



**WESLEY DE OLIVEIRA MENDES**

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
CELULOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS  
DE SOLO DE ÁREA DE CANGA DA REGIÃO DO  
QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**WESLEY DE OLIVEIRA MENDES**

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ÁREA DE CANGA DA REGIÃO DO  
QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luis Roberto Batista

Orientador

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2019**

## RESUMO

A utilização de compostos produzidos por microrganismos movimenta um mercado altamente rentável ao redor do planeta. Produtos do metabolismo de microrganismos ganham relevância em diversos segmentos industriais, seja no ramo alimentar, farmacêutico, químico, têxtil, dentre outros. Dentre os microrganismos produtores de biomoléculas de interesse e aplicação, destacam-se os fungos filamentosos, que por sua vez são bons produtores de enzimas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial e quantificar a produção enzimática de fungos de solo de área de mineração. Para tanto, os fungos passaram por uma avaliação em placa, dita qualitativa. O resultado da fase qualitativa indicou que o maior produtor de celulases foi o fungo *Penicillium bilaiae*. Assim sendo, o microrganismo selecionado foi submetido à fermentação submersa para quantificação de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, tendo como substrato indutor a farinha da casca de uvas viníferas. O pico de atividade de endoglucanases se deu em 120 horas de fermentação e com a produção de 0,59 UI/mL, se tratando das  $\beta$ -glicosidases a maior produção foi constatada nas primeiras 24 horas, com atividade calculada em 1,77 UI/mL. Dessa forma, constatou-se que o isolado selecionado possui potencial aplicação como produtor de enzimas, abrindo margem para estudos que envolvam a otimização da produção enzimática.

**Palavras-chaves:** Biotecnologia. Celulases. Fungos filamentosos.

## ABSTRACT

The use of compounds produced by microorganisms moves a highly profitable market around the planet. Products of the metabolism of microorganisms gain relevance in several industrial segments, be it in the food, pharmaceutical, chemical, textile, among others. Among the microorganisms that produce biomolecules of interest and application, the filamentous fungi stand out, which in turn are good producers of enzymes. The objective of the present work was to evaluate the potential and quantify the enzymatic production of soil fungi from the mining area. For that, the fungi underwent a plaque evaluation, called qualitative. The result of the qualitative phase indicated that the largest producer of cellulases was the fungus *Penicillium bilaiae*. Therefore, the selected microorganism was subjected to submerged fermentation for the quantification of endoglucanases and  $\beta$ -glycosidases, with the inducing substrate being the flour of the bark of grapes. The peak activity of endoglucanases occurred in 120 hours of fermentation and with the production of 0.59 IU / mL, when the  $\beta$ -glycosidases were treated, the highest production was observed in the first 24 hours, with activity calculated at 1.77 IU / ml. Therefore, the selected isolate has potential application as a producer of enzymes, allowing for studies that involve the optimization of enzymatic production.

**Keywords:** Biotechnology. Cellulases. Filamentous fungi.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da ação das enzimas do complexo celulolítico. ....	16
Figura 2 – Representação da Câmara de Neubauer.....	
Figura 3 – Macro e micromorfologia de <i>Aspergillus aculeatus</i> .....	
Figura 4 - Macromorfologia de <i>Aspergillus flavus</i> .....	
Figura 8 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium bilaiae</i> .....	
Figura 9 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium janthinellum</i> .....	
Figura 13– Gráfico do perfil de atividade enzimática de endoglucanases .....	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das características entre FS e FES.....	13
Tabela 2 – Determinação da população fúngica (UFC/g) nas amostras analisadas .....	22
Tabela 3 Médias dos halos dos fungos produtores de celulases.....	28
Tabela 4 – Índices Enzimáticos encontrados na literatura e suas especificidades .....	29

Tabela 5 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de endoglucanases por fungos. (continua) .....	30
Tabela 5 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de endoglucanases por fungos. (conclusão) .....	31
Tabela 6 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de $\beta$ -glicosidases .....	32

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9

2.1	Biodiversidade do solo como fonte de microrganismos de interesse industrial .....	9
2.2	Biotecnologia de enzimas microbianas .....	10
2.3	Seleção de fungos com aplicação industrial .....	11
2.4	Processos Fermentativos .....	12
2.5	Enzimas de interesse industrial .....	13
2.5.1	Amilases .....	13
2.5.2	Pectinases .....	14
2.5.3	Proteases .....	14
2.5.4	Lipases .....	14
2.6	Celulose e enzimas do complexo celulolítico .....	15
2.7	Celulases e sua aplicação industrial .....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1	Local .....	18
3.2	Obtenção dos isolados .....	18
3.3	Isolamento e identificação de fungos filamentosos .....	18
3.4	Purificação dos isolados e identificação polifásica .....	18
3.5	Metodologia qualitativa .....	19
3.6	Teste enzimático de celulases .....	19
3.6.1	Índice enzimático .....	19
3.6.2	Análise estatística .....	20
3.6.3	Metodologia quantitativa .....	20
3.6.4	Indutor .....	20
3.6.5	Fermentação submersa (FS) .....	20
3.6.6	Inóculo .....	20
3.6.7	Atividade celulolítica .....	21
3.6.8	Atividade de endoglucanase .....	21
3.6.9	Atividade de $\beta$ -glicosidase .....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	22
4.1	Contagem de unidades formadoras de colônias totais (UFC) e isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> identificados .....	22
4.2	Potencial celulolítico dos isolados identificados .....	27
4.3	Produção quantitativa de celulases do isolado <i>Penicillium bilaiae</i> .....	30
5	CONCLUSÕES .....	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas sobre produtos naturais têm sido voltadas ao isolamento de microrganismos visando, principalmente, a descoberta de novas moléculas produzidas por estes, como resultados do metabolismo primário e secundário. Dado o potencial biotecnológico dos microrganismos esforços na busca de novas espécies produtoras de novas moléculas, tais como antibióticos, enzimas e outras vem aumentando cada vez mais.

Atrás apenas dos antibióticos, as enzimas são os produtos de origem microbiana mais explorados na biotecnologia industrial, já que apresentam menor custo, facilidade para produção, possibilidade de manipulação genética, além de representarem um recurso renovável em relação a enzimas de origem vegetal ou animal.

Muitas enzimas são exploradas para uso industrial, desde para isso é necessária produção enzimática em larga escala, e nesse sentido os microrganismos são preferencialmente utilizados por apresentarem fácil manipulação, rápido crescimento e, principalmente, baixo custo de produção.

*Aspergillus e Penicillium* são fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota, apresentam relevância quando se trata de produção de enzimas e outros metabólitos. Estes gêneros apresentam importância na indústria de alimentos, pois algumas linhagens participam de processos na produção de ácidos orgânicos, bebidas fermentadas e enzimas com aplicações industriais, além de serem potencialmente produtores de antimicrobianos e corantes. São capazes de sintetizar uma diversidade de enzimas, tais como, amilases que apresenta aplicações na panificação (modificação das massas), proteases em produtos alimentícios (amaciantes de carnes e obtenção de hidrolisados), pectinases e celulasas na clarificação de sucos e vinhos, e tantas outras enzimas empregadas em diferentes áreas industriais.

Assim sendo, o objetivo geral do trabalho é identificar fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus e Penicillium* isolados de solo de canga e avaliar o potencial enzimático para produção de celulasas de fungos filamentosos de solo de canga qualitativamente, e quantitativamente das enzimas endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biodiversidade do solo como fonte de microrganismos de interesse industrial**

A biodiversidade é definida como a variedade e variabilidade entre organismos vivos e os complexos ecológicos em uma dada área e compreende a diversidade de espécies, a diversidade genética e a diversidade de ecossistemas. Os microrganismos apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996).

O Brasil tem a maior diversidade biológica do planeta, em uma variedade de solos e biomas que representam vastos recursos a serem pesquisados em tempo hábil, visto que sua erosão genética está acontecendo em ritmo acelerado. A escassez de informações se torna mais evidente quando se trata da biodiversidade (riqueza de espécies) em níveis local, regional e entre comunidades, assim como sobre os efeitos da composição florística e das diversas características dos solos. Elas são fundamentais não só para o manejo apropriado do solo para qualquer fim, mas também para a avaliação do impacto dos diversos tipos de atividade humana (MOREIRA & CARES, 2009).

Considerando que atualmente são conhecidas mais de 10 milhões de espécies em cerca de 140 filos dos três domínios da vida (Eucarya, Bacteria e Archaea), estima-se que o número de espécies no solo - um dos ecossistemas com maior biodiversidade do planeta - seja pelo menos na casa dos milhões. Portanto há a necessidade de descobrir a parte desconhecida da biodiversidade do solo, sejam os microrganismos não cultiváveis, sejam aqueles cujos habitats ainda não foram estudados ou ainda os inúmeros espécimes depositados em coleções que aguardam identificação (MOREIRA, 2009).

