring. From the data obtained it can be concluded that concentrates obtained have great ability to hydrolyze hemicellulolytic and cellulolytic materials contained in the wood xylan and wheat bran, respectively, and great possibilities of hydrolyzing amylaceous substances waste materials, such as cassava.

Keywords: enzymatic activity, filamentous fungi, concentrate, biotechnology, hydrolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01.	Mecanismo de ação enzima-substrato.	5
FIGURA 02.	Mecanismo de ação das enzimas xilanolíticas sob a xilana.	11
FIGURA 03.	Mandioca da espécie <i>Manihot esculenta Crantz</i> .	13
FIGURA 04.	Teste de revelação para xilanase realizado com as linhangens selecionadas.	33
FIGURA 05.	Teste de revelação para xilanase realizado das demais linhangens selecionadas.	34

GRÁFICO 01	Curva padrão de xilose (xilanase).	24
GRÁFICO 02	Curva padrão de PNP (β -glicosidase).	25
GRÁFICO 03	Curva padrão de glicose (açúcar redutor).	26
GRÁFICO 04	Curva padrão de BSA (proteína).	27
GRÁFICO 05	Atividade enzimática para xilanase.	35
		36
GRÁFICO 06	Proteína para a enzima xilanase.	
GRÁFICO 07	Atividade enzimática para a enzima β -glicosidase.	37
GRÁFICO 08	Proteína para a enzima β -glicosidase.	37
GRÁFICO 09	Atividade enzimática dos concentrados de xilanase.	38
GRÁFICO 10	Proteína dos concentrados de xilanase.	39
GRÁFICO 11	Açúcar redutor dos concentrados de xilanase.	40
GRÁFICO 12	Atividade enzimática dos concentrados de β -glicosidase.	41
GRÁFICO 13	Proteína dos concentrados de β -glicosidase.	42
GRÁFICO 14	Açúcar redutor dos concentrados de β -glicosidase.	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Meios de Cultura e Reagentes utilizados nas análises.	19
TABELA 02	Código dos microrganismos utilizados nas análises.	21
TABELA 03	Investigação de crescimento do fungo MIBA 0130.	30
TABELA 04	Investigação de crescimento do fungo MIBA 0156.	30
TABELA 05	Investigação de crescimento do fungo MIBA 0221.	31
TABELA 06	Investigação de crescimento do fungo MIBA 0300.	31
TABELA 07	Investigação de crescimento do fungo MIB 0500.	31
TABELA 08	Teste de revelação para a enzima xilanase realizado com as linhagens selecionadas.	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Abs - Absorbância

β - Beta

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$)

EC - Esquema de classificação numérica para as enzimas

M - Molar (Molaridade)

m/v – Massa volume

pH - Potencial hidrogeniônico

MM - Massa molecular

rpm - Rotação por minuto

U - Unidade internacional de atividade enzimática

UV – Ultravioleta

T- Temperatura

t - Tempo

V - Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 ENZIMAS	4
3.2.1 Definição de enzima	4
3.2 ESTRUTURA E PROPRIEDADE DAS ENZIMAS	5
3.2.1 Sítios ativos	5
3.2.2 Especificidade e eficiência catalítica	6
3.2.3 Fonte de carbono	6
3.2.3.1 Hemicelulose	7
3.2.3.1 Celulose	7
3.2.4 pH	8
3.2.5 Temperatura	8
3.2.6 Agitação	9
3.3 ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES	9
3.3.1 Enzima xilanase	10
3.3.2 Enzima β-glicosidase	11
3.4 MANDIOCA	12
3.5 FUNGOS	14
3.5.1 Fungos filamentosos	14
3.5.2 Fungos epifíticos	15
3.6 HIDRÓLISE	16

3.6.1 Hidrólise enzimática.....	16
3.6.2 Hidrólise de resíduos por concentrados enzimáticos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 MATERIAL, EQUIPAMENTOS E ANÁLISES.....	19
4.1.1 Fluxograma do processo.....	19
4.1.2 Obtenção dos microrganismos.....	20
4.1.3 Meios de cultura semi-sólido	21
4.1.4 Investigação do crescimento micelial utilizando eixo ortogonal.....	22
4.1.5 Detecção das atividades xilanase e β - glicosidase	22
4.1.6 Cultivo submerso para a enzima xilanase	22
4.1.7 Cultivo submerso para a enzima β -glicosidase	23
4.1.8 Quantificação de atividade xilanase	23
4.1.9 Quantificação atividade β - glicosidase	24
4.1.10 Quantificação de açúcar redutor	25
4.1.11 Quantificação de proteína	26
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE B-GLICOSIDASICA E XILANÁSICA	27
4.3 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS XILANÁSICOS.....	29
4.4 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS β -GLICOSIDÁSICOS.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	30
5.2 INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO SO MICRORGANISMOS.....	30
5.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	31
5.4 PRODUÇÃO DE XILANASE	34
5.4.1 Atividade enzimática xilanase.....	35
5.4.2 Atividade para proteína em xilanase	35

5.5 PRODUÇÃO DE B-GLICOSIDASE	36
5.5.1 Atividade enzimática β -glicosidase	36
5.5.2 Atividade para proteína em β -glicosidase.....	37
5.6 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICO DE XILANASE	38
5.6.1 Atividade xilanase dos concentrados	38
5.6.2 Proteína dos concentrados xilanásicos	39
5.6.3 Açúcar redutor dos concentrados xilanásicos	39
5.7 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICO DE B-GLICOSIDASE.....	40
5.7.1 Atividade β -glicosidase dos concentrados	40
5.7.2 Proteína dos concentrados β -glicosidásicos	41
5.7.3 Açúcar redutor dos concentrados β -glicosidásicos	42
6 CONCLUSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos, principalmente os fungos filamentosos, podem produzir como metabólitos primários as enzimas, estas que possuem ação catalítica em meio a substratos e desperta cada dia mais interesse tecnológico justamente por ser utilizada como alternativa aos processos químicos tradicionais. As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza, normalmente proteica, com atividade intra ou extracelular e que possuem atividades biocatalizadoras, aquelas que aceleram reações. Os fungos possuem numerosos genes que expressam enzimas hidrolíticas que se apresentam bem em resposta ao pH, temperatura e aos nutrientes disponíveis em condições ótimas quando são fornecidos no meio extracelular. Essas enzimas fúngicas, uma vez secretadas, podem hidrolisar moléculas orgânicas de alto peso molecular, liberando unidades menores que podem ser utilizadas como fonte de energia. Dessa forma, atualmente há uma grande busca por concentrados enzimáticos que possuam alta capacidade de hidrolisar resíduos agroindustriais.

Devido ao mecanismo enzimático que produzem para a hidrólise de substratos naturais, os fungos filamentosos constituem uma fonte importante na busca de novos produtos de interesse industrial e de inovação biotecnológica. Entre estas enzimas, a β -glicosidase possui a função de hidrolisar as isoflavonas que normalmente estão glicosiladas e geralmente desenvolvem as angliconas possuem ação anticancerígena e anticoagulante.

As celulasas, e fazem parte da família das glicosil hidrolases 1 . Esta classe de glicosilase catalisa normalmente a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4, β -1,3 e β -1,6 a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos de cadeias pequenas, alquil e aril β -D-glicosídeos.

As xilanases são enzimas responsáveis, principalmente, pela hidrólises das ligações β -1,4 que estão presentes em um componente da hemicelulose, a xilana vegetal. Dessa forma, as hemiceluloses possuem vários polímeros que podem ser formados por diferentes resíduos de açúcares e que a degradação completa necessita de um grupo de enzimas. A endo β -1,4 xilanase é a principal enzima de despolimerização da xilana (COUGHLAN & HAZLEWOOD,1993). Esta enzima forma um grupo de enzimas que são envolvidas na degradação da xilana, ou seja, é uma endo-enzima que hidrolisa ligações do tipo β -1,4 dentro da cadeia principal da xilana, a hemicelulose, liberando assim os xilo-oligossacarídeos

As enzimas endo-1,4- β -xilanas possuem grande aplicação no setor industrial: na produção de alimentos como sucos, vinhos, cervejas e pães, no branqueamento de polpas de papel, na fabricação de materiais têxteis e até na produção de etanol. Na indústria têxtil, a utilização das enzimas torna-se mais eficaz no acabamento dos tecidos, tornando-os mais lisos e macios, pois as mesmas possuem a capacidade de degradar a superfície dos tecidos que são compostas geralmente por celulose. Na indústria de bebidas, as enzimas são utilizadas no processo de vinificação onde estas facilitam a extração de sucos e a maceração na produção dos néctares por romperem a rede de celulose que ajuda a reter o líquido nas células vegetais. As β -glicosidases, por exemplo, melhoram a extração de pigmentos e aromatizantes presentes nas cascas das uvas utilizadas na produção de vinhos e degradando compostos de sabor desagradável. No branqueamento de polpas de papel, as enzimas possuem a capacidade de reduzir a utilização de agente químico branqueador em até 25%, pois as mesmas conseguem facilitar a entrada de dióxido de cloro e água no emaranhado das fibras de celulose processo no qual causa o branqueamento da polpa inicialmente de coloração marrom. Os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir tais enzimas de forma a degradar material celulolítico e hemicelulolítico, de maneira extracelular, onde esses materiais possam ser despolimerizados e transformados em compostos menores formando novos produtos.

A dificuldade de se trabalhar com fungos filamentosos reside no fato de que os mesmos apresentam as seguintes características:

1. Crescimento micelial com formação de esporos e presente crescimento uniforme;
2. Apresente baixa produção de enzimas, sendo necessária grande conhecimento para fazer a manipulação adequada de modo que se aumente os concentrados das enzimas no meio;
3. Separação ou concentração das enzimas no meio de cultura, pois é necessário se ter equipamentos sofisticados.

Neste trabalho busca-se produzir enzimas extracelulares em concentrados eficientes e capazes de realizar hidrólise de material hemicelulolítico. Portanto, o uso de fungos filamentosos é o alvo para ser utilizado como produtores de enzimas extracelulares.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir concentrados das enzimas xilanase e β -glicosidase com potencial de hidrólise de resíduos celulolíticos da mandioca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar investigação sistemática de fungos com atividades xilanásicas e β -glicosidásicas;
- b) Investigar o crescimento dos fungos em diferentes meios;
- c) Selecionar linhagens de fungos filamentosos que possuam maior potencial de produção de atividades xilanásicas e β -glicosidásicas;
- d) Obter concentrados das enzimas xilanases e β -glicosidases.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

3.1.1 Definição de Enzima

Enzimas são macromoléculas orgânicas que geralmente possuem natureza protéica com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras no meio onde atuam. Algumas enzimas também podem ser chamadas de ribozimas por possuírem em sua constituição RNA. De acordo com Campbell (2000), proteínas são cadeias longas de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (amida) com um grupo amina contendo nitrogênio carregado positivamente em uma extremidade e um grupo carboxila carregado negativamente na outra extremidade, composta de uma série de grupos laterais diferentes que correspondem a cada um dos 20 aminoácidos. Segundo Harger (1982), essas enzimas também são chamadas de biocatalisadores de estrutura proteica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. Segundo Motta (2011), as enzimas convertem uma substância, chamada de substrato, em outra denominada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Consequentemente, o tipo de enzima encontrado em uma célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua. A velocidade da reação catalisada por uma enzima é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. O aceleração da reação pode ser da ordem de milhões de vezes; por exemplo, a enzima orotidina-5'fosfato descarboxilase diminui o tempo da reação por ela catalisada de 78 milhões de anos para 25 milissegundos. Conforme Harger (1982), essas enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e micro-organismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, xilanasas, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases), de origem fúngica ou bacteriana. As enzimas foram divididas em seis grandes classes das quais foram estabelecidas segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB). Dentre essas classes estão as

oxirredutases (que catalisam a oxirredução), as transferases (que transferem grupos químicos entre moléculas), as hidrolases (que utilizam a água como receptor funcional de outras moléculas), liases (que formam ou destroem duplas), isomerases (que transformam sua molécula em seu isômero) e ligases (que formam ligações químicas por condensação).

3.2 ESTRUTURA E PROPRIEDADE DAS ENZIMAS

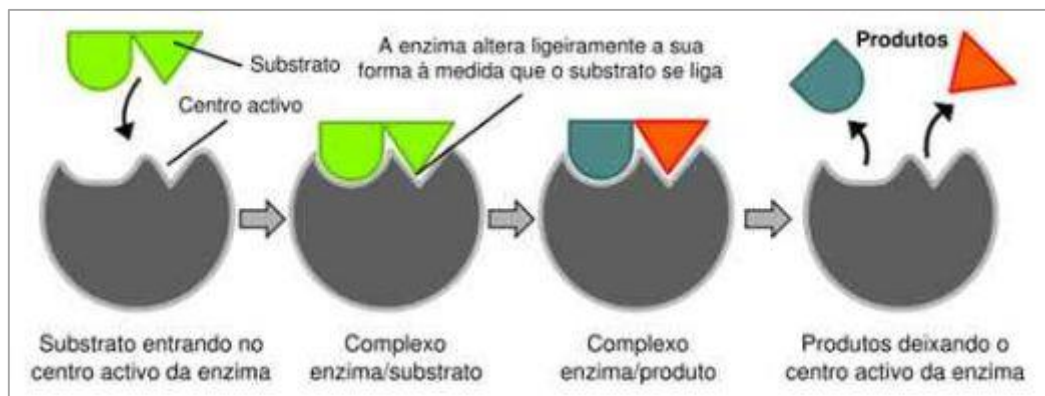
3.2.1 Sítios Ativos

Segundo Motta (2011), as enzimas são os catalisadores mais antigos que se conhece e isso correlaciona-se tanto para substrato quanto para a reação que ocorre no mesmo. Essa catalise é inerente a enzima e reside em uma fenda ou cavidade chamado de centro ativo ou ponto ativo. Este sítio é um arranjo de cadeias laterais de aminoácidos que participam da ligação (ligações não covalentes) com o substrato e da catalise, formando um complexo enzima-substrato. Algumas vezes esses aminoácidos, que formam os sítios ativos ficam em regiões muito distantes na sequencia primária, mas bem próximo aos sítio ativo que formam pelo envelopamento da cadeia peptídica.