Os microrganismos presentes no solo possuem representantes de todos os grupos como bactérias, fungos e vírus, e estes atuam de forma fundamental nos processos que afetam funções do ecossistema (AZEVEDO et al., 2010). Tamanha importância é verificada quando estima-se que 80% das reações que ocorrem no solo envolvem a atividade microbiana. Dentre os grupos de microrganismos comumente presentes no solo, os fungos representam grande parte da biomassa microbiana, atuando como decompositores de substratos complexos e participando de ciclos naturais (carbono, nitrogênio e fósforo), representando até 90% da produtividade primária líquida desses elementos na maioria dos ecossistemas terrestres (BELL et al., 2009; JOERGENSEN; WICHERN, 2008; PAUL, 2015).

A presença e a habilidade da sobrevivência dos fungos no solo ocorrem por estes apresentarem características específicas, como tolerância às condições ambientais adversas

como variações de temperatura, tolerância à fungicidas naturais, metais pesados e também ao rápido crescimento micelial, à produção de esporos e à produção enzimática (AZEVEDO et al., 2010). Os fungos podem atuar degradando a matéria orgânica presente no solo, sendo os chamados saprófitas e além disso podem se desenvolver em relações de mutualismo, como as micorrizas que são associações de fungos e raízes de diversas plantas (PFENNING; ABREU, 2006).

Os gêneros mais comuns de fungos filamentosos encontrados no solo são: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007). Ambos os gêneros encontrados em solo são empregados em processos biotecnológicos, devido à produção de enzimas, aos antibióticos, ácidos orgânicos e a outros compostos de aplicação industrial (PAUL, 2015; SCHUSTER et al., 2002).

## **2.2 Biotecnologia de enzimas microbianas**

As enzimas são biomoléculas dotadas de capacidade catalítica e são formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Tais biomoléculas atuam na redução da energia de ativação de reações químicas específicas, aumentando a velocidade de sua ocorrência e gerando com maior rapidez o produto da reação (LENINGHER, 2006). A atividade enzimática é diretamente relacionada com a estrutura protéica da qual a enzima é composta. São catalisadores biológicos dotados de alta especificidade ao seu substrato e cuja atividade catalítica apresenta dependência direta de fatores como a temperatura, o pH, a concentração de substratos e a presença ou ausência de inibidores e cofatores enzimáticos (CAMPBELL, 2000).

Grande parte das enzimas utilizadas na indústria são obtidas a partir do cultivo de microrganismos em processos fermentativos (RAO et al., 1998) e os bioprocessos industriais catalisados enzimaticamente demonstram menor impacto ambiental e uma redução no consumo energético, principalmente devido a sua elevada especificidade. Outro aspecto positivo da utilização enzimática é a substituição de produtos químicos por processos enzimáticos, uma vez que compostos de elevada acidez, alcalinidade e toxicidade acabam por causar danos ambientais e gastos materiais (MITCHEL; BEROVICH; KRIEGER, 2000).

Apesar de sua importância, a capacidade enzimática dos microrganismos ainda não foi avaliada, sendo que apenas 2% de bactérias e 5% dos fungos foram avaliados e detectados como produtores de moléculas de interesse humano (SILVA; FRANCO; GOMES, 1997). São diversos microrganismos utilizados industrialmente, tais como as bactérias, leveduras e fungos

filamentosos que são responsáveis pela produção de diversos compostos tais como álcool, ácidos orgânicos, fármacos, aditivos alimentares, enzimas dentre outros (SOARES et al., 2010).

### **2.3 Seleção de fungos com aplicação industrial**

A identificação de espécies de microrganismos que apresentam a produção de moléculas de interesse e que não produzem compostos tóxicos é extremamente relevante, pois auxilia a garantir a demanda industrial de diversos biocompostos e abre margem para possíveis descobertas de microrganismos desconhecidos. (ALVES et al., 2002). As enzimas microbianas em específico se diferenciam e se destacam em relação a outros organismos em função das vantagens que apresentam: amplo espectro de atuação, alta especificidade ao substrato, possibilidade de manipulações genéticas, baixo custo de produção, facilidade de produção em escala industrial, além de se apresentarem como um recurso renovável (OLIVEIRA et al., 2006; PASTORE, 2002). Para a produção em larga escala de enzimas é indicado a seleção de microrganismos produtores do composto de interesse, além de promover a otimização das condições de produção enzimática atuando sobre a composição do meio de cultivo, o substrato utilizado, a temperatura de fermentação, o pH do meio, agitação, aeração, dentre outros fatores (SCHMIDEL et al., 2011; THIRY; CINGOLANI, 2002).

Segundo Schimidel et al. (2001), os microrganismos utilizados em operações de fermentação industrial devem possuir algumas características: apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto, permitir o acúmulo do produto de interesse no meio de cultivo, de forma a se obter um caldo fermentado com elevada concentração do composto de interesse; não produzir substâncias incompatíveis com o produto; apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico; não ser patogênico; não exigir condições de processo muito complexas; não exigir meios de cultura dispendiosos e permitir a rápida liberação de produto para o meio. Todas as características citadas são desejáveis pois auxiliam na viabilidade financeira e eficiência do processo fermentativo.

A produção industrial de enzimas é dividida basicamente em duas etapas: o processo fermentativo, que visa estimular a produção do composto de interesse por indução, e o processo de separação e purificação, com o fim de obter somente o composto de interesse (RODARTE, 2005).

A fermentação realizada em escala industrial é realizada nas condições otimizadas de produção do composto de interesse. Além de um armazenamento adequado do isolado de interesse, o meio de cultura utilizado é crucial para a produção de enzimas, e de maneira geral contém em sua composição uma ou mais fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento

e micronutrientes. Schmidell (2001) salienta as características que devem ser consideradas na utilização de meios de cultivo: ser o mais barato possível, atender as necessidades nutricionais do microrganismo; auxiliar no controle do processo; não interferir na recuperação do produto; os componentes devem permitir algum tipo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo; ter composição razoavelmente fixa e não causar dificuldades no tratamento do efluente final.

O processo de separação e recuperação depende do tipo de enzima de interesse, e difere se sua presença é intracelular ou extracelular. No caso de enzimas extracelulares, o processo de recuperação se inicia no líquido fermentado ou, no caso de fermentações em meio sólido, no líquido de extraído do substrato. Já para as enzimas intracelulares é necessário aplicar algum método de ruptura celular a fim de liberar as enzimas. Em todas as etapas de separação e recuperação das enzimas é necessário manter condições não desnaturantes, ou seja, condições nas quais as enzimas não perderão atividade. As exoenzimas, aquelas produzidas e secretadas pela célula, possuem grande interesse comercial, pois sua extração e purificação são menos onerosas (Marquart et al., 2002). Para produzir comercialmente uma enzima, torna-se necessário fazer seleção de microrganismos produtores e otimizar as condições de fermentação para alcançar rentabilidade e eficiência do processo (Schmid et al., 2001 e Koeller & Wong, 2001).

## **2.4 Processos Fermentativos**

Existem dois tipos básicos de fermentação para a obtenção de enzimas: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). A fermentação submersa tem sido amplamente utilizada nos processos industriais de obtenção enzimática (Papagiani et al., 1999), e é beneficiada pela instrumentação e pelo controle de processo. Neste tipo de fermentação, tanto a recuperação enzimática quanto a determinação da biomassa são menos complexas, sendo realizadas por operações de filtração ou centrifugação para remoção das células (Sant Anna Jr., 2001). Já a fermentação em estado sólido é definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência (ou em níveis baixos) de água livre, podendo ser empregados substratos naturais. A mínima quantidade de água permite a obtenção de metabólitos mais concentrados, diminuindo o tempo e o custo do processo de recuperação da enzima (Pandey et al., 2000). Para efeitos comparativos entre os tipos de fermentação, as principais diferenças e características de cada tipo levantadas pela literatura constam na Tabela 1:

Tabela 1 - Comparação das características entre FS e FES

FS	FES
Disponibilidade de tecnologias de monitoramento de variáveis chave do processo fermentativo	Maior dificuldade no controle do processo
Altas concentrações de substrato podem vir a acarretar problemas reológicos no sistema	Extrato obtido menos diluído, com alta concentração do composto de interesse
Maior demanda energética para esterilização e remoção do composto de interesse do caldo fermentado	Escassez de informações referentes a fenômenos de transporte, cinética e produção enzimática
O alto teor de água facilita o controle de temperatura do meio, o que auxilia na menor desnaturação/degradação de produtos termolábeis	Menor susceptibilidade de contaminação, dado o baixo teor de água livre
Processo de purificação é facilitado pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato	Maior dificuldade de utilização de microrganismos aptos a crescer sob tais condições de crescimento
Processo difusionais são facilitados por conta do caráter homogêneo do sistema	Resíduos líquidos gerados em baixos volumes

Após o período fermentativo, tem-se as etapas de separação e purificação, como já mencionado. Majoritariamente o caldo fermentado é processado para recuperação das enzimas ou da massa celular, que em seguida é purificado até o grau desejado. A finalidade de utilização e comercialização da enzima é que irá determinar o seu grau de purificação final, uma vez que os processos de purificação são mais caros. É fundamental considerar que qualquer técnica de recuperação e purificação empregada deve, além de permitir recuperar a enzima em sua forma mais pura, proporcionar a obtenção na forma ativa, ou seja, a enzima não pode perder sua atividade (Sant Anna Jr., 2001).