A maioria dos mecanismos de ação das enzimas obedecem o mecanismo de chave-fechadura entre enzima e subtrato como é mostrado na figura 01.

Figura 01. Mecanismo de ação enzima-substrato.

Fonte: ergomix.com



3.2.2 Especificidade e eficiência catalítica

Segundo Motta (2011), as enzimas são específicas, isto é, hidrolisam e sintetizam um composto em particular. Em alguns casos, sua ação está limitada a ligações específicas dentro dos compostos com os quais exercem reação. Esta especificidade é devido ao sítio ativo, parte da enzima que a difere da proteína, que é capaz de se ligar a moléculas denominadas substrato formando o complexo enzima-substrato, de modo que cada enzima aja sobre um número muito limitado de compostos. De acordo com a cinética da reação, modelos propostos pelos pesquisadores Michaelis e Menten, a enzima E reage com o substrato S formando um composto intermediário conhecido como complexo ativado instável enzima-substrato ES, o qual se decompõe em enzima E e o produto de reação P.



A quantidade de enzima exigida no processo é pequena e não influi na variação energética da reação. A cinética da reação é influenciada pela concentração do substrato e da enzima. A velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração de enzima para uma mesma concentração de substrato. Se a concentração do substrato é baixa, temos uma subutilização do sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, pouco produto é formado. Com o aumento da concentração do substrato, a reação tende a atingir sua velocidade máxima, isto é, produzir a máxima quantidade de produto para uma quantidade de enzima pré-determinada e temos assim, uma reação saturada, logo a partir deste momento, a quantidade de substrato adicionado não altera mais a velocidade da reação.

3.2.3 Fonte de Carbono

A fonte de carbono fornecida ao microrganismo é fator de suma importância para que a produção de determinada enzima tenha grande potencial, pois existem vários estudos mostrando que a atividade enzimática aumentou quando foram utilizado bagaço de cana de açúcar e farelo de soja como indutores das xilanases e β -glicosidases respectivamente. Já a glicose e outros açúcares como xilose e frutose podem reprimir a sua produção de α -amilases, por exemplo. Dessa forma, tem-se que para cada enzima existe uma fonte de carbono (substrato) ideal ou mais adequado

para que se promovam reações enzimáticas e de hidrólise com alto potencial de produção.

3.2.3.1 Hemicelulose

As hemiceluloses são grupos de polímeros heterogêneos pentoses, constituídas principalmente por xilose e arabinose, por hexoses que são principalmente glicose, manose e galactose e ácidos de açúcar. Diferentemente das celuloses, as hemiceluloses não são quimicamente homogêneas. Geralmente as hemiceluloses de madeira dura possuem xilanas e aquelas hemiceluloses de coníferas possuem glicomananas na sua constituição. Estes constituintes com composições diferenciadas pertencentes as hemiceluloses geralmente estão presentes na parede de alguns tipos de vegetais. A hemicelulose possui uma estrutura mais parecida com a estrutura da lignina do que da celulose, onde sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que muito interagem com a celulose causando flexibilidade e estabilidade ao agregado. É observado que as hemiceluloses estão presentes em cerca de 25% a 27% no bagaço de cana e que principal açúcar encontrado nas hemiceluloses é a xilose. Além disso, observa-se também que a hemicelulose possui um caráter mais suscetível à hidrólise ácida por possuir maior acessibilidade aos ácidos mineirais que promovem as funções catalisadoras.

3.2.3.2 Celulose

A celulose é o polímero de carboidrato mais abundante existente na natureza e é muito utilizada como fonte de alimento e energia (WYMAN et al., 2003). Na biosfera do planeta Terra cerca de 40% da fonte de carbono encontrada está contida na celulose. Segundo Lynd et al, 2002 a celulase está presente principalmente nas plantas e também pode ser formada por alguns animais, principalmente microrganismos. Apesar das grandes diferenças da estrutura anatômica da parede celular das plantas há uma grande concentração de celulose que tem função unificadora. É notado que na maioria dos casos a celulose pode estar envolvida com uma matrix de outros biopolímeros como a hemicelulose e a lignina.

A estrutura química da celulose é um composto linear formado por unidades de anidroglicopiranosose ligadas entre si por ligações glicosídicas. (WYMAN et al., 2003).

Segundo Wyman et al. (2003), a unidade básica de repetição da celulose é a celobiose, onde esta celobiose é constituída por duas unidades adjacentes que formam uma ligação glicosídica para a eliminação de uma molécula de água que envolve os grupos hidroxílicos de carbonos 1 e 4.

3.2.4 pH

A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo, que para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0, e no qual a enzima apresenta sua atividade máxima. Valores baixos ou altos de pH podem causar desnaturação protéica considerável e consequente inativação enzimática. Por isso, é muito útil saber em que faixa de pH a enzima é mais estável, já que o pH de máxima estabilidade nem sempre coincide com o de máxima atividade. As enzimas podem ser inativadas, isto é, desnaturadas por diversos fatores, como calor, ponto isoelétrico, sequestro de sais de cálcio e agitação mecânica. Para as β -glicosidasas o pH ótimo fica entre 4,5 e 5,5 (Daroit, 2007) e de acordo com Magalhães (2005), as xilanases possuem pH ótimo fica entre 2,0 e 8,0.

3.2.5 Temperatura

A maioria das enzimas apresenta melhor desempenho em temperaturas que variam de 30°C a 70°C e com valores de pH próximos à neutralidade ($\text{pH} \cong 7$). Em geral, pode-se dizer que nenhuma enzima resiste por muito tempo à temperaturas superiores a 100°C. A velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura de modo semelhante ao das reações químicas, isto é, a velocidade da reação duplica com o aumento de 10°C na temperatura da reação. Nas reações enzimáticas, porém, a velocidade aumenta com a temperatura, até atingir uma velocidade máxima, a partir da qual começa a decrescer. Sob condições específicas, a temperatura ótima para cada reação pode ser determinada (HECK et al., 2006).

O efeito da temperatura é muito complexo e pode ser devido a várias causas. Inicialmente, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada, o que amplia a formação do complexo enzimático; no entanto, com o aumento contínuo da temperatura, pode ocorrer uma inativação gradativa da enzima, até a inativação total, causada pela desnaturação protéica pelo calor. Em geral, as enzimas reagem

muito lentamente nas temperaturas de subcongelamento e sua atividade aumenta com o aumento da temperatura até atingir uma atividade ótima em temperaturas ao redor de 45°C, além das quais começa a sua inativação. (LEHNINGER, 2006).

Para as enzimas β -glicosidasases por exemplo, a faixa de temperatura ótima fica entre 30 a 50°C e para as xilanases a faixa de temperatura ótima é de 45 a 70°C (HECK et al., 2006).

3.2.6 Agitação

A intensidade de agitação influencia a mistura de nutrientes e a taxa de transferência de oxigênio em muitas fermentações fúngicas, influência também a morfologia micelial e a formação de produto. Estudos demonstraram que altas velocidades de agitação prejudicam a morfologia do micélio do fungo, e assim, podem reduzir a produção de enzimas (Gupta et al., 2003).

3.3 ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES

As enzimas são denominadas de acordo com as classes, como citado anteriormente, e também segundo o substrato sobre o qual atuam. Dessa forma, as enzimas hidrolíticas que são aquelas que promovem a hidrólise de ligações covalentes, ou seja, são aquelas enzimas que utilizam a água para fazer hidrólise de macromoléculas em moléculas menores. As xilanases e β -glicosidasases são enzimas hidrolíticas e extracelulares (são excretadas para fora da célula) de microrganismos podendo ser bactérias ou fungos e que comumente tem possuem grande utilização em processos de hidrólise. Essas enzimas extracelulares e de ação hidrolítica que são produzidos por diferentes microrganismos causam diferentes formas de degradação na madeira, por exemplo e essa degradação ocorre exclusivamente de maneira extracelular onde os componentes dos materiais contidos na parede celular de plantas devem ser despolimerizados a compostos menores e dessa forma promover o transporte e conseqüentemente auxiliar no metabolismo intracelular dos fungos envolvidos (MAGALHÃES, 2005).

3.3.1 Enzima xilanase

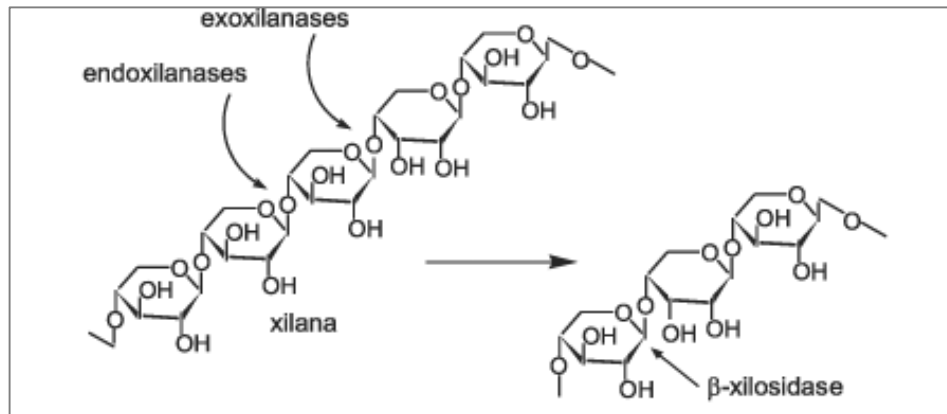
Segundo Magalhães (2005), as xilanases fazem parte do grupo das hemicelulases e são altamente dependentes de enzimas que promovam a degradação das cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanas é capaz de render uma notável variação de produtos como as xiloses, xilobioses, xilotrioses e ácidos urônicos que se diferem pelas quantidades liberadas. A principal enzima de despolimerização da xilana é a endo-1-4- β -xilanase. O mecanismo de ação dessa enzima ocorre na cadeia principal da xilana na qual produz certa quantidade de oligossacarídeos menores substituídos e não-substituídos que serão clivados pelas exo-1-4- β -xilanase. Os dímeros de xilose produzidos geralmente são clivados pela β -xilosidase (que é de suma importância para a hidrólise geral da xilana) e liberando D-xilose como único produto da hidrólise.

É necessário ressaltar que esses substituintes são geralmente liberados ao mesmo tempo por esterases e glicosídes correspondentes. A maioria das endo xilanases são ditas de amplo domínio catalítico, mas que também possuem domínio de ligação à xilana, à celulose e à carboidrato. A produção do sistema xilanolítico é composta por diversas enzimas nas quais possuem diferentes especificidades e que possuem sinergismo no processo de hidrólise da xilana e por isso nem todas as enzimas xilanolíticas são equivalentes e igualmente acessíveis e isso pode mudar o curso do processo devido à algumas retiradas de substituintes da cadeia (HECK et al., 2006).

No processo de produção de enzimas fúngicas observa-se as xilanases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas próximas as ramificações da cadeia principal e xilanases que hidrolisam ligações mais distantes da mesma sendo que muitas dessas endoxilanases que conseguem clivar ligações mais próximas a cadeia principal da xilana não são específicas e hidrolisam além da mesma celulose, carboximetilcelulose celo-oligômeros e laminarina. O mecanismo de ação da endo e exo xilanase pode ser observado na figura 02 onde observa-se a hidrólise da cadeia da xilana pelas β -1-4 endoxilanases nas partes internas da cadeia liberando xiloligossacarídeos e exoxilanases liberando xilose a partir das partes não redutoras da cadeia. (HECK et al., 2006).

Figura 02. Mecanismo de ação das enzimas xilanolíticas sob a xilana.

Fonte: Revista Química Nova, 2007.



3.3.2 Enzima β-glicosidase

As enzimas que hidrolisam a celulose (celulases) estão divididas em três principais grupos: endoglicanases (EG β-1,4-D-glicanohidrolases, EC 3.2.1.4), exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH, β-1,4-glicanocelobiohidrolase, EC 3.2.1.91) e β-glicosidases ou celobiasas (β-D-glicosideo glicohidrolases, EC 3.2.1.2.21). As endoglicanases catalisam clivagens aleatórias em ligações β-1,4 ao longo da cadeia de celulose, preferencialmente nas regiões menos cristalinas das microfibrilas, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas extremidades. As exoglicanases removem resíduos de celobiose das extremidades reductoras ou não reductoras geradas pela ação das endoglicanases e possuem uma alta especificidade para a celulose insolúvel, como a celulose microcristalina (HECK et al., 2006).

As β-glicosidases clivam resíduos de celodextrinas ou celobiose gerados pela ação das endoglicanases e exoglicanases, liberando monômeros de glicose. As celulases distinguem-se de outras hidrolases glicosídicas por sua habilidade de hidrolisar ligações β-1,4 entre resíduos glicosídicos (LYND et al., 2002). Essas três classes de enzimas celulolíticas formam um complexo sistema celulolítico agindo de forma sinérgica, as endoglicanases gerando extremidades para a ação das celobiohidrolases que por sua vez geram resíduos de celobiose, substrato para as β-glicosidases (ZHOU et al., 2000). Além do sinergismo, ocorre ainda uma retroinibição como forma de regulação tanto da produção quanto da atividade dessas enzimas,

onde o acúmulo do produto da ação das celulases sobre a celulose gera a inibição dessas enzimas. As endoglicanases e celobiohidrolases são inibidas por celobiose, tornando o papel das β -glicosidases muito importante no processo. As β -glicosidases ao hidrolisarem a celobiose reduzem seu efeito inibidor sobre as celulases (Leite *et al.*, 2008).

3.4 MANDIOCA

Segundo (Graner *et al.*, 1973 apud Viega, 2010) a mandioca é uma planta da família Euphorbiaceae, pertencente ao gênero *Manihot*, é um arbusto perene com resistência a seca e adaptada a diversas condições de clima e solo. A espécie de maior importância econômica é a *Manihot esculenta* (sinonímia *Manihot utilíssima* Pohl), conhecida mundialmente pelos nomes de cassava, manioc, tapioca, yuca, mandioca, macaxeira e aipim tendo seu provável centro de origem no Brasil, de onde se espalhou para toda a América latina. Segundo Dallaquae Coral (2002), no mundo há 7.500 espécies aproximadamente distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e que apresentam arbustos de 2 a 3 metros de raiz tuberosa com alto valor alimentício.