## 2.5 Enzimas de interesse industrial

### 2.5.1 Amilases

O amido é polissacarídeo de alto peso molecular formado principalmente por dois compostos: a amilose e a amilopectina. A primeira é constituída por monômeros de  $\alpha$ -D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, e a amilopectina apresenta uma estrutura altamente ramificada

apresentando ligações  $\alpha$ -1,4 e as ramificações apresentam ligações  $\alpha$ -1,6. Usualmente, considera-se que o amido apresenta 25% de amilose e 75% de amilopectina, contudo o conteúdo desses polímeros pode sofrer alterações dependendo da fonte do amido (AGUERO, 1998).

As amilases atuam na quebra das ligações dos polímeros que compõe o amido, de forma a liberar dextrinas e monômeros de glicose livres. Tal característica se mostra útil na indústria de alimentos, principalmente promovendo a hidrólise nas indústrias de processamento de amido (PANDEY et. al., 2005).

### 2.5.2 Pectinases

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular, formadoras do maior componente da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores (ALKORTA et al., 1998).

As enzimas pectinolíticas são enzimas capazes de catalisar reações com pectinas, seja desesterificando ou hidrolisando a estrutura da pectina, e apresentam aplicações no amadurecimento de frutos, clarificação e redução de viscosidade de sucos de frutas, tratamento de resíduos vegetais, extração de polpa de tomate, tratamento preliminar do suco da uva para indústrias produtoras de vinhos, dentre outras aplicações (UENOJO e PASTORE, 2007).

### 2.5.3 Proteases

As enzimas proteolíticas são enzimas que promovem, na presença de água, a hidrólise das ligações peptídicas. Assim, sua ação se baseia na catálise de reações de quebra das ligações em uma proteína, acarretando transferência de componentes do substrato para a água. (WHITAKER, 1994).

As proteases bacterianas e fúngicas são estudadas devido ao seu potencial biotecnológico na indústria, visto que as proteases microbianas alcalinas dominam o mercado mundial de enzimas, sendo amplamente utilizadas principalmente na indústria de detergentes (BARRETT, 1994).

As enzimas proteolíticas oriundas de fungos são classificadas com base no pH de atividade enzimática, podendo ser ácida, neutra ou alcalina. As proteases ácidas e neutras produzidas por *Aspergillus* são utilizadas na produção de bebidas e no processo de panificação (YANG et. al., 1997).

### 2.5.4 Lipases

As lipases são enzimas definidas como hidrolases de ésteres contendo ácidos graxos de cadeia longa, saturados ou insaturados, com doze ou mais átomos de carbono (COELHO et. al., 2001). As lipases atuam de forma única em substratos insolúveis em água na interface água-óleo ou óleo-água de soluções emulsionadas (MACEDO et. al., 1997).

As principais fontes de enzimas lipolíticas para aplicação industrial são microrganismos, embora sejam também encontrados em organismos vegetais e animais. As enzimas microbianas levam vantagem em decorrência de sua versatilidade e a possibilidade de produção em larga escala (Castro et. al., 2004).

As lipases microbianas possuem ampla aplicação na indústria, atuando principalmente nos setores de: alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos têxteis e fabricas de papel (SHARMA et. al., 2001; PELIZER et. al., 2007).

## **2.6 Celulose e enzimas do complexo celulolítico**

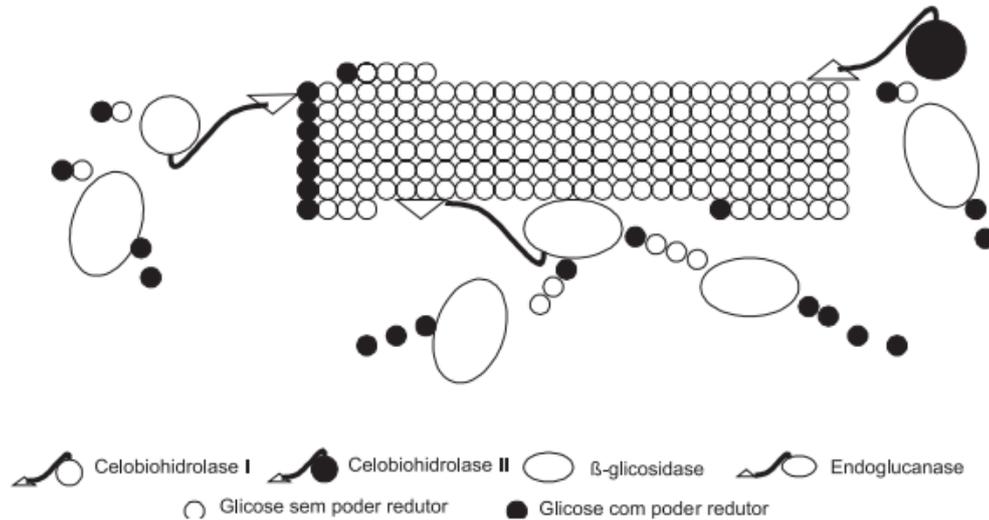
A celulose é um polissacarídeo encontrado de forma abundante na natureza, sendo encontrado na composição da parede celular de plantas. É composta basicamente, por uniões de glicose através de ligações  $\beta - 1,4$  formando imensas cadeias lineares de elevado peso molecular (GIGER-REVERDIN, 1995; KLEMM et al., 2005). A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas, que possuem alto grau de ordenação o confere elevada resistência ao rompimento por produtos químicos, e regiões amorfas, menos ordenadas. Essas regiões amorfas permitem que parte da estrutura da celulose apresente a capacidade de inchar quando submetidas a processos de hidratação, o que resulta na formação de microporos e cavidades que permitem a difusão de moléculas grandes, como é o caso das enzimas (FAN; LEE; BEARDMORE, 1980).

O grau de cristalinidade das fibras de celulose influencia diretamente na hidrólise enzimática, uma vez que a presença ou ausência de compostos associados à matriz celulósica pode atuar facilitando, dificultando ou até mesmo impossibilitando a ação catalítica do complexo enzimático (MARCHESSAULT; SUNDARARAJAN, 1993; SOEST, 1994).

Segundo Wulff (2006), a degradação da celulose é possibilitada pela ação de um complexo enzimático, composto de três tipos de enzimas do complexo celulolítico que atuam de forma conjunta na matriz celulósica acarretando sua degradação. As endoglucanases (EG) são enzimas que exercem sua atividade catalítica de maneira randômica sobre a matriz celulósica na hidrólise interna das ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas. As celobiohidrolases (CBH) são conhecidas como exoglucanases, ou avicelases e atuam também nas ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias (CBH I) e também das extremidades redutoras (CBH II). As  $\beta$ -glicosidases catalisam a hidrólise de  $\beta$ -D-glicose terminais não redutores liberando glicose. A atuação sinérgica das enzimas se dá da seguinte forma: as EG clivam a estrutura celulósica randomicamente, e produzem sítios ativados para a atividade das CBH que atuam na região terminal não-redutora da celulose e libera celobiose,

que são clivadas pelas  $\beta$ -glicosidaszes em glicose, que pode então ser utilizada em diversas fases do metabolismo microbiano (CAO; TAN, 2002).

Figura 1 - Esquema da ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Castro, 2010.

## 2.7 Celulases e sua aplicação industrial

Atualmente, em decorrência da grande exploração de combustíveis fósseis e dos impactos deste no meio ambiente tem-se buscado novas alternativas para a geração de energia, principalmente fontes renováveis. A biomassa vem sendo estudada como forma de se obter energia, uma vez que é obtida em grande quantidade e pode completar outras fontes renováveis de energia, e também auxiliar positivamente no desenvolvimento sustentável (XING-HUA et al., 2009). A biomassa vegetal é resultante da atividade fotossintética das plantas, e somando-se toda a biomassa terrestre tem-se uma energia armazenada similar àquela contidas nas reservas petrolíferas (LISCHINE, 1995; COUGHLAN, 1985). A matriz celulósica contida na biomassa agrícola apresenta grande potencial de conversão em etanol combustível através da fermentação, gerando etanol de segunda geração que é alvo de diversas pesquisas buscando tanto microrganismos produtores de complexos enzimáticos capazes de realizar tal conversão, quanto propor metodologias de tratamento da matriz para aumentar a eficiência da atividade catalítica, uma vez que os componentes da fibra celulósica é fortemente estruturada.

Na indústria alimentícia as celulases são utilizadas nos processos de extração e clarificação de sucos de frutas, na produção de néctares de frutas e na extração de óleo. São ainda utilizadas em processos de extração de carotenoides com o fim de utilização como corantes na indústria de alimentos (CINAR, 2005). Celulases são adicionadas ao malte na

fabricação de cerveja visando melhorá-lo para a produção (GALANTE; CONTI; MONTEVERDI, 1999). No setor de vinhos, os atributos de coloração e maceração dos frutos são melhorados através da adição de enzimas. São ainda utilizadas em outros segmentos industriais, como a indústria têxtil, papel e celulose, detergentes dentre outros segmentos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos situado no Departamento de Ciência dos Alimentos, no campus da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

#### 3.2 Obtenção dos isolados

Os microrganismos utilizados no presente estudo foram obtidos através de cinco amostras de solo de canga, durante o período chuvoso, localizada no município de Nova Lima, estando na região denominada Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil.

#### 3.3 Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Na realização do isolamento dos fungos presentes nas amostras de solo foi utilizada a técnica de diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), na qual foram pesadas 10,0 g do solo sendo adicionado a este 90,0 mL de solução salina a 0,85 %. Os meios de cultura utilizados para inoculação das amostras de solo diluídas foram os meios DRBC (Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) e DG18 (Ágar Dicloran Glicerol). O primeiro é composto por: 1,0 mL de Dicloran; 5,0 de peptona bacteriológica; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 220 g de glicerol; 15,0 g de ágar; 1 mg de cloranfenicol; 1000 mL de água destilada. Enquanto o segundo possui em sua composição 10,0 g de glicose; 5,0 de peptona bacteriológica; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 mL de solução 5% de Rosa Bengala; 1,0 mL de Dicloran; 1000 mL de Água Destilada; 15,0 g de ágar; 1 mg de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25 °C, por um período de cinco dias.

Após o período de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), a fim de estimar o número de fungos filamentosos a cada grama de amostra.

#### 3.4 Purificação dos isolados e identificação polifásica

As colônias com características macroscópicas similares às de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram purificadas em meio de cultivo MA (Ágar Extrato de Malte) que é composto de 20,0 g de extrato de malte; 15,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada e, posteriormente inoculadas em meios de cultivo e temperaturas padronizados, de acordo com manuais de identificação Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, e Pitt (2000) para o gênero *Penicillium*.

Os isolados pertencentes aos gêneros citados anteriormente foram inoculados em meios de cultivo padronizados, conforme mencionado na literatura, CYA a 25°C e 37°C, MEA a 25°C.

Após a inoculação, estes foram incubados em estufa tipo BOD por sete dias. Para a caracterização microscópica foram confeccionadas lâminas a partir de colônias puras do meio de cultivo MEA, em que foram avaliados: ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das métulas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios. Para características macroscópicas avaliou-se: diâmetro da colônia, cor, micélio, presença ou ausência de exsudato, cor do reverso, presença ou ausência de pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios. Os manuais utilizados foram de Pitt (2000), Klich (2000) e Pitt e Hocking (1997).

### **3.5 Metodologia qualitativa**

Visando avaliar qualitativamente a produção enzimática, os microrganismos já identificados foram inoculados em meio MA 2% (20 g de malte, 20 g de Agar e 1 litro de água destilada) e incubados em estufa BOD à 25°C por sete dias. Após o período de incubação os microrganismos foram repicados para o centro de placas com meio de cultivo específico para produção de enzimas celulases. O meio de cultivo utilizado para o teste enzimático de celulases foi proposto por Dingle, Teid e Solomons (1953).

### **3.6 Teste enzimático de celulases**

Na verificação da produção enzimática de celulases, utilizou-se o meio de cultivo composto por 1% de CMC e 1,8% de ágar diluídos em 500 mL de tampão acetato de sódio (pH=5,0).

A carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL do tampão acetato de sódio e em seguida o restante do tampão foi adicionado, e por fim o ágar. O meio de cultura foi homogeneizado e esterilizado em autoclave, a 121°C por 15 minutos. Foi utilizada uma solução reveladora à base de iodo, a fim de evidenciar a atividade celulolítica, uma vez que a produção de celulases é indicada pela formação de halo claro ao entorno da colônia, indício da degradação do substrato (Kasana et al, 2008).

#### **3.6.1 Índice enzimático**

O índice enzimático é um parâmetro semiquantitativo que relaciona o tamanho da colônia com o tamanho do halo de degradação do substrato (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) pela fórmula:

$$I. E = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Através da relação, maiores valores de I.E indicam maiores produção de enzimas celulases.

### **3.6.2 Análise estatística**

O teste foi realizado em triplicata por isolado, sendo que cada repetição é representada por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância no software Chemoface. As médias do teste para cada isolado foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

## **3.7 Metodologia quantitativa**

### **3.7.1 Indutor**

O indutor utilizado no presente estudo foi preparado a partir da casca de uvas viníferas. Estas foram secas em estufa a 65°C por 24 horas, e então trituradas com a utilização de almofariz e pistilo. O produto da trituração foi separado pelo uso de uma peneira de Mesh 20.

### **3.7.2 Fermentação submersa (FS)**

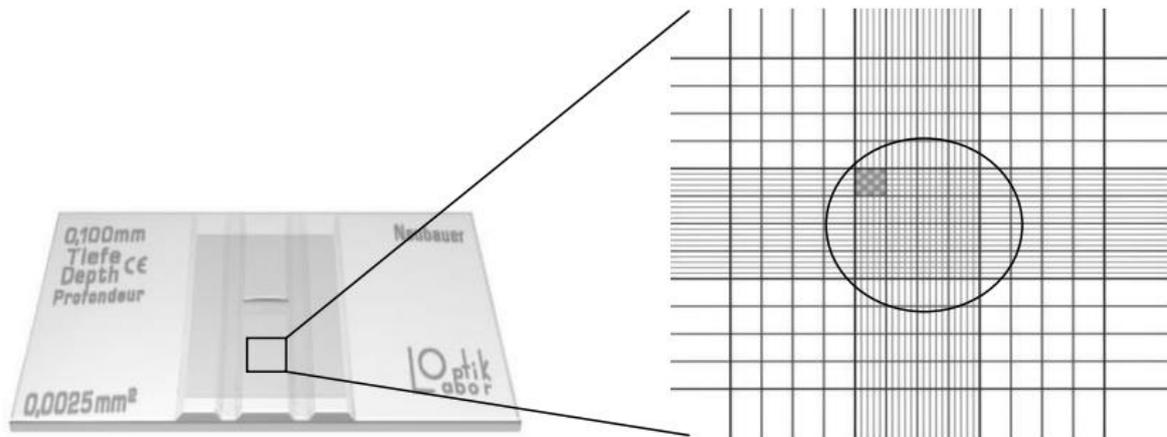
A fermentação foi realizada em meio mínimo cuja composição é descrita por Pontecorvo et. al (1953): NaNO<sub>3</sub> 0,6%, KCl 0,05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15%, ZnSO<sub>4</sub> 0,001%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25%, Extrato de levedura 0,25% e 1% da fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 1M.

A fonte de carbono utilizada foi o indutor já citado anteriormente, composto da farinha da casca de uvas viníferas. O meio de cultura foi colocado em erlenmeyers de 250 mL e cada um recebeu 200 mL de meio mínimo. A incubação ocorreu durante 120 horas, em estufa tipo Shaker sob a temperatura de 30±1°C com agitação constante de 120 rpm.

### **3.7.3 Inóculo**

O microrganismo foi inoculado em meio MA 2% e incubado por 7 dias a 25°C. Após a incubação, a placa foi inundada por 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,1% e com o auxílio de uma alça de drygalski foi feita a raspagem das colônias, visando remover os esporos. A partir da solução de esporos obtida, foi realizada a contagem de esporos e as diluições necessárias para atingir os valores de interesse, que no caso deste estudo é 10<sup>7</sup>esporos/mL. A contagem foi realizada com a utilização da câmara de Neubauer, como na figura 2. Cada erlenmeyer recebeu uma mL da suspensão de esporos..