O Brasil apresenta-se como o segundo maior produtor mundial desta cultura com 10% de toda a produção mundial, atrás somente da Nigéria, além destes, Indonésia e Tailândia apresentam-se como os quatro maiores produtores mundiais (FAO, 2012). A mandioca além de grande importância para o setor alimentício, possui alta importância no setor agroindustrial por ser utilizada na produção de etanol (COLLARES, 2011).

Os maiores produtores de mandioca do Brasil são os estados do Pará, Paraná e Bahia que respondem por aproximadamente 50% da produção nacional. As espécies de mandioca são divididas em duas grandes classes: a amarga ou brava (tóxica), de uso apropriado para industrialização e a doce ou mansa (atóxica), também chamada de aipim ou macaxeira, de uso mais frequente na culinária (WESTBY, 2002). A figura 03 mostra a mandioca da espécie *Manihot esculenta* Crantz que é a espécie mais comumente encontrada no Brasil.

Figura 03. Mandioca da espécie *Manihot esculenta* Crantz.

Fonte: orienteocidente.wordexpress.com



Segundo Marcon et al. (2007), o amido mandioca possui alta viscosidade, mas é menos resistente à degradação enzimática e apresenta temperatura de gelatinização baixa quando comparado a outros amidos. Esse amido constitui um pouco mais que 30% da mandioca e já as fibras da mesma estão presentes em aproximadamente 1,1%. As fibras de mandioca são constituintes normais da parede celular dos vegetais e são polissacarídeos não digeridos pelo organismo e que estão presentes nas celulosas, hemicelulosas, ligninas e outras e dependendo da constituição podem ser solúveis e insolúveis. O amido é constituído por seis átomos de carbono e formando anéis de forma piranosídicos quais estão a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero essencialmente linear da glicose, na qual as unidades piranosídicas constituem a molécula linear contendo ligações $\alpha(1-4)$ e um pequeno número de ramificações nas ligações $\alpha(1-6)$. A amilopectina bem como a amilose, é uma macromolécula longa e ramificada, formada por moléculas de D-glicose, unida nas ligações $\alpha(1-4)$, sendo que mais ou menos a cada 20-25 ligações, ocorre à ligação $\alpha(1-6)$ esta que por sua vez é responsável pelas ramificações da molécula de amido.

De acordo com Collares (2011), a grande preocupação ambiental está justamente nos resíduos gerados pela utilização da mandioca. Esses resíduos (fibras) são materiais vegetais e orgânicos, nos quais são descartados livremente. Dessa forma, há amplamente a busca de novas fontes alternativas e ambientalmente corretas de degradação desse resíduo.

3.5 FUNGOS

Segundo Cardoso (2011), os organismos conhecidos como fungos possuem peculiaridades o que confere ser colocado em um reino conhecido como Fungi. Os fungos são seres eucariontes, heretótrofos, cosmopolitas, de formas microscópicas, mas que também apresentam-se de forma macroscópica e que também tem a função de auxiliar no desenvolvimento de outras espécies. Esses microscópicos seres coexistem conosco vivendo em diferentes habitats: água, ar, plantas, solo, animais e até mesmo no próprio homem. Estes organismos vivem em relações onde podem proporcionar tanto benefícios quanto malefícios ao meio onde existe, bem como a outros organismos na natureza. Os fungos desempenham papel de grande importância no equilíbrio do ambiente. São os fungos importantes aliados do processo de decomposição, em especial a decomposição de vegetais (GHIZELINI et al., 2006).

A atividade exercida pelas enzimas extracelulares fungícas, como as celulases e pectinases está extremamente ligada á degradação das estruturas rígidas de plantas, que não são digeridas por outros animais. Os fungos são explorados de diversas formas, principalmente nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosmética e têxtil, que utilizam o seu potencial de produção de ácidos cítricos, fumárico e gálico para fabricação de seus produtos, bem como, a utilização das enzimas secretadas pelos mesmo, como as xilanases que é utilizada na fabricação de rações e corantes para alimentos além de ter função no bi branqueamento do papel e β -glicosidases que tem função anticancerígenas e podem ser utilizadas nas síntese de produtos farmacêuticos.

3.5.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são formados e constituídos a partir de estruturas de frutificação que germinam dando origem a tubos germinativos que crescem, formando as hifas ou filamentos. (TORTORA et al., 2002). As hifas podem ser septadas ou não, sendo essa última denominada hifa cenocítica. O septo serve para promover a individualização das células que compõem as hifas. Desse modo, no segmento intermediário de dois septos têm-se uma célula e, conseqüentemente, um núcleo.

Apesar de o septo estar presente a individualização não ocorre completamente, pois os septos apresentam poros interligando o citoplasma de uma célula com outra.

Em se tratando de hifas 3 cenocíticas, essas são visualizadas como uma estrutura contínua composta de vários núcleos. O crescimento da hifa ocorre por alongamento de suas extremidades. Em condições ideais as hifas proliferam formando uma massa fibrosa denominada micélio (TORTORA et al., 2002). A organização em hifas apresenta funções importantes para o crescimento da colônia. A hifa denominada vegetativa desempenha o papel de obtenção de nutrientes, enquanto que os esporos têm função reprodutiva. O estudo dos esporos assexuais e sexuais produzidos pelos fungos filamentosos é necessário para a sua correta identificação. Devido à complexidade da organização estrutural dos fungos filamentosos eles se desenvolvem mais lentamente em relação às leveduras (TORTORA et al., 2002).

3.5.2 Fungos Epifíticos

Segundo Sartori (2003), os fungos epifíticos têm sido pouco estudados, quando comparado aos fungos endofíticos, saprofíticos e patogênicos. A maioria dos estudos com fungos epifíticos que também são chamados de fungos do filoplano, preocupa-se com aqueles microrganismos associados as plantas de importância econômica no qual a superfície das plantas são colonizadas por uma ampla variedade de gêneros de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os fungos epifíticos são os que crescem na superfície das folhas ou de cascas e estão divididos em dois grupos: os residentes e os ocasionais. Os residentes são os que multiplicam-se na superfície das folhas saudáveis sem afetar aparentemente seu hospedeiro. Já os ocasionais são considerados transitórios pois habitam a superfície do hospedeiro mas não se multiplicam (ANDREWS & HARRYS 2000; LEE & HYDE, 2002).

Um dos aspectos mais importantes do filoplano é a disponibilidade de nutrientes, que interfere diretamente no hábitat da comunidade de microrganismos. Neste ambiente são encontrados nutrientes essenciais ao desenvolvimento de muitos microrganismos, como exsudatos foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções liberadas por afídios e outras substâncias. Os nutrientes inorgânicos encontrados nos lixiviados de órgãos das plantas incluem todos os minerais essenciais e alguns outros elementos comumente encontrados nas plantas, incluindo macro e microelementos. Os lixiviados também incluem grande soma de substâncias orgânicas como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis, vitaminas e

reguladores de crescimento (BETTIOL, 1991). A disponibilidade de açúcares permite o desenvolvimento de leveduras, iniciando assim o estágio da sucessão microbiológica (BETTIOL, 1997). Também segundo Bettiol (1991), as substâncias liberadas pelos esporos de fungos e os metabólitos microbianos extracelulares também são considerados fontes de nutrientes no filoplano. Dessa forma, mudanças neste ambiente e na disponibilidade de nutrientes conduzem a alterações no equilíbrio existente.

3.6 HIDRÓLISE

De acordo com Oliveira (2011), é uma reação química de quebra de ligação química de uma molécula com a adição de uma molécula água ao meio reacional. Nessa reação ocorre a quebra da molécula de água em íons de hidrogênio (H^+) e hidroxila (OH^-) que se ligam às duas moléculas resultantes da quebra nas quais podem possuir caráter positivo e negativo. A dissolução de sais em água também pode ser chamada de hidrólise, pois onde esta última se ioniza em H^+ e OH^- afim de se ligar aos ânions e cátions correspondentes do sal.

Segundo o mesmo autor, a água, por si mesma, sem a presença de enzimas pode realizar uma hidrólise completa, quebrando moléculas de cadeia longa em moléculas menores, e isto está diretamente ligado à medida de pH do meio, como por exemplo o processo de saponificação, que é o resultado da quebra de triglicerídeos (gorduras e óleos) em sais de ácidos graxos e glicerina.

3.6.1 Hidrólise enzimática

Segundo Oliveira (2011), a hidrólise enzimática o processo que mais acontece na natureza, pois ocorre desde em uma cultura de bactérias quanto no trato digestório de animais como os seres humanos. Geralmente ocorre em meio extra celular, a partir da excreção de enzimas por células que podem ser bacterianas ou fungicas afim de se quebrar as moléculas grandes em moléculas menores e que podem passar pela membrana celular. Alguns processos de hidrólise enzimática seria a quebra de proteínas em cadeias polipeptídicas aos aminoácidos, a a quebra de

polissacarídeos como o amido e celulose em dissacarídeos e monosacarídeos, como o açúcar e a quebra da hemicelulose em oligossacarídeos por enzimas xilanases.

Conforme Escheufelle et al. (2012), o processo de hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas ou hemicelulolíticas respectivamente e que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção. Diversas pesquisas têm sido realizadas na busca de enzimas capazes de hidrolisar estes componentes vegetais de forma mais efetiva sendo pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos enzimáticos mais eficientes ou pelo melhoramento dos processos biotecnológicos e inovadores.

3.6.2 Hidrólise de resíduos por concentrados enzimáticos

Conforme Carvalho (2011), a hidrólise de resíduos por concentrados enzimáticos são altamente específicas quando utilizado substratos susceptíveis para as enzimas, ou seja, onde as condições estejam ótimas para a reação e que a mesma seja de alto potencial e reduza os níveis de produção de subprodutos indesejáveis no processo. Dessa forma, para que a hidrólise dos resíduos seja eficaz é necessário aperfeiçoar as condições para a reação como: pré-tratamento do resíduo utilizado, termoestabilidade das enzimas, concentração do substrato, tempo de duração de hidrólise, pH do meio além de outros fatores importantes e que podem ser interferentes na execução do processo.

Ainda de acordo com Carvalho (2011), na hidrólise de resíduos ocorre a transferência de massa das moléculas de enzimas através da camada estagnada de filme líquido e que as interferências à essa transferência de massa pode influenciar na velocidade de reação global. Na hidrólise de resíduos em reator de batelada agitado a taxa de reação passa por três fases: taxa de transferência de massa da enzima, taxa de adsorção da enzima na superfície do substrato e a taxa de catálise do concentrado enzimático utilizado. A adsorção da enzima e a formação do complexo do enzima-substrato.

Conforme Collares (2011), a hidrólise de matérias primas amiláceas ocorre transformando o amido constituinte da mandioca em glicose, onde a hidrólise pode ser feita em processo contínuo ou descontínuo e a hidrólise pode ser química ou enzimática, aquela que utiliza concentrados enzimáticos na reação.

Segundo o mesmo autor, na hidrólise enzimática dessa matéria prima e de outras podem ser utilizadas enzimas de origem vegetal ou microbiana. A hidrólise enzimática tem maior relevância por ser um processo ocorrente em condições mais brandas de temperatura. Geralmente a hidrólise de mandioca e materiais amiláceos inerentes a mesma estão ligados á geração de energia, produção de etanol. Desse modo, a utilização do processo de hidrólise de resíduos de mandioca, dando ênfase as fibras amilolíticas, tem-se destacado como forma alternativa e ambientalmente correta por mostrar um processo biotecnológico inovador e promissor, mas que atualmente ainda tem sido pouco estudado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (LabISisBio) situado no Prédio de Química Pesquisa na Universidade Federal de Pará – UFPA, Campus Guamá/PA. A tabela 01 mostra a relação dos meios de cultura e reagentes utilizados. Esses meios de cultura foram preparados de acordo com os procedimentos do LabISisBio.

Tabela 01 – Meios de cultura e reagentes utilizados durante as análises.

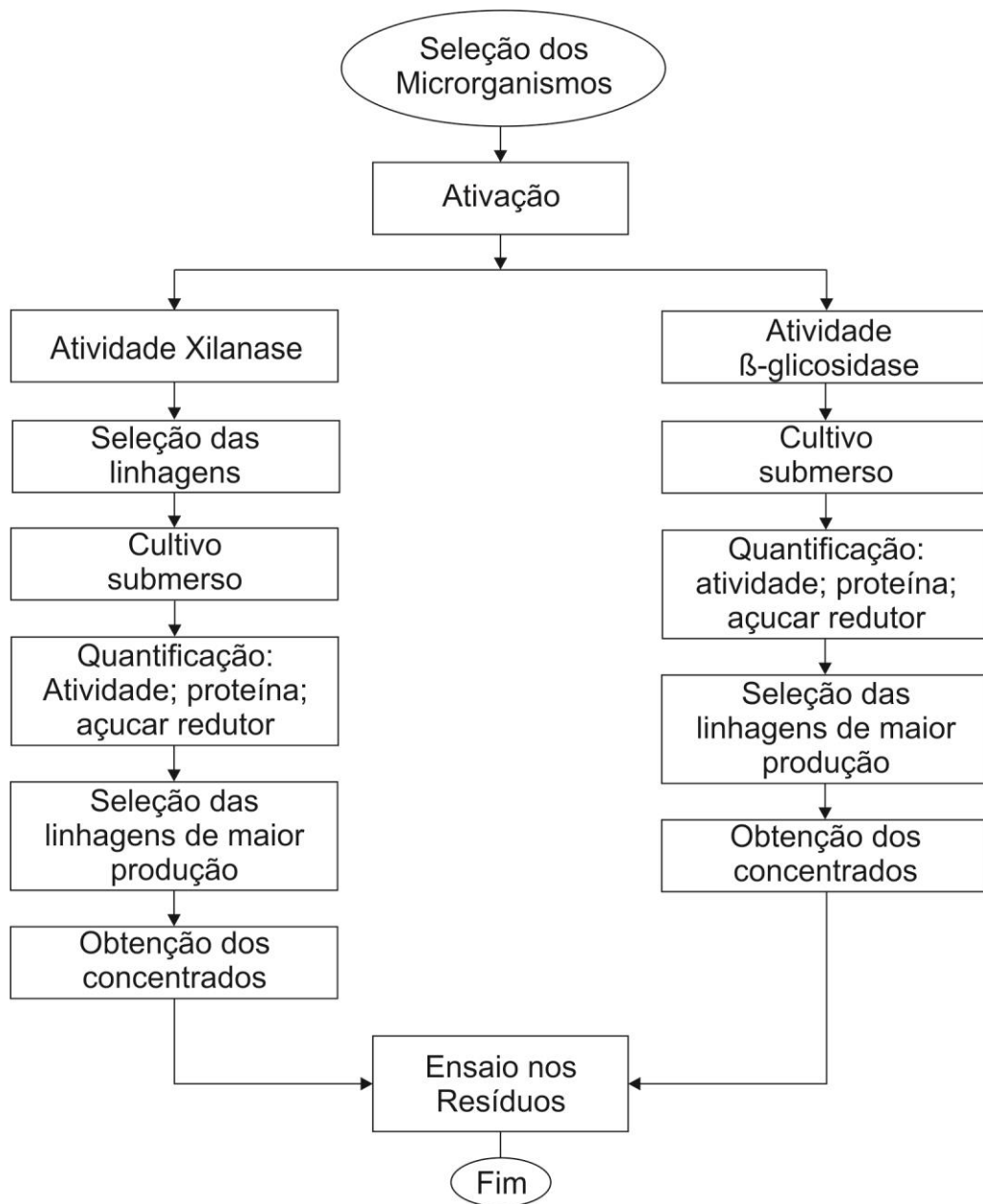
Fonte: Dados da pesquisa.

Xilano de madeira	Saboraud
Farelo de trigo	Extrato de malte
Peptona	Vermelho Congo
Extrato de levedura	Ácido 3,5 – dinitrossalicílico
Agar	Azul de comassie
BDA	Tampão citrato-fosfato
Czapek	Tampão acetato
KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
K_2HPO_4	NH_4NO_3
Glicose	CaCl_2
Na_2CO_3	NaCl

4.1.1 Fluxograma do processo

No fluxograma 01 encontra-se um esquema do processo que está dividido em etapas que serão executadas de forma sequencial até a obtenção dos concentrados enzimáticos das linhagens fungícas que apresentaram maior potencial de produção.

Fluxograma 01. Fluxograma do processo executado.



4.1.2 Obtenção dos microrganismos

Foram selecionados 18 fungos da coleção MIBA (Microrganismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia) que estão depositados na Micoteca do Laboratório de Microbiologia do LabISisBio. Essas colônias de fungos selecionadas foram isoladas das raízes da mandioca (*Manihot esculenta*) e das sementes de andiroba (*Carapa guianensis*) e estavam preserve em água, glicerol 10% e óleo mineral. As linhagens utilizadas nas análises apresentam-se na tabela 02.

Tabela 02. Código dos microrganismos utilizados nas análises

Fonte: Dados da pesquisa.

Ítem	Código	Gênero
1	MIBA 0021	sem identificação
2	MIBA 0069	sem identificação
3	MIBA 0130	sem identificação
4	MIBA 0156	sem identificação
5	MIBA 0201	<i>Penicillium</i>
6	MIBA 0221	sem identificação
7	MIBA 0288	sem identificação
8	MIBA 0300	sem identificação
9	MIBA 0345	sem identificação
10	MIBA 0346	sem identificação
11	MIBA 0347	sem identificação
12	MIBA 0348	<i>Penicillium</i>
13	MIBA 0350	sem identificação
14	MIBA 0351	<i>Fusarium</i>
15	MIBA 0500	sem identificação
16	MIBA 0507	<i>Fusarium</i>
17	MIBA 0769	sem identificação
18	MIBA 0770	<i>Aspergillus</i>

4.1.3 Meios de cultura semi-sólido

Para a ativação dos fungos, foi preparado o meio BDA (39g para 1000mL) e esterilizados em autoclave a 121^oC por 15 minutos. Na capela de fluxo laminar, verteu-se 20mL do meio em placas de Petri esterilizadas e aguardou-se a solidificação. Com o auxílio de um bisturi estéril foi inoculado um micélio de 5mm de diâmetro do fungo que estava preserve em água ou óleo mineral ou glicerol. Os fungos foram incubados em estufa a 30°C por 10 dias onde aguardou-se os próximos repiques.

Para a investigação do crescimento dos fungos, foram utilizados os meios BDA (39 g para 1000mL), GPY (1%(m/v) glicose, 0,25%(m/v) peptona e extrato de levedura

e 2%(m/v) agar), Sabouraud (65g para 1000mL), EM (1%(m/v) extrato de malte, 1%(m/v) glicose, 2%(m/v) agar) e Czapek (35g para 1000mL). Os meios de cultura semi-sólidos foram autoclavados e inoculados seguindo o mesmo modo de repique descrito acima. Os fungos também foram incubados em estufa a 30°C por 10 dias.

Para a indução das enzimas xilanase e β -glicosidase, foram utilizados os meios de cultura XPY (1% (m/v) de xilano de madeira, 0,25% (m/v) peptona e extrato de levedura e 2% (m/v) de agar) e FPY (1% (m/v) de farelo de trigo, 0,25% (m/v) peptona e extrato de levedura e 2% (m/v) de agar) respectivamente. Esses meios de cultura semi-sólidos foram autoclavados e inoculados seguindo o mesmo modo descrito acima. Foram incubados por 72 horas em estufa a 30°C para o teste de revelação.

4.1.4. Investigação do crescimento micelial utilizando eixo ortogonal.

A partir das linhagens inoculadas em meio BDA realizou-se a medida do crescimento das colônias de fungose. Traçaram-se dois eixos perpendiculares em cada placa, dividindo as colônias em quadrantes aproximadamente iguais no qual possibilitou-se duas medidas de diâmetro na vertical e horizontal por placa. Esse diâmetro foi medido com o auxílio de uma régua de 30cm a cada 24 horas durante dez dias consecutivos.

4.1.5 Detecção das atividades xilanase e β -glicosidase

Seguindo a metodologia de Theather e Wood (1982), os microrganismos foram avaliados em meio XPY onde as linhagens encontravam-se incubadas a 30°C por 72 horas. Para a detecção da presença da enzima xilanase foi vertido sobre as placas inoculadas uma solução de vermelho congo (0,1% m/v) o qual reagiu por 2 horas. O excesso foi drenado e sobre as placas verteu-se uma solução de NaCl 1M o qual reagiu por 15 minutos. O excesso da solução foi drenado e a formação de um halo translúcido ao redor da colônia é indicativo positivo da atividade xilanásica. As placas foram fotografadas e o halo formado foi medido com o auxílio de uma régua de 30cm.

4.1.6 Cultivo submerso para a enzima xilanase

Na quantificação da atividade xilanase em cultivo submerso foram preparados 150mL de meio de cultura em erlenmayer de 250mL no qual utiliza-se 10g/L de xilano

e os sais inorgânicos: 2g/L KH_2PO_4 , 2g/L K_2HPO_4 , 0,6g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/L NH_4NO_3 , 0,5g/L CaCl_2 . Antes de autoclavar, o pH do meio foi ajustado para 5,0. Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave á 121°C por 15 minutos. Na capela de fluxo laminar, esperou-se esfriar o meio de cultura e com o auxílio de um bisturi estéril foram inoculados 5 micélios de 5mm de diâmetro do fungo que estava previamente inoculado em cultivo semi-sólido de adaptação XPY.

Os cultivos submersos foram realizados em 7 linhagens para enzima xilanase. Estes foram colocados em um shaker orbital a 30°C e 120rpm durante um período de 240 horas (aproximadamente 10 dias). A cada 24 horas, foi retirada uma alíquota de 3mL do caldo enzimático para a análises enzimática, açúcar redutor e proteína.

4.1.6 Cultivo submerso para a enzima β -glicosidase

Na quantificação da atividade β -glicosidase em cultivo submerso foram preparados 150mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250mL no qual utiliza-se 10g/L de farelo de trigo e os sais inorgânicos: 2g/L KH_2PO_4 , 2g/L K_2HPO_4 , 0,6g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/L NH_4NO_3 , 0,5g/L CaCl_2 . Antes de autoclavar, o pH do meio foi ajustado para 5,0. Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave á 121°C por 15 minutos. Na capela de fluxo laminar, esperou-se esfriar o meio de cultura e com o auxílio de um bisturi estéril foram inoculados 5 micélios de 5mm de diâmetro do fungo que estava previamente inoculado em cultivo semi-sólido de adaptação FPY.

Os cultivos submersos foram realizados em 10 linhagens para enzima β -glicosidase. Estes foram colocados em um shaker orbital a 30°C e 120rpm durante um período de 240 horas (aproximadamente 10 dias). A cada 24 horas, foi retirada uma alíquota de 2mL do caldo enzimático para a análises enzimática, açúcar redutor e proteína.

4.1.8 Quantificação de atividade xilanase

Em um tubo de 10mL foram adicionados 400 μ L de extrato enzimático, 400 μ L de solução substrato de 0,5% de xilana em 0,05M de tampão acetato e pH 5,0. O sistema foi agitado periodicamente para manter-se a xilana e incubado a 50° C por 30 minutos. Foram preparados dois controles: um branco do reagente e um branco da amostra. No controle do reagente foram adicionados 400 μ L da solução tampão e

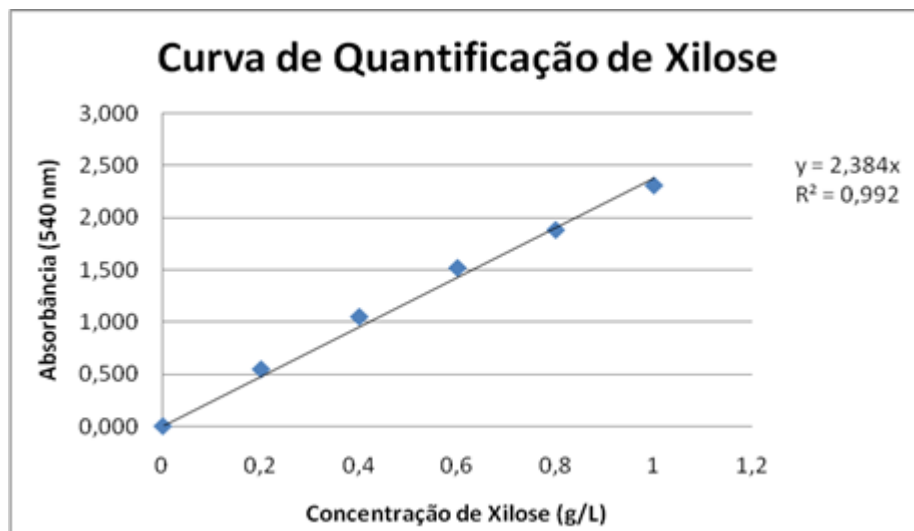
400µL de solução substrato e no controle da amostra (branco da amostra) foi adicionado 400µL de extrato enzimático e 400µL de uma solução tampão nos quais foram mantidos nas mesmas condições.

Após a incubação, a reação foi interrompida quando se adicionou 800µL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) e submeteu-se a fervura por 5 minutos e em seguida os tubos foram resfriados. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vís em 540nm.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilose. Quando os valores das absorbâncias das amostras lidas são correlacionados com a equação da reta extraída de uma curva de quantificação padrão, mostrada no gráfico 01 no qual foi construída a partir de uma solução de xilose (1g/L). Dessa forma é possível calcular a atividade enzimática produzida pelo fungo selecionado.

Gráfico 01. Curva Padrão utilizando xilose para quantificação da enzima xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.



4.1.9 Quantificação de atividade β-glicosidase

Em um tubo de 10mL adicionou-se 800µL da solução de 1mM de PNPG diluído em tampão citrato fosfato 0,1M pH igual a 5 e foi incubado em uma estufa a 30°C por 5 minutos. Após os 5 minutos, foi adicionou-se 200µL da amostra (caldo enzimático) e incubado novamente a 30°C por 30 minutos. Foram preparados dois controles: um

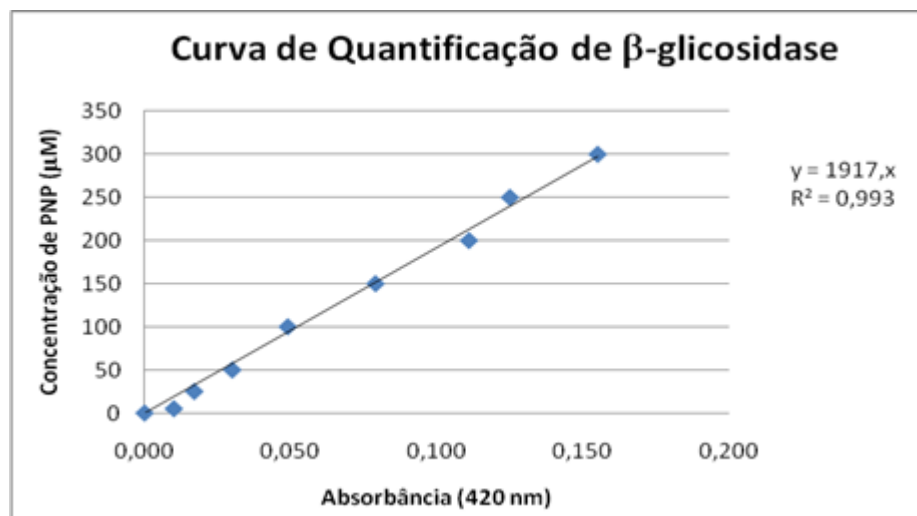
branco do reagente e um branco da amostra. No controle do reagente foram adicionados 200µL da solução tampão e 800µL de solução substrato e no controle da amostra (branco da amostra) foi adicionado 200µL de extrato enzimático e 800µL de uma solução tampão nos quais foram mantidos nas mesmas condições.

Após a incubação a reação foi interrompida quando adicionou-se 1000µL de carbonato de sódio 0,25M e pH 9,0. O resultado amarelo foi imediatamente medido a 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

A quantidade hidrolisada de PNPG foi calculada com referência na calibração da curva de quantificação que será mostrada no gráfico 02, na qual foi feita simultaneamente e da mesma maneira, utilizando-se 5 a 300µmol de PNP.

Gráfico 02. Curva Padrão utilizando PNP para quantificação da enzima β-glicosidase

Fonte: Dados da pesquisa.