Figura 2 – Representação da Câmara de Neubauer.



Fonte: Castro, 2010.

### 3.7.4 Atividade celulolítica

Após a fermentação, foi retirado 20 mL de meio de cultura e levado à uma centrífuga refrigerada a 4°C, para que não haja degradação das enzimas durante a operação. O sobrenadante é retirado, e é considerado o extrato bruto que possui as enzimas de interesse. Os extratos retirados foram colocados em eppendorfs e congelados para posterior análise da atividade enzimática.

### 3.7.5 Atividade de endoglucanase

A avaliação de atividade das endoglucanases foi realizada por método espectrofotométrico utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para dosagem de açúcares redutores liberados durante a atividade catalítica. O substrato utilizado na análise foi a CMC, onde foram homogeneizados 250 µL de CMC e 250 µL de sobrenadante enzimático (extrato bruto) em tubos de ensaio que foram aquecidos a 50°C por dez minutos. Em seguida, colocou-se 500 µL de DNS e os tubos foram imersos em água fervente por cinco minutos. Por fim, a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm contra o branco (250 µL de tampão, 250 µL de sobrenadante e 500 µL de DNS). As leituras foram realizadas em triplicata e cada leitura foi subtraída da leitura do controle. A concentração de endoglucanases foi calculada pela fórmula abaixo:

$$[\text{Enzima}] = \frac{\text{Diluição} \cdot \text{Abs.} \cdot \text{Fator} \cdot \text{Volume ensaio}}{\text{Tempo} \cdot \text{Volume sobrenadante}}$$

O fator contido na equação é obtido através da curva de calibração do reagente DNS utilizando a glicose como padrão.

### 3.7.6 Atividade de $\beta$ -glicosidase

A avaliação de atividade das  $\beta$ -glicosidase foi realizada por método espectrofotométrico utilizando o carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). O substrato utilizado na análise foi o p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopiranoside (PNP-g), onde foram homogeneizados 200  $\mu\text{L}$  de tampão, 650  $\mu\text{L}$  de água destilada e 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante enzimático em tubos de ensaio que foram aquecidos a  $45^\circ\text{C}$  por cinco minutos. Em seguida, colocou-se 100  $\mu\text{L}$  de PNP-g e os tubos foram novamente aquecidos a  $45^\circ\text{C}$  por dez minutos, e logo foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução de 1M de carbonato de sódio. Por fim, a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 400 nm contra o branco (300  $\mu\text{L}$  de tampão, 650  $\mu\text{L}$  de água destilada, 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante enzimático e 500  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). As leituras foram realizadas em triplicata e cada leitura foi subtraída da leitura do controle. A concentração de  $\beta$ -glicosidase foi calculada pela fórmula abaixo:

$$[\text{Enzima}] = \frac{\text{Diluição. Abs. Fator. Volume ensaio}}{\text{Tempo. Volume sobrenadante}}$$

O fator contido na equação é obtido através da curva de calibração do reagente DNS utilizando a glicose como padrão. A unidade da concentração de  $\beta$ -glicosidase corresponde à atividade em em UI/mL que se dá pela quantidade de PNP liberada em  $\mu\text{mol}$  por mL de enzima em um minuto.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Contagem de unidades formadoras de colônias totais (UFC) e isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* identificados

A contagem de fungos totais foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placa.

Tabela 2 – Determinação da população fúngica (UFC/g) nas amostras analisadas

AMOSTRA	DG18 (UFC/g)	DRBC (UFC/g)
---------	-----------------	-----------------

<b>CG 1</b>	1,3 10 <sup>4</sup>	1,23. 10 <sup>4</sup>
<b>CG 2</b>	1,08.10 <sup>4</sup>	1,02.10 <sup>4</sup>
<b>CG 3</b>	1,09.10 <sup>4</sup>	0,99.10 <sup>4</sup>
<b>CG 4</b>	1,15.10 <sup>4</sup>	1,21.10 <sup>4</sup>
<b>CG 5</b>	1,17.10 <sup>4</sup>	1,15.10 <sup>4</sup>
<b>Média</b>	1,16.10 <sup>4</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>

Além da escolha adequada do método de análise da diversidade de fungos de solo (no caso do presente estudo a diluição em placa), a escolha do meio de cultura é muito importante para priorizar o crescimento das espécies de interesse. Meios com atividade de água alta favorecem espécies de rápido crescimento, como a maioria das espécies de *Aspergillus* (HOCKING; PITT, 1980; SAMSON et al., 1996). A presença de um agente antifúngico no meio DRBC, no caso o dicloran, pode ter influenciado nos resultados do gênero *Aspergillus*, visto que Douglas King e colaboradores (1979) verificaram que em altas concentrações (~5 µg) pode ocorrer a inibição do crescimento de *A. niger*. No presente estudo foi adotada uma concentração menor do citado antif (2 µg) para controle de outras espécies contaminantes que poderiam comprometer a avaliação dos fungos de interesse.

As principais características do solo avaliado de áreas de Canga são: riqueza em matéria orgânica, baixo pH o que favorece o desenvolvimento fúngico em detrimento de bactérias e outros microrganismos, diminuindo assim a competição espacial e nutricional, além de uma concentração elevada de ferro.

O gênero *Penicillium* apresentou prevalência com relação ao número de espécies identificadas, ao compararmos com *Aspergillus*. Dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, as espécies identificadas foram: *Aspergillus niger Agregado*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*. Dos 104 isolados do gênero, o fungo *Aspergillus parasiticus* representou 66% das espécies identificadas.

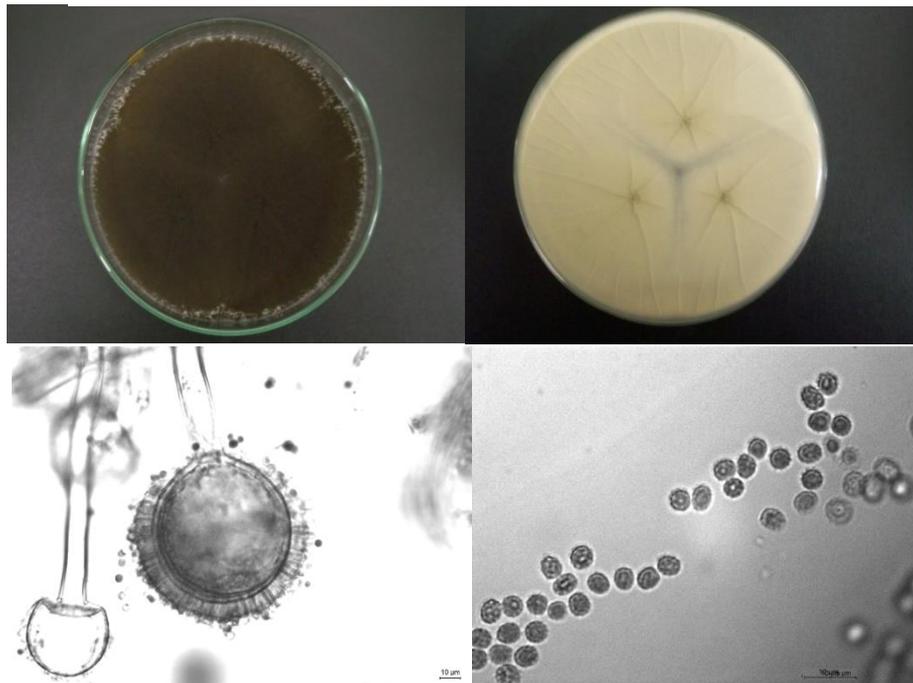
No que diz respeito aos isolados do gênero *Penicillium*, as espécies identificadas foram: *Penicillium restrictum*, *Penicillium bilaiae*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium multicolor*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium simplicissimum*. Dentre os 217 isolados apenas 23% foram identificados, e destes, 47% destes pertencem à espécie *Penicillium decumbens*. Os demais isolados não identificados foram agrupados por suas características macro e micromorfológicas.

Diversos estudos contidos na literatura, os quais avaliaram fungos de solos cultivados apresentaram tal prevalência do gênero. Oliveira e colaboradores (2013) avaliaram a

diversidade de fungos do solo no semiárido e encontraram 85 espécies, sendo 28 de *Penicillium* e 18 de *Aspergillus*. Souza (2010), trabalhando com solos da Mata Atlântica, obteve 29 espécies de *Penicillium* e seis de *Aspergillus*. Puangsombat e colegas (2010) analisaram cinco tipos de solos da Tailândia e encontraram nove espécies de *Aspergillus* e 27 de *Penicillium*. Solos de área de mangue também foram estudados e determinaram que *Penicillium* e *Aspergillus* são os gêneros dominantes com 21 e 11 espécies, respectivamente (GOMES, 2016).