4.1.10 Quantificação de açúcar redutor

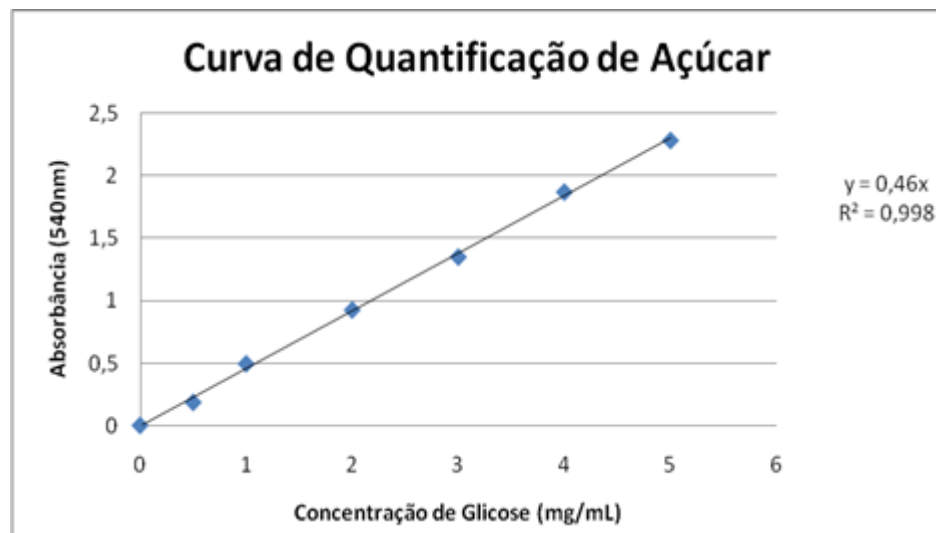
Na análise de açúcar redutor foi utilizada a metodologia modificada de Miller, 1959 onde as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Em um tubo de 10mL adicionou-se 100µL do sobrenadante do caldo enzimático e adicionando-se 200 µL de água deionizada e 300µL de reagente DNS. No controle do reagente adicionou-se 300µL de água deionizada e 300µL de reagente DNS e para o controle da amostra adicionou-se 100µL da amostra e 500µL de água deionizada.

Os tubos foram submetidos à fervura durante 5 minutos e resfriados. Em seguida, adicionou-se 1000µL de água deionizada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para o comprimento de onda de 540 nm.

A curva de quantificação padrão, mostrada no gráfico 03, foi construída utilizando-se diferentes concentrações de glicose, onde a partir da equação da reta foi possível calcular o quanto de glicose está sendo liberada para o meio durante um determinado período de tempo.

Gráfico 03. Curva Padrão utilizando glicose para quantificação açúcar reductor.

Fonte: Dados da pesquisa.



4.1.11 Quantificação de proteína

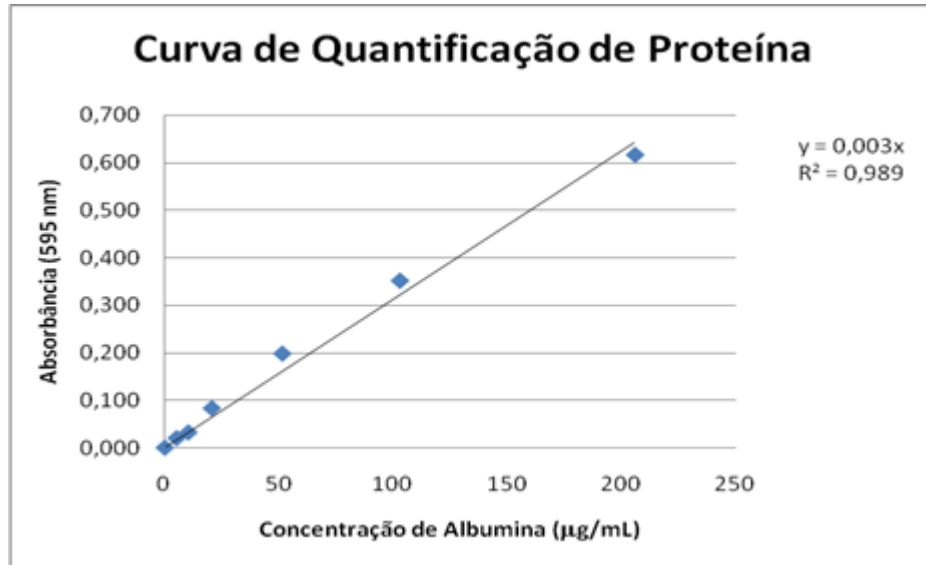
Na quantificação de proteína foi utilizada a metodologia de Bradford, 1976. A amostra foi transferida para um tubo de endoff e centrifugada por 10.000 rpm por um período de 10 minutos. Em um tubo de 10mL adicionou-se 200µL do sobrenadante e adicionou-se 1800µL de uma solução de Bradford 0,1mg.mL⁻¹. No controle do reagente adicionou-se 200µL de água e adicionou-se 1800µL de uma solução de Bradford 0,1mg.mL⁻¹. Esperou-se 5 minutos de tempo reacional e realizou-se a leitura em espectrofotômetro em 595nm.

A determinação do teor de proteína foi realizada com o auxílio da equação da reta proveniente de uma curva de quantificação padrão, mostrada no gráfico 04, que

foi construída nas mesmas condições deste experimento utilizando como padrão BSA (albumina).

Gráfico 04. Curva Padrão utilizando BSA para quantificação de proteína.

Fonte: Dados da pesquisa.



4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA E β -GLICOSIDASE

O cultivo submerso das linhagens isoladas das sementes de andiroba (*Carapa guianensis*) e das raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) foi realizado inicialmente por um período de 10 dias (aproximadamente 240 horas) e para a produção dos concentrados por um período de 16 dias nos quais após as análises foram obtidos os valores das absorbâncias referentes a cada amostra, de cada dia, realizadas em duplicata.

Para cada cultivo submerso, foram realizadas em todas as amostras as análises da atividade enzimática, açúcar redutor e proteína e a partir das absorbâncias obtidas, foi possível realizar uma média dos valores referentes as amostras, calcular a absorbância líquida (média das absorbâncias – branco de maior valor), o desvio padrão, a variância, a concentração xilose, PNP, glicose e albumina liberadas pelas linhagens. Os cálculos foram realizados com a ajuda do programa Excel versão 2012. As concentrações das amostras foram calculadas com o auxílio da equação da reta

de uma Curva de Quantificação Padrão construída para cada análise como já foi mostrado em gráficos anteriores.

Como descrito anteriormente, a partir das curvas de quantificação mostradas foi possível calcular as concentrações relacionadas as respectivas quantificações e a atividade enzimática (U/mL) de cada enzima produzida pelos fungos selecionados.

A atividade enzimática β -glicosidásica e xilanásica foi calculada a partir da equação 1 descrita.

Equação 1. Cálculo das Atividades enzimáticas xilanase e β -glicosidase.

$$Atividade = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{Vt}{Ve} \times \frac{1}{T} \times 1000 \times Fd$$

Onde, Atividade é dada em U/mL, A = absorvância líquida, ε = coeficiente angular da equação da reta da curva de quantificação, Vt= volume total na análise (mL), Ve= volume enzima na análise (mL), T= tempo (minutos) e Fd= fator de diluição utilizado.

Em algumas amostras foi necessário fazer uma diluição, o fator de diluição foi calculado a partir da equação 2 descrita abaixo.

Equação 2. Cálculo do Fator de diluição

$$Fd = \frac{Vt}{Ve}$$

Onde, Fd= fator de diluição, Vt= volume total (mL) e Ve= volume enzima (mL).

É importante ressaltar que para a maioria dos fungos houve diluição do caldo enzimático, essas diluições amostra(μ L):água(μ L) foram 200:200, 100:300, 50:350, 25:375, e especificamente para os fungos MIBA 0346 e MIBA 0769 houveram diluições 10:390 e 5:395. Durante o período de análise foi observado que a maioria dos fungos selecionados baixaram o pH e o mantiveram entre 5,0 e 5,5. A avaliação sobre a concentração de açúcar para todas as amostras manteve-se como o

esperado, os valores aumentaram, com algumas oscilações que devem-se há alguns erros de manipulação nas análises.

4.3 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICOS XILANÁSICOS

Na produção dos concentrados da enzima xilanase foram utilizados 250mL de meio contendo xilano de madeira e sais inorgânicos, nas concentrações descritas anteriormente, em erlenmayer de 500mL. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 3mL e avaliada a atividade e o teor de proteína. Ao se atingir a atividade máxima, 50% do meio foi filtrado e retirado e adicionado a mesma quantidade retirada de meio fresco. Após a troca do meio, novas alíquotas foram retiradas até se atingir a atividade máxima novamente e os filtrados (concentrados) foram congelados a -5°C . Para a produção dos concentrados xilanásicos foram selecionados os fungos MIBA 0769 e MIBA 0346, pois foram os que apresentaram maior atividade em 240 horas na quantificação na etapa anterior.

O cultivo dessas duas linhagens selecionadas foi realizado em agitação e em modo estático. O cultivo em agitação foi feito em shaker orbitalar a 30°C e o cultivo estático mantido em mesma temperatura.

4.4 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICOS B-GLICOSIDÁSICOS

Na produção dos concentrados da enzima β -glicosidase foram utilizados 250mL de meio contendo farelo de trigo e sais inorgânicos, nas concentrações descritas anteriormente, em erlenmayer de 500mL. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 2mL e avaliada a atividade e o teor de proteína. Ao se atingir a atividade máxima, 50% do meio foi filtrado e retirado e adicionado a mesma quantidade retirada de meio fresco. Após a troca do meio, novas alíquotas foram retiradas até se atingir a atividade máxima novamente e os filtrados (concentrados) foram congelados a -5°C . Para a produção dos concentrados β -glicosidásicos foram selecionados os fungos MIBA 0300 e MIBA 0769, pois foram os que apresentaram maior atividade em 240 horas na quantificação na etapa anterior.

O cultivo dessas duas linhagens selecionadas foi realizado em agitação e em modo estático. O cultivo em agitação foi feito em shaker orbitalar a 30°C e o cultivo estático mantido na mesma temperatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos obtidos foram isolados assepticamente a partir das raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) e sementes de andiroba (*Carapa Guianensis*), na qual quando este trabalho foi desenvolvido as linhagens já estavam depositadas na Micoteca do LabISisBio – UFPA.

Inicialmente a seleção dos microrganismos utilizados neste trabalho levou em consideração apenas aqueles que ainda não haviam sido estudados. Os resultados a seguir mostram outras seleções, nas quais resultaram as linhagens que apresentarem maior potencial de produção para as enzimas xilanase e β -glicosidase.

5.2 INVESTIGAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Na análise de investigação do crescimento das linhagens nos cinco diferentes eixos de cultivo, os meios BDA, Czapek e Extrato de malte foram os melhores, onde mais de 50% dos fungos selecionados conseguiram se desenvolver mais e alcançar todo o diâmetro da placa em poucos dias. Essa constatação deve-se a necessidade dos fungos em obter glicose dos meios de cultura para sua sobrevivência. Dentre os 18 fungos selecionados, cinco desses conseguiram se desenvolver de maneira mais ágil durante o período de 3 e 4 dias. A investigação de crescimento dos fungos MIBA 0130, 0156, 0221, 0300 e 0500, que foram os melhores são mostrados nas tabelas 03,04, 05, 06 e 07. Os valores mostrados nessas tabelas são referentes as medidas do crescimento dos fungos (cm) para cada dia em cada meio de cultura.

Tabela 03. Investigação de crescimento do fungo MIBA 0130.

Dias	BDA		APY		Sabouraud		EM		Czapek	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1 ^o	0,9;1,0	1,0;1,0	2,6;2,7	2,0;2,1	1,0;1,0	0,8;0,8	1,2;1,2	1,2;1,4	0,7;0,8	0,8;0,6
2 ^o	4,2;4,4	5,9;5,8	5,1;5,1	4,3;4,2	7,3;7,1	5,8;5,5	5,4;5,5	5,5;5,2	5,3;6,0	6,2;6,0
3 ^o	7,2;7,6	7,8;7,9	7,5;7,5	7,9;7,5	9,0;9,0	8,5;8,4	7,2;7,2	7,7;7,6	9,0;9,0	9,0;9,0
4 ^o	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	-	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-

Tabela 04. Investigação de crescimento do fungo MIBA 0156.

Dias	BDA		APY		Sabouraud		EM		Czapek	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1 ^o	1,9;2,0	1,9;1,8	2,2;2,1	2,2;2,2	1,5;1,3	1,5;1,3	1,4;1,5	1,5;1,4	1,3;1,6	1,3;1,6
2 ^o	7,3;7,1	6,9;6,5	5,0;5,0	4,6;4,9	7,7;8,8	9,0;9,0	4,5;4,7	4,3;4,5	7,2;7,5	7,0;7,3

3 ^o	9,0;9,0	9,0;9,0	8,4;8,5	7,6;7,2	9,0;9,0	-	7,5;7,4	7,3;7,2	9,0;9,0	9,0;9,0
4 ^o	-	-	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-

Tabela 05. Investigação de crescimento do fungo MIBA 0221.

Dias	BDA		APY		Sabouraud		EM		Czapek	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1 ^o	2,0;2,5	2,3;2,3	2,6;2,3	2,3;2,1	2,4;2,3	2,2;2,2	1,8;1,8	2,0;2,0	1,2;1,2	1,2;1,2
2 ^o	8,3;8,1	7,1;7,2	5,5;5,8	5,5;5,8	7,5;7,5	8,2;8,4	4,3;3,9	3,5;5,2	5,3;6,3	6,5;7,1
3 ^o	9,0;9,0	9,0;9,0	8,5;8,9	8,5;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	6,5;6,7	6,4;6,7	9,0;9,0	9,0;9,0
4 ^o	-	-	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-

Tabela 06. Investigação de crescimento do fungo MIBA 0300.

Dias	BDA		APY		Sabouraud		EM		Czapek	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1 ^o	2,2;2,0	2,1;2,0	3,1;3,1	2,9;3,0	2,0;2,0	2,2;2,2	2,1;1,6	2,1;2,0	2,0;2,2	2,1;2,5
2 ^o	7,2;7,3	7,5;7,5	6,4;6,3	6,0;6,0	9,0;9,0	9,0;9,0	6,6;6,3	6,3;5,8	8,5;8,3	8,0;8,7
3 ^o	8,5;8,4	8,2;8,7	8,5;8,9	8,8;8,8	-	-	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0
4 ^o	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	-	-	-	-	-	-

Tabela 07. Investigação de crescimento do fungo MIBA 0500.

Dias	BDA		APY		Sabouraud		EM		Czapek	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1 ^o	2,9;2,8	2,8;3,0	3,7;3,5	3,5;3,8	2,9;3,0	2,7;2,6	1,9;2,0	2,0;1,9	1,3;1,3	0,7;0,8
2 ^o	7,3;7,4	6,6;6,7	6,9;6,4	6,8;6,9	7,7;8,2	7,6;8,3	5,6;5,7	5,7;5,9	7,2;7,0	7,5;7,8
3 ^o	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0	9,0;9,0

5.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O teste de revelação realizado mostrou que apenas duas linhagens não foram positivas para a presença de xilanase e que a maioria apresentou halo de degradação entre 0,1 e 0,2cm. Apenas uma linhagem apresentou halo significativo de 0,5cm.

O halo translucido de degradação formado após o teste de revelação mostra que a linhagem selecionada mostra-se positiva frente a xilanase, ou seja, que a linhagem possui a capacidade de hidrolisar o substrato do meio, que nesse caso específico foi o xilano de madeira, no qual é constituído de hemicelulose. As tabelas 08 apresenta os resultados da revelação com os respectivos halos (cm) de cada linhagem.

Tabela 08. Teste de revelação para a enzima xilanase realizado com as linhagens selecionadas.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Fungos Selecionados	Produção Xilanase	Halo xilanase (cm)	
MIBA 0351	presente	0,1	0,1
MIBA 0345	presente	0,2	0,2
MIBA 0346	presente	0,1	0,1
MIBA 0347	presente	0,2	0,2
MIBA 0369	presente	0,1	0,1
MIBA 0285	presente	0,1	0,1
MIBA 0348	presente	sem halo	sem halo
MIBA 0770	presente	0,1	0,1
MIBA 0350	presente	0,2	0,2
MIBA 0507	presente	0,1	0,1
MIBA 0500	ausente	-	-
MIBA 0021	presente	0,1	0,1
MIBA 0044	ausente	sem halo	sem halo
MIBA 0069	presente	sem halo	sem halo
MIBA 0130	presente	sem halo	sem halo
MIBA 0156	presente	0,1	0,1
MIBA 0201	presente	sem halo	sem halo
MIBA 0221	presente	sem halo	sem halo
MIBA 0288	presente	0,5	0,5
MIBA 0300	presente	sem halo	sem halo

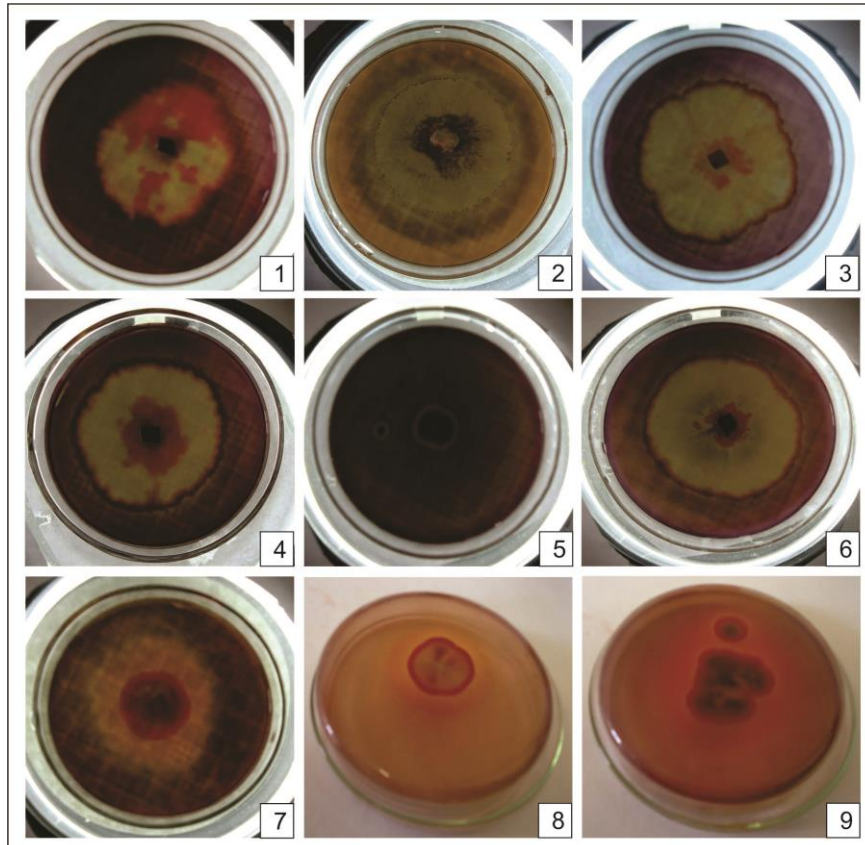
De acordo com a tabela 08, os fungos MIBA 0345, MIBA 0350, MIBA 0347, MIBA 0021 e MIBA 0288 foram as linhagens que apresentaram a medida de maior halo translúcido formado ao redor da colônia.

As figuras 04 e 05 são referentes ao teste de revelação realizado para a enzima xilanase utilizando vermelho congo e cloreto de sódio, onde é possível observar o halo

de degradação ao redor das colônias de fugose, comprovando o potencial das linhagens em hidrolisar o substrato.

Figura 04. Teste de revelação para xilanase realizado com as linhagens selecionadas.

Fonte: Dados da pesquisa.

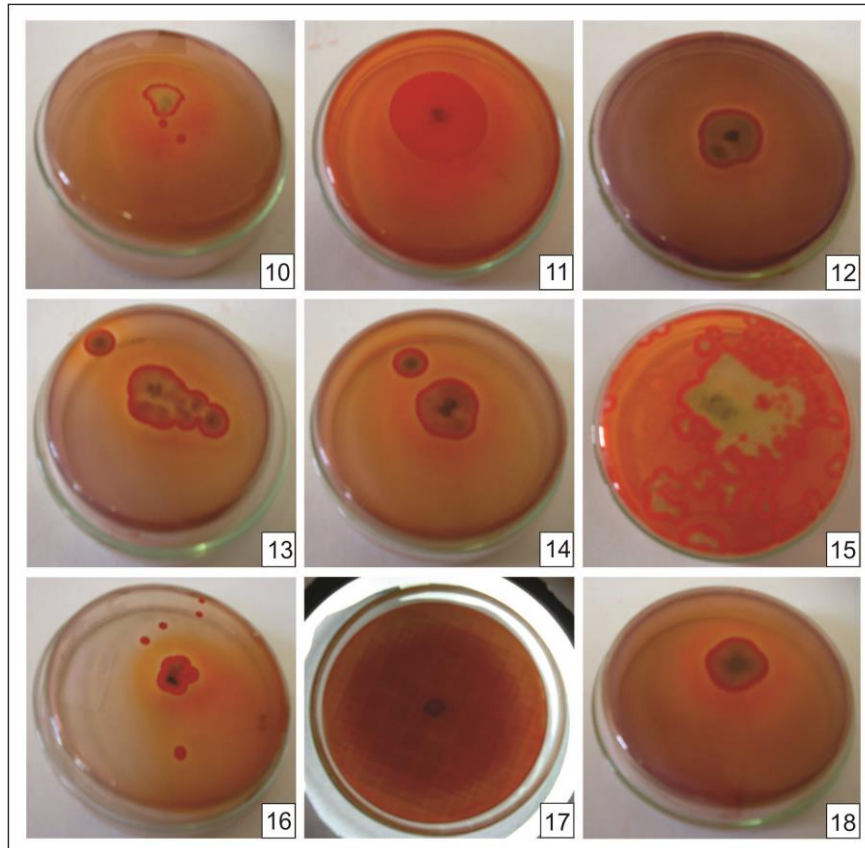


Legenda: 1-MIBA 0300; 2-MIBA 0069; 3-MIBA 0350; 4-MIBA 0221; 5-MIBA 0021; 6-MIBA 0156; 7-MIBA 0288; 8-MIBA 0351; 9-MIBA 0769

De acordo com a figura 4 observa-se que os fungos MIBA 288, MIBA 0351 e MIBA 0769 que estão nos quadros 7,8, 9 respectivamente foram os que apresentaram maior halo de degradação, ou seja, foram os que conseguiram melhor degradar o substrato utilizado. Segundo a mesma figura, as outras linhagens apenas tiveram a capacidade descorar a colônia.

Figura 05. Teste de revelação para xilanase realizado das demais linhagens selecionadas.

Fonte: Dados da pesquisa.



Legenda: 10-MIBA 0770; 11-MIBA 0507; 12-MIBA 0345; 13-MIBA 0285; 14-MIBA 0346; 15-MIBA 0348; 16-MIBA 0201; 17-MIBA 0500; 18-MIBA 0347.

De acordo com a figura 05, os fungos MIBA 0345, MIBA 0285, MIBA 0346 e MIBA 0347 correspondentes aos quadros 12, 13, 14 e 18 respectivamente foram os melhores em degradar o substrato, pois conseguiram formar um halo translúcido ao redor da colônia. Os fungos MIBA 0507 e MIBA 0500, quadros 11 e 17 respectivamente, foram os únicos que não conseguiram degradar o substrato.

5.4 PRODUÇÃO DE XILANASE

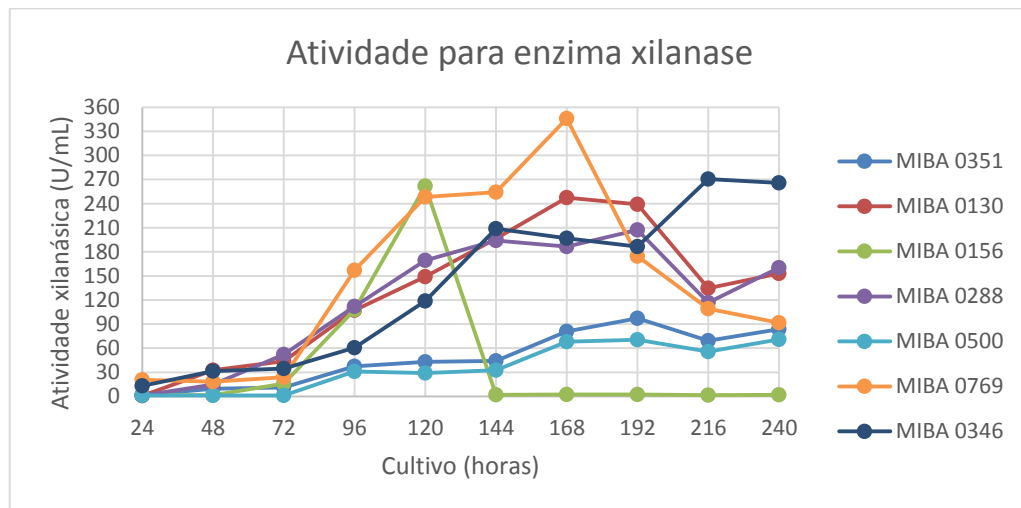
As análises de avaliação do potencial da enzima xilanase em degradar o xilano de madeira contido no meio de cultivo como substrato é demonstrado nos gráficos 05 e 06.

5.4.1 Atividade enzimática xilanase

No screening inicial realizado em cultivo submerso para avaliação do potencial de produção das dez linhagens selecionadas observou-se que duas delas apresentaram potencial de destaque, nas qual estão codificadas como MIBA 0769 e MIBA 0346. No gráfico 05 é observado os valores das atividades xilanásicas em (U/mL) durante o período de aproximadamente 240 horas. As linhagens em destaque citadas anteriormente apresentaram maior potencial em aproximadamente 168 e 216 horas respectivamente, mostrando potencial de degradação do xilano de madeira presente como substrato no meio de cultivo.

Gráfico 05. Atividade enzimática para xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.



Segundo Valadares, 2013 o *T. reesei* é um dos melhores produtores de enzimas hemicelulolíticas onde a enzima xilanase chega a alcançar 485 a 2147 U/mL. As linhagens MIBA 0769 e 0346 apresentaram valores próximos de aproximadamente 340 U/mL e 253 U/mL respectivamente.

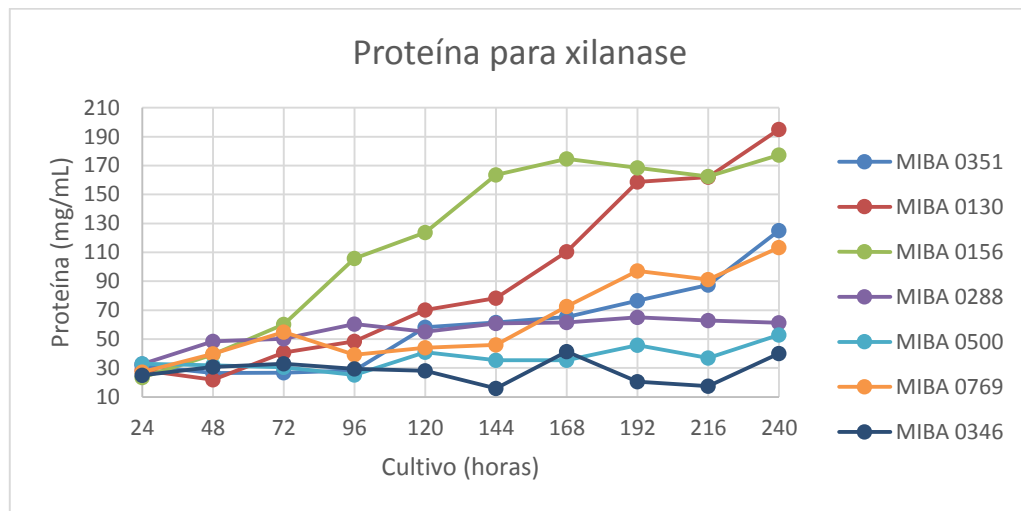
5.3.2 Avaliação para proteína em xilanase

As análises realizadas comprovaram potencial proteico dentro dos valores esperados para a avaliação de proteína para xilanase. As linhagens MIBA 0130 e MIBA 0156 destacaram-se por apresentarem os maiores valores durante 240 horas.