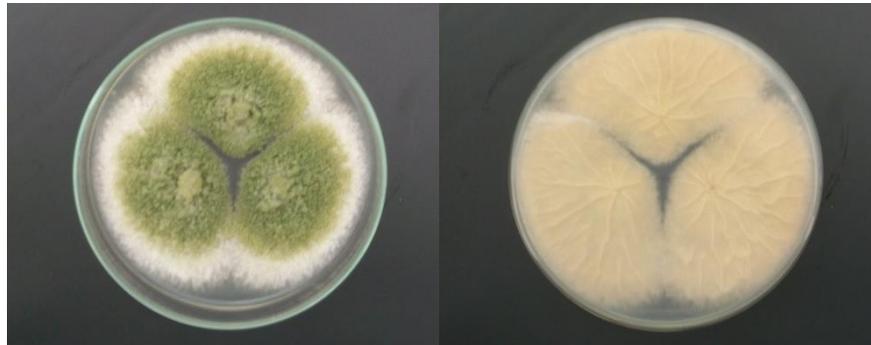
O gênero *Penicillium* contém saprófitas comuns, cuja micromorfologia dos conídios facilita a sua dispersão através da atmosfera e sua consequente propagação pelo ambiente. A predominância de *Penicillium* pode também estar relacionada ao antagonismo sobre outras espécies, seja através da produção de metabólitos secundários ou, mesmo indiretamente, por meio da competição nutricional, da produção elevada de esporos e da maior capacidade de crescimento em meios de cultivo (GOMEZ et al., 2007).

Figura 3 – Macro e micromorfologia de *Aspergillus aculeatus*



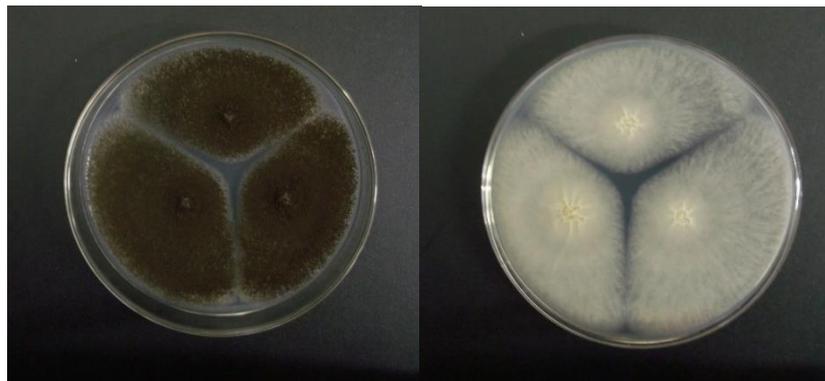
Fonte: Do autor (2019)

Figura 4 - Macromorfologia de *Aspergillus flavus*



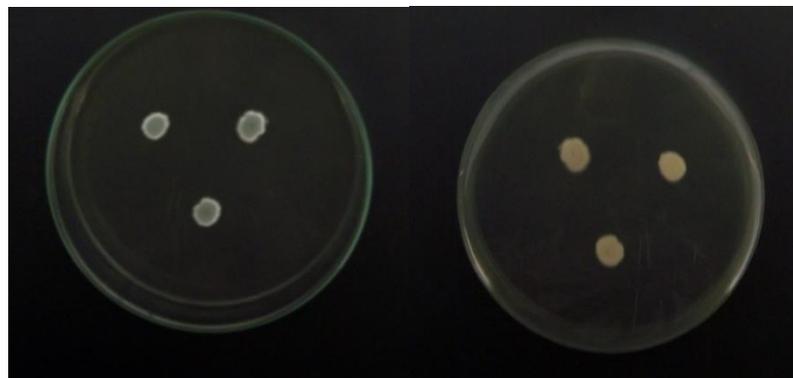
Fonte: Do autor (2019)

Figura 5 – Macromorfologia de *Aspergillus niger* Agregado

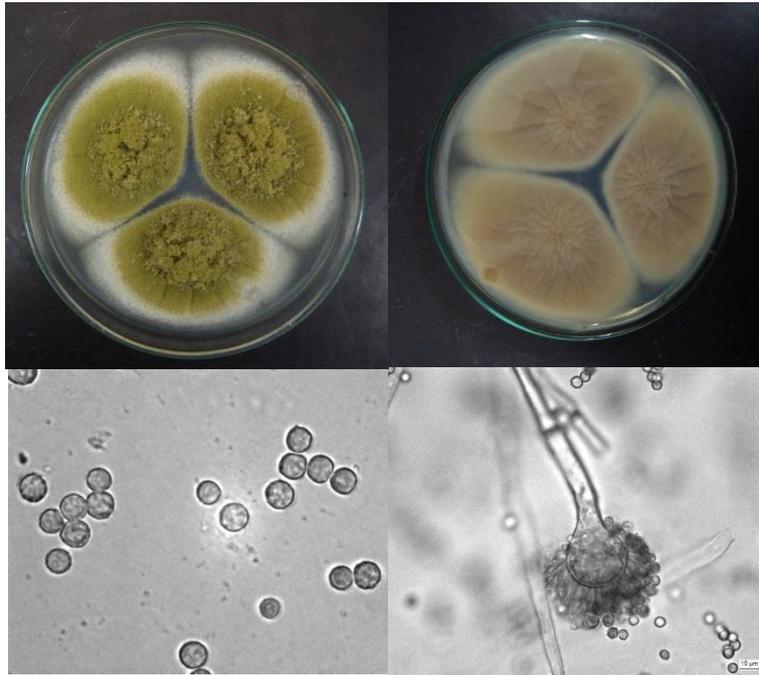


Fonte: Do autor (2019)

Figura 6 – Macromorfologia de *Penicillium restrictum*



Fonte: Do autor (2019)

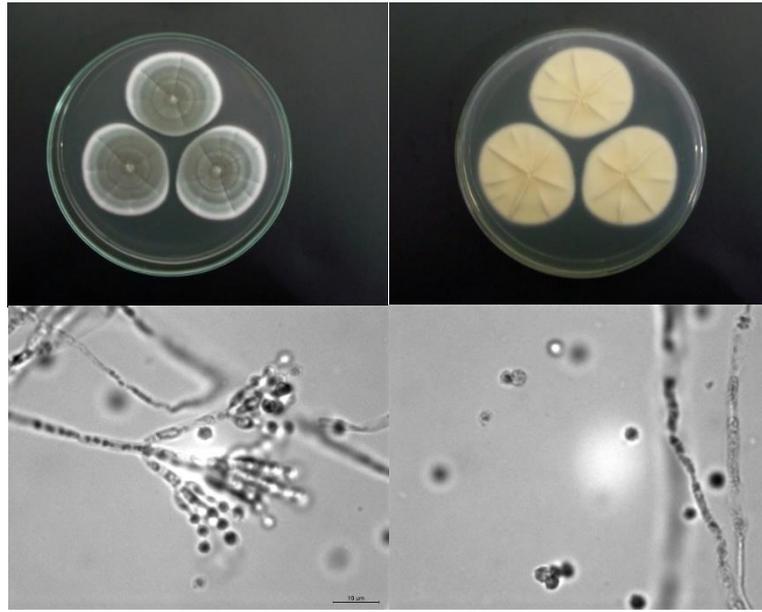
Figura 7 – Macro e micromorfologia de *Aspergillus parasiticus*

Fonte: Do autor (2019)

Figura 5 – Macro e micromorfologia de *Penicillium bilaiae*

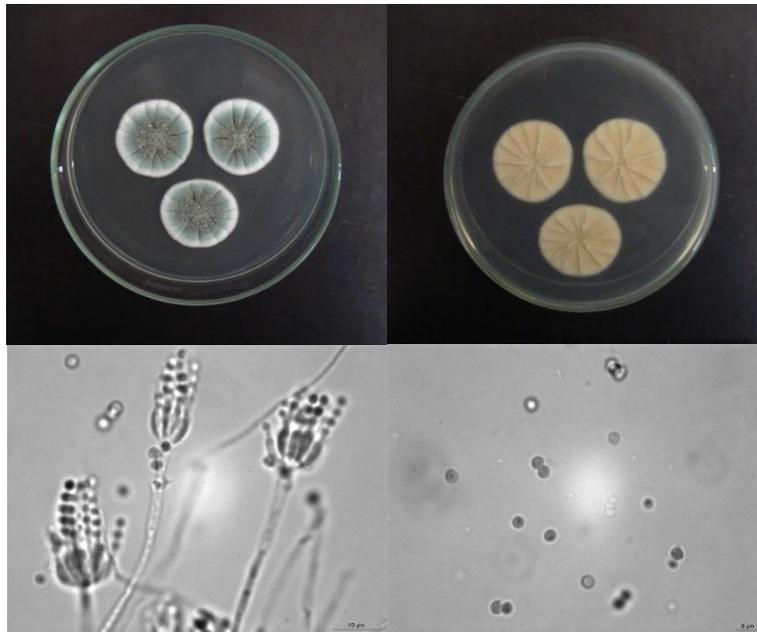
Fonte: Do autor (2019)

Figura 6 – Macro e micromorfologia de *Penicillium janthinellum*



Fonte: Do autor (2019)

Figura 10 – Macro e micromorfologia de *Penicillium decumbens*



Fonte: Do autor (2019)

#### 4.2 Potencial celulolítico dos isolados identificados

O resultado do teste qualitativo se encontra na Tabela 3, com os respectivos índices estatísticos que indicam a diferença entre os isolados, de forma que letras iguais indicam

diferenças não significativas, e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os índices enzimáticos dos isolados.