O gráfico 06 mostra essa avaliação inicial realizada para proteína advindas do cultivo submerso para enzima xilanase.

Gráfico 06. Proteína para enzima xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.



Segundo Valadares, 2013 e Souza, 2012 os valores de proteína variam entre 107 mg/mL a 323 mg/mL. Os fungos MIBA 0130 e 0156 obtiveram valores próximos a 200 mg/mL autenticando a boa produção proteica por linhagens fungicas.

5.5 PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE.

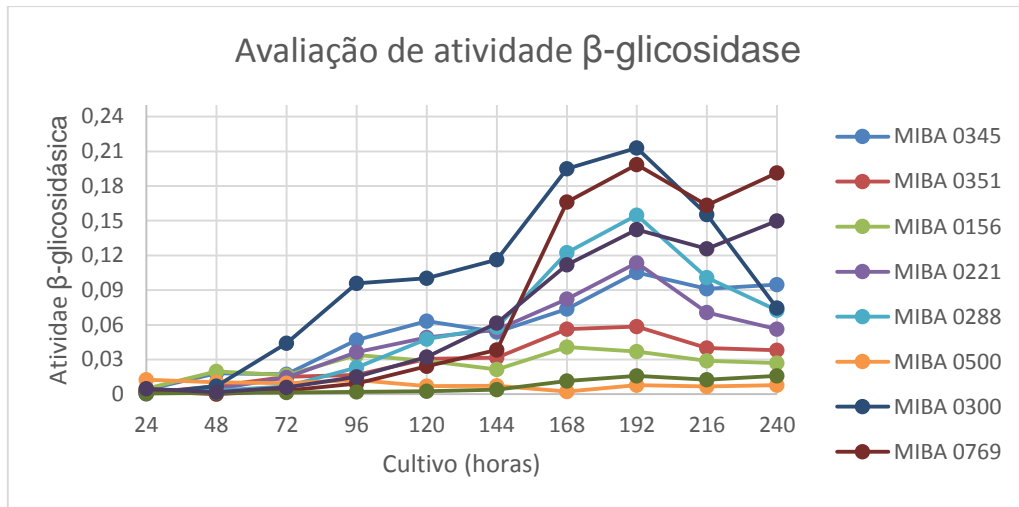
Os gráficos 07 e 08 mostram a avaliação inicial realizada para dez linhagens selecionadas, na qual a quantificação demonstra o potencial de degradação do substrato farelo de trigo pela ação enzima β -glicosidase excretada pelos fungos.

5.5.1 Atividade enzimática β -glicosidase

Na avaliação da atividade β -glicosidásica as linhagens MIBA 0300 e MIBA 0769 foram aquelas que apresentaram maior destaque por quantificarem maior atividade em U/mL em um período de 192 horas como a maioria das outras linhagens avaliadas. O gráfico 07 mostra a avaliação inicial das dez linhagens selecionadas para a enzima β -glicosidase em farelo de trigo.

Gráfico 07. Atividade da enzima β -glicosidase.

Fonte: Dados da pesquisa.



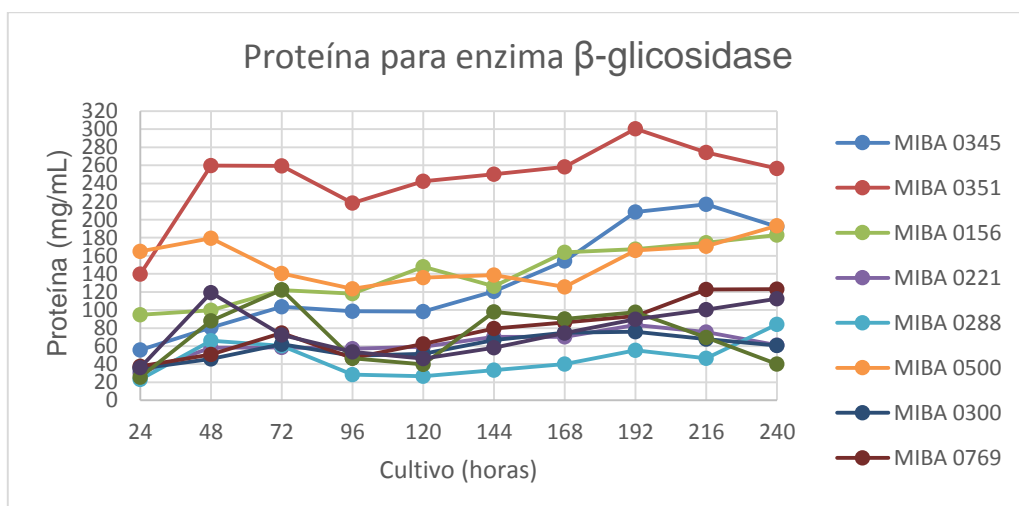
De acordo com Valadares, 2013 o fungo *T. reesei* também é uma das melhores espécies produtoras de enzima celulolítica β -glicosidase onde sua produção é de até 2,7U/mL. Os fungos MIBA 0300 e 0769 foram os que apresentaram atividades próximas a 0,22U/mL e foram considerados os melhores entre os selecionados.

5.5.2 Avaliação da proteína em β -glicosidase

Na avaliação proteica da enzima β -glicosidase realizada para as dez linhagens selecionadas, observou-se destaque da linhagem MIBA 0351 por apresentar valores significativos para proteína em mg/mL. O gráfico 08 mostra o comportamento das linhagens analisadas pelo período de 240 horas.

Gráfico 08. Proteína para enzima β -glicosidase.

Fonte: Dados da pesquisa.



Segundo o mesmo referencial teórico citado anteriormente, a linhagem codificada como MIBA 0351 que obteve maior destaque apresentou maior produção proteica igual a aproximadamente 300 mg/mL, valor bem próxima a literatura consultada.

5.6 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICOS DE XILANASE

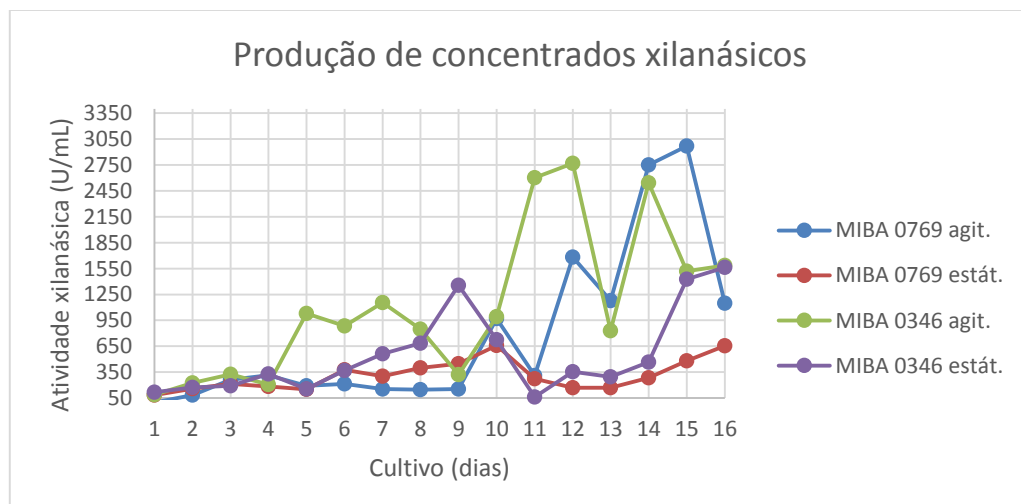
A avaliação da produção de concentrados foi realizada em um período de 18 dias consecutivos. Observou-se que tanto para os concentrados xilanásicos quanto para os β -glicosidásicos, a atividade enzimática aumentou de maneira significativa em relação a avaliação inicial

5.6.1 Atividade xilanase dos concentrados

O gráfico 09 mostra a avaliação realizada para a produção dos concentrados enzimáticos onde as linhagens MIBA 0769 e MIBA 0346 que estavam mantidos sobre agitação apresentaram valores significativos de atividade enzimática de aproximadamente 3.000 U/mL e 2.750 U/mL em 12 e 15 dias respectivamente. Segundo o mesmo gráfico, observou-se também que a produção de forma estática para as mesmas linhagens foi muito menos significativa. Dessa forma, conclui-se que os concentrados enzimáticos das linhagens que foram mantidas sob agitação apresentam maior potencial de hidrólise da hemicelulose constituinte xilano de madeira.

Gráfico 09. Atividade enzimática dos concentrados de xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.

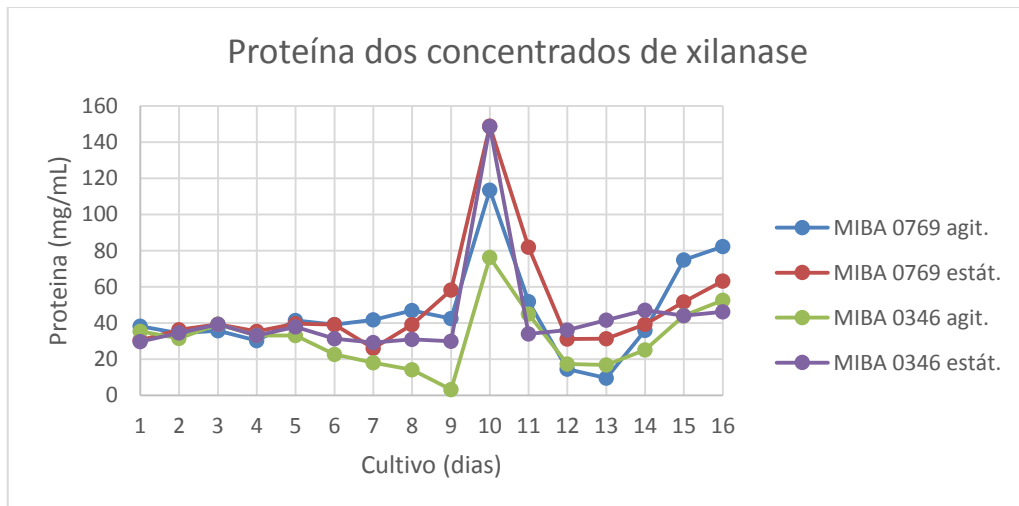


5.6.2 Proteína dos concentrados xilanásicos

A produção de proteína por concentrados xilanásicos mostrou-se controversa no gráfico 10, onde em 10 dias de cultivo as linhagens MIBA 0769 e MIBA 0346 mantidas estáticas apresentaram maiores valores de atividade proteica do que as mesmas linhagens quando mantidas em agitação. No entanto para linhagem MIBA 0769 sob agitação houve aumento na atividade de proteína correspondente a atividade enzimática do meio.

Gráfico 10. Proteína dos concentrados de xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.

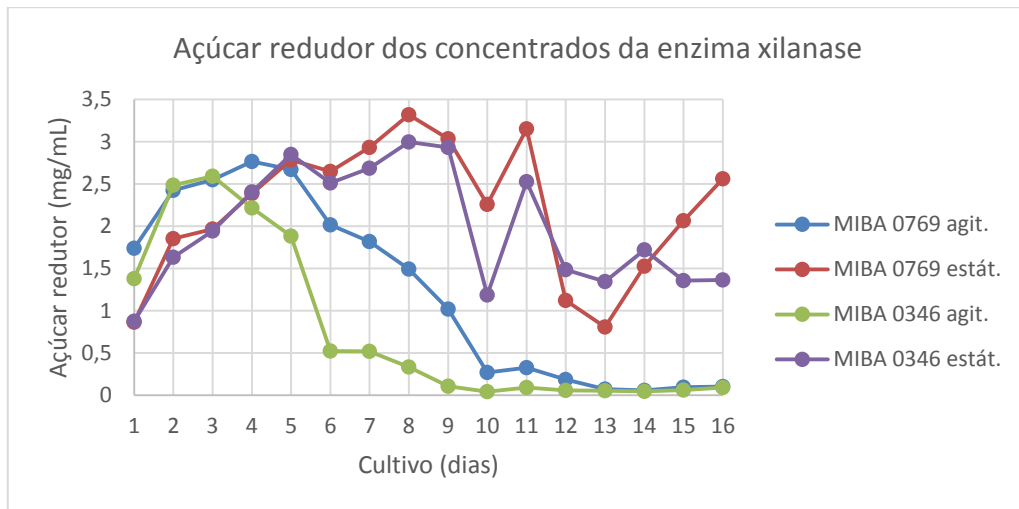


5.6.3 Açúcar redutor dos concentrados de xilanase.

Na avaliação da glicose, mostrada no gráfico 11, presente no meio de cultivo dos concentrados onde as linhagens foram mantidas sob agitação, observou-se uma alta produção nos primeiros dias de análise e em seguida o consumo do açúcar que foi produzido no meio. Para as linhagens que foram mantidas em modo estático houve incoerência nos dados obtidos. Dessa forma, será necessário a repetição das análises.

Gráfico 11. Açúcar redutor dos concentrados de xilanase.

Fonte: Dados da pesquisa.



5.7 PRODUÇÃO DOS CONCENTRADOS ENZIMÁTICOS DE β -GLICOSIDASE

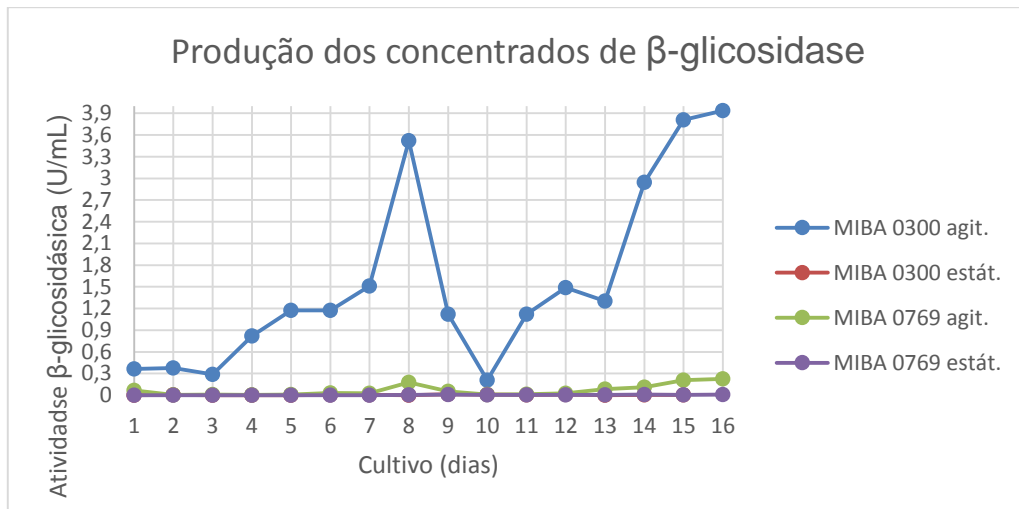
A avaliação da produção dos concentrados para a enzima β -glicosidase também foi significativa para apenas uma das linhagens analisadas que estava sob agitação. Foi observado também que a ausência de rotação inibiu a produção dessa enzima. Dessa forma, conclui-se que apenas uma das linhagens dos concentrados obtidos apresenta a capacidade de hidrolisar o substrato farelo de trigo, rico em celulose vegetal.

5.7.1 Atividade β -glicosidase dos concentrados

Na avaliação de β -glicosidase observou-se o significativo aumento de atividade enzimática da linhagem MIBA 0300 sob agitação quando comparada a avaliação inicial que foi realizada, onde atividade máxima foi próxima a 3,9 U/mL no 16º dia de cultivo como pode ser verificado no gráfico 12. Observou-se também que a mesma linhagem mostrou-se inibida quando mantida de forma estática para a produção, pois durante 16 dias a produção de atividade máxima foi igual a 0,0008 U/mL

Gráfico 12. Atividade enzimática dos concentrados de β -glicosidase.

Fonte: Dados da pesquisa.



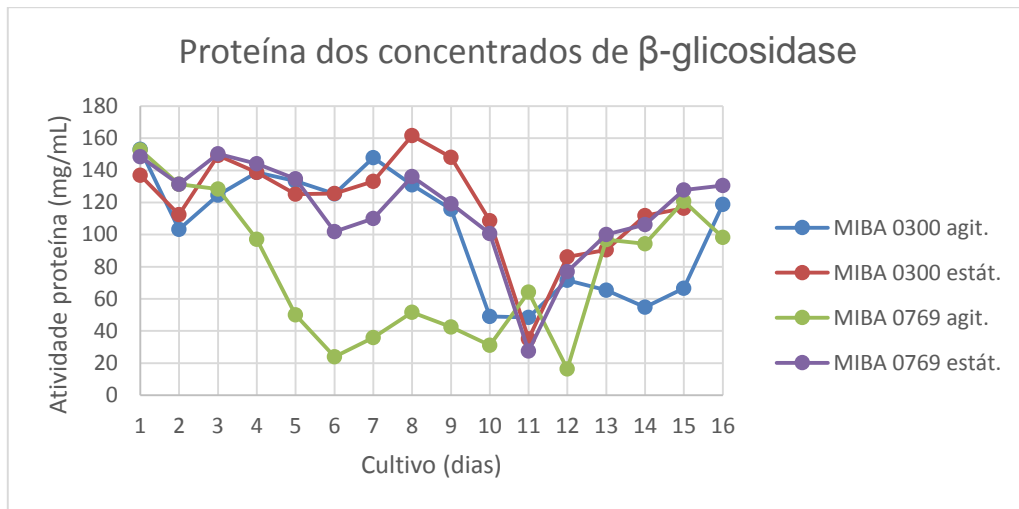
5.7.2 Proteína dos concentrados β -glicosidásicos

A avaliação de proteína realizada para os concentrados de β -glicosidase, de acordo com o gráfico 13, mostraram comportamento similar a avaliação inicial. No entanto, a maioria dos dados obtidos oscilaram muito, sendo assim, para a constatação de valores β mais próximos dos reais será necessário refazer as análises de proteína, pois além da possibilidade de ter ocorrido erros na manipulação das análises, pode ser que os concentrados estejam produzindo uma enzima interferente no processo chamada protease.

Observa-se também que o decaimento da produção de proteína pelos concentrados ocorre apenas na primeira etapa (obtenção do primeiro concentrado), pois a partir do 11^o e 12^o dia os valores começam a aumentar, como esperado, pois houve a adição de 50% de meio fresco ao sistema.

Gráfico 13. Proteína dos concentrados de β -glicosidase.

Fonte: Dados da pesquisa.

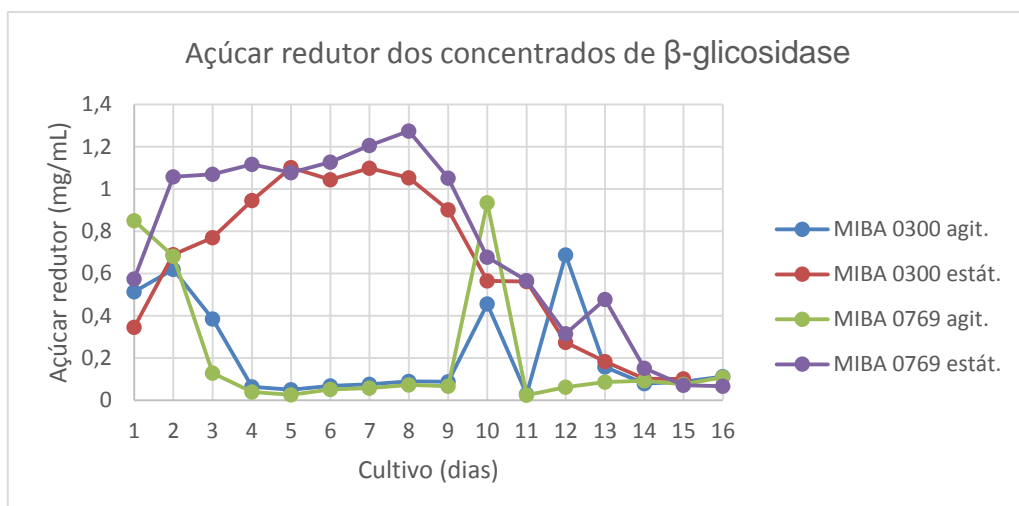


5.7.3 Açúcar redutor dos concentrados de β -glicosidase

A avaliação de glicose no meio de cultivo comportou-se de forma totalmente diferente para os cultivos sob agitação e estático como pode ser verificado no gráfico 14. Para as linhagens MIBA 0769 e MIBA 0300 mantidas em cultivo estático observou-se uma produção de glicose nos primeiros dias de cultivo e em seguida um consumo desse mesmo produto que foi produzido. Já em relação as mesmas linhagens que foram mantidas sob agitação mostrou-se que as mesmas só apresentaram a capacidade de consumir o açúcar que já estava contido no meio de cultivo.

Gráfico 14. Açúcar redutor dos concentrados de β -glicosidase.

Fonte: Dados da pesquisa.



6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados discutidos conclui-se que o screening realizado das linhagens selecionadas da coleção MIBA apresentam qualitativamente a presença de atividade xilanásica. Dessa forma, a avaliação inicial de quantificação das linhagens pré-selecionadas a produzir as enzimas β -glicosidase e xilanase mostraram que aquelas codificadas como MIBA 0300, MIBA 0346 e 0769 foram as que apresentaram maior potencial de hidrólise dos substratos utilizados, farelo de trigo e xilano de madeira mostrando a maior a atividade enzimática após dez dias consecutivos de cultivo e destacando-se por serem bons produtores de tais enzimas hidrolíticas.

Na produção de concentrados as linhagens mantidas sob agitação a 30°C foram aquelas que apresentaram maiores potenciais enzimáticos tanto para a enzima xilanase quanto para a enzima β -glicosidase.

Nas atividades β -glicosidásicas obtida dos concentrados, a linhagem MIBA 0300 mantida em agitação apresentou 3,9 u/mL sendo considerada a de maior significância e mostrando a capacidade de hidrolisar o material celulolítico. É importante ressaltar que a produção dos concentrados dessa enzima que foram mantidos de modo estático apresentaram dados insignificantes de atividade, menores que 0,3 U/mL.

Nas atividades para a enzima xilanase obtida dos concentrados observou-se o alto potencial enzimático das duas linhagens analisadas (MIBA 0769 e MIBA 0346) mantidas sob agitação onde apresentaram 3.000 U/mL e 2.750 U/mL respectivamente. Dessa forma, a partir dos dados obtidos esses concentrados mostraram a capacidade de hidrolisar o substrato hemicelulolítico.

Em complementação ao trabalho, será necessário a avaliação da capacidade de hidrólise dos resíduos industriais de mandioca, mais especificamente as fibras amiláceas. No entanto, mesmo sem esta avaliação pode-se pré-afirmar que há grades possibilidades dos concentrados obtidos das enzimas xilanase e β -glicosidase hidrolisarem esse resíduo pelos constituintes da parede celular da mesma possuírem materiais hemicelulíticos e celulolíticos, que também estão presentes no xilano de madeira e farelo de trigo.

7 REFERÊNCIAS

- ANDREWS, J. H.; HARRYS, R. F. The ecology and geography of microorganism on plants surfaces. **Annu Rev Phytopathol**, v.38:145-180, 2000.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p.226, 1991.
- BETTIOL, W. Efeito do *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do bruzone do arroz. **Summa Philopatológica**, Botucatu. v.15: 257-266, 1997.
- BRADFORD, M. A rapid sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v 72, p 248-254, 1976
- CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. 3° ed. Porto Alegre: Artmed 2000.
- CARVALHO. M.L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Carlos, 2011.
- COLLARES, R.N. **Otimização do processo de hidrólise da mandioca “in natura” com uso de enzimas amilolíticas e pectolítica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2011.
- COUGHLAN, M. P. AND HAZLEWOOD G. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17, 259-289, 1993.
- CUZZY, C.; LINK, S.; VILANI, A. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Bacchararis Dracuncifulia* D.C. **Global Science e Technology**, 4 (2): 47-57, 2011.
- DAROIT, D.J. **Caracterização de uma β -glicosidase de *Monascus purpureus***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- ESCHEUFELLE, F. B. ;BUTSK, A.S.; MARRA, I.F. Otimização dos parâmetros de hidróliseenzimática do bagaço de cana de açúcar. **Engevista**. 14(3): 310-321, 2012.
- GHIZELINI, A. M., AUER, C. G., PIMENTEL, I. C. Fungos presentes em acículas de Pinus taeda em estágios iniciais de decomposição no campo. **Bol. Pesq**, 2006.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova** 30(1), 2007.
- GUPTA R.; MOHAPATRAH.; GOSWAMI VK.; CHAUHAN B. 2003. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. jan, p.1.
- HARGER, C.; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A Z. (2006), Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, 32, 179-184.

KOHAN, L.; ARAÚJO, M.C. **Processos Enzimáticos na Indústria Têxtil: uma alternativa com menor impacto ambiental**. Dissertação de mestrado. Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

JANIS, J.; PULKKIKEN, P.; ROUVIVEN, J.; VAINIOTALO, P. (2007), Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, N.365: pp: 165-1.

LEITE, F. M. N.; SOUZA, J. M. L.; NEGREIROS, J. R. S.; ALVARES, V. S.; SOUZA, M. L.; REIS, F. S.; FELISBERTO, F. A. V. Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas 28(4): 907-912, 2008.

LEE, O. H. K.; HYDE. K. D. Phylloplane fungiin Hong Kong mangroves: evaluation of study methods. **Mycology**. v.94 p.596-606,2002.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Savier, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.;PRETORIUS, I. S.; **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 2002, 66, 506.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando o bagaço da cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2006.

MAGALHÃES, P.O. **Purificação de Hemicelulases e uma β -glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2005.

MARZZOCO, Anita. Torres, BAYARDO B. **Bioquímica Básica**. 3º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATSUURA, M; SASAKI, J e MURAO, S. Studies on β -Glucosidases from Soybeans that hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme measurement of cellulase activities. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 59 (9), 1623- 1627, 1995.

MENEZES, C.L.; SILVA, I.S. e DURRANT, M.R. “Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas”, **Estudos Tecnológicos** - Vol. 5, nº 1:68-78, 2009.

MILLER, G. L. “Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar”, **Anal.Chem.**11, 426-428, 1959.

MOTTA, V.T. **Bioquímica básica**. Capítulo de Enzimas. Editora autolab. 2011.

OLIVEIRA, F.M. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado com uréia. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

PEREIRA, V.M. **Avaliação DO Potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus suphureus* Wehmer**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, 2012.

ROCHA, B.B. **Caracterização do perfil enzimático de um fungo isolado do cerrado brasileiro**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. 2012.

SANTOS, L.F.; ISHII, P, L.(2011) Xilanases: Principais Metodologias e Parametros Cinéticos. **Journal of Biotechnology end Biodiversity**. Vol. 2, N. 2: pp7-15, Maio.

SARTORI, V.C. **Dinamica de populações de fungos endofíticos e epifíticos, impactoecológico em diferentes sistemas de produção de macieira (*Malus domestica*) e seu potencial biotecnológico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, 2003.

STRAUSS, M. L. A. et al. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 91, p. 182-190.

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

THEATHER AND WOOD, 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology** 4 p. 777-780.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6a Ed. Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2002.

VALADARES, F.L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré tratado por processo quimiomecânico**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2013.

VIEGA, João Paulo Soto. **Caracterização de resíduos de colheita da mandioca (*Manihot esculenta CRANTZ*) e avaliação do potencial de co-geração de energia no processo de produção de etanol**. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Engenharia Mecânica, na Área de Térmica e Fluidos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

WESTBY, A. Cassava utilization, storage and small-scale processing. In: HILLOCKS, R. G.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.). **Cassava: biology, production and utilization**. Chapter 14. CAB International, 2002, p. 281-200.

WYMAN, C.E.; WASE, D.A.J.; RYU, D.D.Y. Cellulosic ethanol: A unique sustainable liquid transportation fuel. **MRS Bull.**, 33: 381-382, 2003.

ZHOU, S.; DAVIS, F. C.; INGRAM, I. O.; **Appl. Environ. Microbiol.** 2001, 67, 6.