Tabela 3 Médias dos halos dos fungos produtores de celulasas

<b>Espécie</b>	<b>Índice Enzimático</b>
<i>A. parasiticus</i>	1,4 <sup>c</sup>
<i>P. janthinellum</i>	1,93 <sup>b</sup>
<i>P. simplicissimum</i>	1,2 <sup>d</sup>
<i>P. decumbens</i>	1,4 <sup>c</sup>
<i>P. brevicompactum</i>	1,71 <sup>b</sup>
<i>P. bilaiae</i>	2,27 <sup>a</sup>

Lealem e Gashe (1994) ao investigar produção qualitativa em meio sólido, estabeleceram que um fungo pode ser considerado um bom produtor de enzimas extracelulares o fungo que apresentar índice enzimático (IE) maior ou igual a dois. Assim sendo, o isolado identificado que se destacou com o maior IE foi *Penicillium bilaiae*.

As demais etapas descritas na seção de metodologia que sucederam a avaliação qualitativa, foram aplicadas somente ao isolado que apresentou destaque na produção qualitativa de celulasas.

Figura 11 – Halo de produção de celulasas por *P. janthinellum*



Fonte: Do autor (2019)

Figura 12 – Halo de produção de celulases por *A. parasiticus*

Fonte: Do autor (2019)

Avaliando outros trabalhos, encontra-se diferenças tanto na composição do meio de cultivo direcionado à produção de celulases quanto na solução reveladora do halo. O meio de cultivo utilizado no presente estudo é um meio pobre em minerais, tendo como principal componente a carboximetilcelulose que atua como a fonte exclusiva de carbono aos isolados, entretanto, outros trabalhos se utilizam de meios ricos em minerais e outros componentes. Ruegger e Tauk-Tornisielo (2008) utilizam um meio de cultivo com alguns minerais (Mg, Fe, K, Na, Ca, Cl) além de componentes como asparagina e extrato de levedura. A presença de íons metálicos no meio de cultura pode influenciar na atividade catalítica, exercendo desde efeitos inibitórios até efeitos de indução (Castro e Júnior, 2010).

Tabela 4 – Índices Enzimáticos encontrados na literatura e suas especificidades

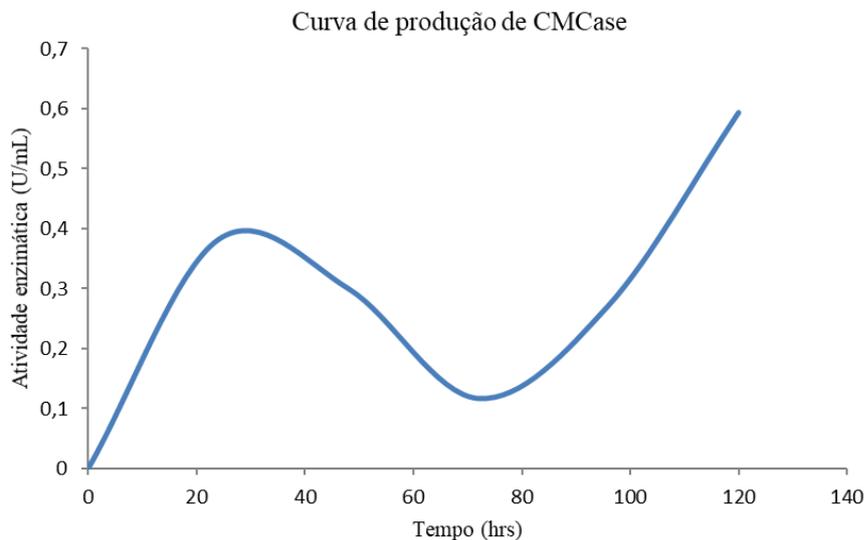
Autor	Fungo(s)	Composição meio de cultivo	Método revelador	IE
Monteiro, M. C. P., 2012	<i>Aspergillus sulphureus</i>	CMC, ágar, tampão acetato de sódio	KASANA, et al., 2008	3
Silva et al, 2011	<i>A. flavus</i>			1,35
	<i>P. chrysogenum</i>			1,94
	<i>P. decumbens</i>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> asparagina; KCl; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; CaCl <sub>2</sub> , extrato de leveduras CMC, ágar.	Teather RM, Wood PJ (1982)	1,64
	<i>P. janthinelum</i>			1
	<i>A. niger</i>			1,4
Ruegger, M. J. S; Tauk-Tornisielo, S. M., 2004	<i>P. janthinelum</i>			1,9
	<i>P. oxalicum</i>			4
	<i>P. simplicissimum</i>		1,4	
	<i>P. spinulosum</i>		1,7	
	<i>P. variabile</i>		1,8	

Vale ressaltar que não foram encontrados trabalhos visando avaliar o potencial enzimático do *Penicillium bilaiae*, o que dificulta a comparação entre o resultado do presente estudo com outras avaliações. Tal isolado tem sido amplamente estudado na solubilização de fosfato, e não o com o viés deste estudo.

#### 4.3 Produção quantitativa de celulases do isolado *Penicillium bilaiae*

No presente estudo foram avaliadas as produções de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases pela atividade metabólica do fungo *Penicillium bilaiae*. A figura abaixo apresenta o perfil de produção enzimática de endoglucanases:

Figura 137– Gráfico do perfil de atividade enzimática de endoglucanases



Com uma duração de 120 horas, a fermentação resultou na atividade máxima de endoglucanases no quinto dia de fermentação atingindo 0,59 U/mL. O perfil apresentado possui dois picos de atividade, sendo o maior obtido na última análise. Não é possível concluir se este é o pico máximo de atividade visto que o período avaliado se interrompe ao atingir 120 horas, a atividade máxima pode requerer um número maior de horas analisadas. Os autores citados abaixo obtiveram os seguintes resultados para a atividade de CMCase:

Tabela 5 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de endoglucanases por fungos. (continua)

Microrganismo	Fermentação	Substrato	U/mL	Autor
<i>A. niger</i>	Sólida/Submersa	BCA	1,36	CUNHA, 2012
<i>A. flavus</i>	Submersa	FT	1,4	GOMATHI, 2012

Tabela 6 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de endoglucanases por fungos. (conclusão)

<i>A. niger</i>	Submersa	FT	6,59	PEREIRA, 2013
<i>P. chrysogenum</i>	Semi-sólida	BC/PDC	0,294	JÚNIOR, 2014
<i>P. sp. FSDE15</i>	Submersa	BCA	1,0	ROCHA, 2016
<i>P. viridicatum</i>	Sólida	BCA	0,8	PINTO, 2010

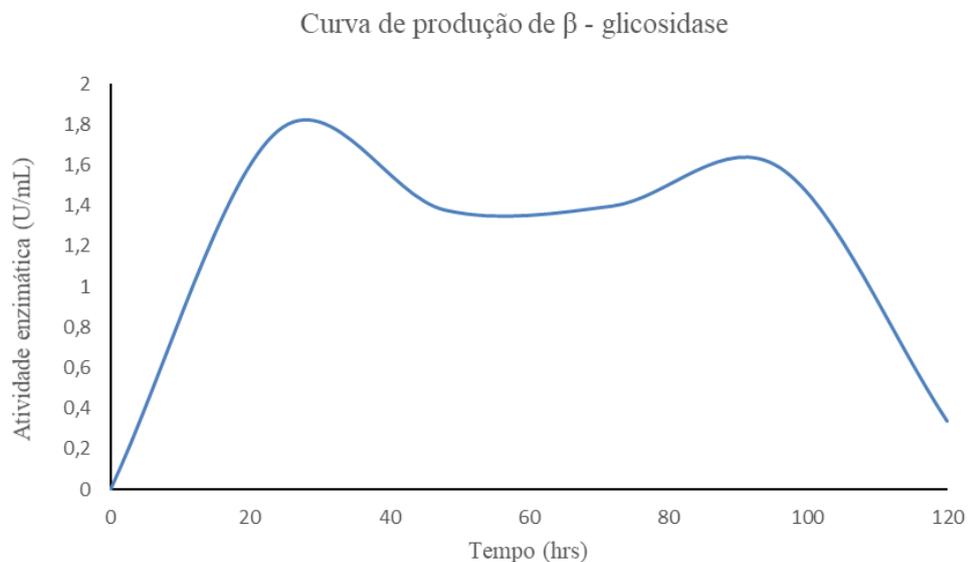
BCA: Bagaço de cana-de-açúcar; FT: Farelo de trigo; BC: bagaço de coco; PDC: Pedúnculo de cajú; M: Milhocina (resíduo do processamento do milho).

Além das diferenças dos atributos contidos na Tabela 5, outras variáveis diferem do presente trabalho, tais como, temperatura de fermentação, concentração do inóculo, tempo de fermentação, agitação, dentre outros fatores que interferem na produção enzimática.

Estudos de produção enzimática em meio líquido envolvendo o gênero *Penicillium* ainda são realizados em menor escala, uma vez que os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são amplamente estudados. Apesar disso, os fungos do gênero *Penicillium* apresentam grande potencial (JORGENSEN et al., 2003) o que deve justificar o crescimento em investigações envolvendo tal gênero.

No que diz respeito a avaliação quantitativa de produção de  $\beta$ -glicosidase a figura 16 apresenta o perfil da atividade enzimática da enzima em questão.

Figura 14 – Gráfico do perfil de atividade enzimática de  $\beta$  - glicosidase



Avaliando o resultado obtido através do gráfico verificamos que o pico de produção enzimática se deu entre 20 e 40 horas (1,77 U/mL), resultado oposto ao pico de endoglucanases visto que o pico foi verificado no último tempo avaliado (120 horas de fermentação). Alterações no meio de cultivo derivadas do metabolismo do próprio microrganismo, podem alterar as condições de cultivo ao longo do período fermentativo, influenciando na atividade enzimática. Cunningham e Kuiack (1992) demonstraram em seus estudos que os principais metabólitos ácidos secretados pelo *Penicillium bilaiae* foram os ácidos oxálico e cítrico. Tais metabólitos ácidos podem atuar acidificando o meio e atuando na atividade catalítica das enzimas, seja prejudicando ou favorecendo sua atividade. Shinghania et al. (2011) e Pereira (2013) constataram que a atividade de  $\beta$ -glicosidase é otimizada em pH mais ácido (5,5 < pH < 5), este último autor verificou resultado semelhante para CMCase.

Na literatura contida na Tabela 6, alguns trabalhos que avaliaram a enzima apresentaram diferenças quanto ao microrganismo utilizado, tipo de fermentação, duração do período fermentativo, além do substrato indutor. O que se observa comparando resultados de picos de atividade é que o isolado do presente trabalho apresenta maior produção enzimática comparando a algumas cepas específicas que já são conhecidos produtores de celulasas, indicando seu potencial.

Tabela 7 - Trabalhos da literatura que investigaram a produção de  $\beta$ -glicosidases

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>U/mL</b>	<b>Referência</b>
<i>A. niger</i>	PM	1,4	FANG, 2010
<i>Trichoderma reesei</i>	BC	0,3	FANG, 2010
<i>Penicillium. sp</i>	CMC	1,35	Santa-Rosa, P. S., et al, 2017.

BC: Bagaço de cana-de-açúcar; FT: Farelo de trigo; CMC: Carboximetilcelulose

Novamente vale salientar a escassez de trabalhos envolvendo o gênero *Penicillium* em investigações de potencial enzimático, como exposto na tabela, os gêneros mais comumente voltados à produção de celulasas são fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. Comparando o isolado avaliado no presente estudo s dada a falta de informações e trabalhos similares dificulta comparações, visto que o isolado é estudado com maior profundidade no processo de solubilização de fosfatos.

## 5 CONCLUSÕES

Dos gêneros de fungos mais comumente estudados na produção de enzimas, o gênero *Penicillium* é o menos investigado, e diante dos resultados apresentados no trabalho pode-se perceber que o gênero possui potenciais isolados para produção industrial de enzimas. O isolado *Penicillium bilaiae* apesar de ser usualmente associado à solubilização de fosfato, apresentou características interessantes quanto à produção enzimática, que abrem margem para futuras avaliações que busquem investigar tanto as condições ótimas de produção das celulases, quanto suas condições ideais de atividade.

Maiores estudos com a espécie devem ser realizados para sua aplicação na indústria de alimentos, de forma a garantir a sua não patogenicidade e nem a produção de compostos tóxicos ou que inviabilizem o processo de purificação do biocomposto de interesse, tornando o isolado em uma espécie viável para aplicações industriais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 225-230, July/Aug. 2002.
- AZEVEDO, E. et al. Biodiversity of filamentous fungi on soils and sands In: RAI, M.; KÖVICS, G. (Eds.). **Progress in Mycology**. New Pali: Scientific Publishers, 2010. p. 233–257.
- BELL, C. W. et al. Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan Desert grassland. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 4, p. 827–842, 2009.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulose on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.
- CASTRO, A. M; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulose na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 181 – 188, 2010.
- CINAR, I. Effects of cellulose and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 945-949, Feb 2005.
- CUNHA, F.M., ESPERANÇA, M.N., ZANGIROLAMI, T.C., BADINO, A.C., FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, 112, 270-274, 2012
- COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle Upon Tyne, v. 3, n. 1, p. 39-109, 1985.
- DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 4, p. 149-155, 1953.
- FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 22, p. 177-199, 1980.
- FANG, H., ZHAO, C., SONG, X.Y., Optimization of enzymatic hydrolysis of steamexploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulose from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**. 101, 4111-4119, 2010.
- GALANTE, Y. M.,CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK, C. P. (Ed). **Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 1998. V. 2, p. 327-342.

GASHE, B.A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. **Journal of Applied Bacteriology** 73:79-82.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** V.59 , n.2., p. 257–268., 1987.

GIGER-RIVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 303-315, Apr. 1991.

GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., KUMAR, D.G., RAVIKUMAR, G., KALAISELVI, M. UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S67-S73, 2012

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S L. The use of media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

JOERGENSEN, R. G.; WICHERN, F. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 40, n. 12, p. 2977–2991, 2008.

JÚNIOR, S. D. O. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 2014. 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Curr Microbiology**, v 57, p. 503 – 507, 2008.

KLEMM, D. et al. Cellulose, chemistry and application. **Angewandite Chemie Internation Edition**, Weinheim, v. 44, n. 12, p. 3358-3393, May 2005.

LEE, Y.M., LEE, H., KIM, G.H. Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes. **J. Microbiol. Methods** v. 86, n.1, p. 124–127, 2011.

LENINGHER; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, São Paulo: ArtMed, 6 ed, 2014.

LEVER, M.; **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-279, 1972.

MARCHESSAULT, R. H.; SUNDARARAJAN, P. R.; Cellulose, in the polysaccharides, New York: Academic, v. 2, p. 379, 1993.

MITCHEL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, New York, v. 68, n. 16, p. 61-138, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.

- OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out/dez. 2006.
- PAUL, E. A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4. ed. ed. London: Elsevier Academic Press, 2015.
- PASTORE, G. M. Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas. In: **Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática, Brasília**, 2002. Anais do Seminário Brasileiro de Biotecnologia enzimática Brasília: UnB, 2002.
- PEREIRA, D. E. P. Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. (Eds.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p. 184–205.
- PINTO, T. O. P. Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e Aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos.. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2010.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- ROCHA, J. C. Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium* sp. FSDE15 utilizando palha de cana de açúcar. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 21., 2016, Fortaleza. Resumos
- RODARTE, M. P. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- RUEGGER MSJ, TAUKE-TORNISIELO MS (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, 27: 205-211.
- SANTOS, M. L. M. et al. Solos e Ocupação das Terras na Amazônia Brasileira. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: Editora UFLA, 2008. p. 69–70.
- SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia industrial. São Paulo: E. Blucher, v. 2, 54 p., 2001.
- SHINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., RAJASREE, K.P., MATHEW, A., GOTTUMUKKALA, L., PANDEY, A. Properties of a major B-glicosidase-BGL 1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, 46, 1521-1524, 2011.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amyolytic potential of mutants strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, maio/jun. 2010.

XING-HUA, L. et al. The most stirring technology in future: cellulose enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, Pretoria, v. 8, n. 2, p. 17-34, Feb. 2001.