MARILENE DA SILVA LIMA

PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO A PARTIR DO ENGAÇO DA BANANEIRA (*Musa spp.*)

Recife
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARILENE DA SILVA LIMA

PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO A PARTIR DO ENGAÇO DA BANANEIRA (*Musa spp.*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição (Área Ciência dos Alimentos)

Orientador: Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife
2010

Lima, Marilene da Silva
Produção do complexo celulolítico a partir do engaço da bananeira (*Musa spp*.) / Marilene da Silva Lima. – Recife: O Autor, 2010.
88 folhas; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Celulases. 2. Fermentação sólida. 3. Fermentação submersa. I. Título.

664 CDU (2.ed.) UFPE
664 CDD (20.ed.) CCS2010-039

MARILENE DA SILVA LIMA

PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO A PARTIR DO ENGAÇO DA BANANEIRA (*Musa spp.*)

Tese aprovada em: 22 de fevereiro de 2010

Dra. Celiane Gomes Maia da Silva - UFRPE

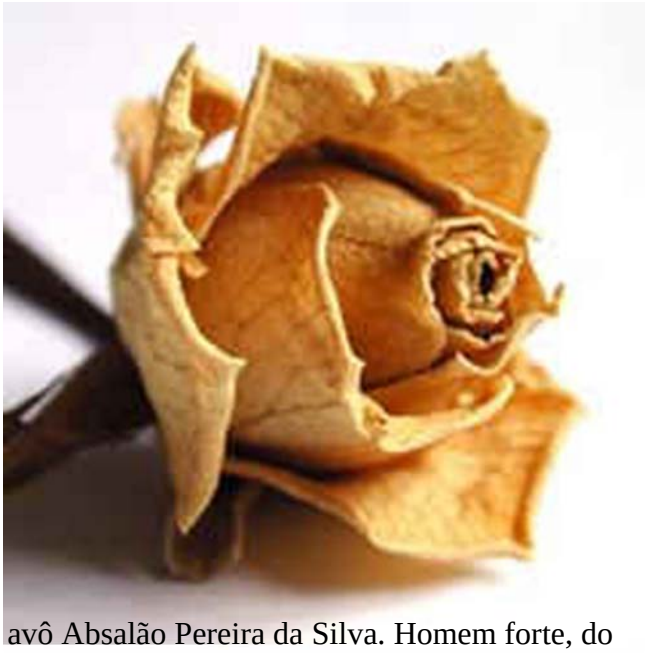
Dra. Keila Aparecida Moreira – Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Dra. Maria Inês Sucupira Maciel – UFRPE

Dra. Roberta de Albuquerque Bento - UFPE

Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva - UFPE

Recife
2010



A meu avô Absalão Pereira da Silva. Homem forte, do sertão alagoano, que resiste a seca e a adversidade há 92 anos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me abençoar e ter me sustentado nos momentos mais difíceis.
Aos meus pais **Givaldo Rozeno** e **Maria Lima** por ser minha rocha, minha base.
Aos meus irmãos **Jaide, Genivaldo, José Edson** e **Márcia**.
A minha prima **Kátia**.
Ao meu querido **Gabriel**, "filho do coração".
À professora **Tânia Stamford**, minha orientadora e mestre, pela paciência e apoio em todos os momentos.
À minha co-orientadora **Patrícia Paiva** e **Thiago Henrique** que tanto me ajudou na segunda fase da pesquisa.
Aos meus amigos do "jardim de infância" **Jaqueline e Luciano** pelo incentivo durante a caminhada, presente nos bons e nos momentos difíceis.
Às minhas amigas **Adriana Menezes, Anamélia Sales, Celiane Maia e Roberta Bento**, pelo apoio e amizade durante esse período.
Aos meus novos amigos, importados de João Pessoa, que ganhei durante o curso: **Carlos Eduardo, Elieyde, Ilsa, Stefânea e Gabi**. Obrigada pelo apoio e companheirismo.
Aos técnicos, **Roberto, Laércio Borges, Vivaldo, Moisés, Viviane, Camilo, Alexandre, Viviane** pela ajuda na execução desse experimento.
Ás estagiárias **Danielly, Íris, Viviane e Ticiane** pela ajuda.
Às funcionárias mais boazinhas que conheci: **Solange, Neci, Sônia, Silvia e Lourdes**, obrigada pelo apoio.
Ao sr. **Irapuã**, pela atenção e fornecimento dos reagentes quando precisei.
Aos **Departamentos de Biologia e Antibióticos** da UFPE pelas Cepas gentilmente cedidas.
À professora **Ângela** do departamento de Zootecnia da UFRPE pelas análises feitas.
A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram.
Agradeço a Deus por vocês!!!!

PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO A PARTIR DO ENGAÇO DA BANANEIRA (*Musa spp.*)

1. RESUMO

No intuito de minimizar o impacto ambiental, torna-se necessário o aproveitamento de resíduos, como o engaço da bananeira, buscando obter produtos com maior valor agregado. Este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade do engaço como substrato, para crescimento de fungos em processo fermentativo sólido e submerso, para a produção de enzimas celulolíticas. As determinações físico-químicas no engaço com lignina e sem lignina foram: pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. No material seco foram realizadas as análises de celulose, lignina, fibra em detergente ácido. Utilizou-se a técnica de difusão em meio sólido para a seleção dos fungos. A atividade do complexo celulolítico foi determinada pela técnica do papel de filtro (FPA). Os extratos fermentados com *Trichoderma viride* foram filtrados, centrifugados e os sobrenadantes avaliados quanto à atividade do complexo celulolítico. O extrato foi fracionado com $(NH_4)_2SO_4$, as proteínas precipitadas foram cromatografadas em CM-celulose e as frações submetidas a atividade celulolítica. A atividade da celobiase foi avaliada a pH 4,0, 4,8 e 6,0 e em temperaturas de 40, 50 e 60°C. Os resultados da pesquisa mostraram que o engaço apresentou baixo teor protéico (0,6%) e pH alcalino (7,8), entretanto a umidade de 88%, no material fresco, é favorável para o crescimento de fungos. O percentual de celulose encontrado no engaço foi de 36,5%. Na seleção, *Trichoderma viride* 2820 e *Aspergillus niger 1015* apresentaram maior produção de halo (21mm) e por isso, foram utilizados nas fermentações em estado sólido e submerso. Maior produção da FPase ocorreu na fermentação submersa utilizando *T. viride* com 4,7 UI/mL. Durante o processo de purificação e caracterização do complexo, observou-se que o extrato bruto fermentado com *T. viride* produziu CMCase (2,1 UI/mL), FPase (5,7 UI/mL) e celobiase (629 UI/mL). Duas celobiases, C_1TV e C_2TV, identificadas em CM-celulose, apresentaram diferente perfil eletroforético. C_1TV (508 UI/mL) foi mais ativa em pH 4,0 a 60 ºC e C_2TV (193,1 UI/mL) em pH 4,8 a 50 ºC. Neste estudo, concluímos que o engaço tratado com explosão de vapor é viável para a produção de celulases, entretanto é necessária a suplementação do substrato com fonte de nitrogênio e correção do pH. A maior produtividade das celulases foi alcançada quando utilizando *T. viride* em estado submerso por 96 horas. Sob as condições estudadas o engaço de bananeira produziu uma FPase, uma CMCase e duas isoformas de Celobiase.

Palavras chave: Fermentação sólida; Fermentação submersa; celulases

2. ABSTRACT

In order to minimize the environmental impact, it is necessary for recovery of waste such as banana stalk, seeking to produce products with higher added value. This study aimed to verify the feasibility of the banana stem as substrate for fungal growth in solid fermentation and submerged for the production of cellulolytic enzymes. The physico-chemical determinations in the banana stem with no lignin and lignin were: pH, total soluble solids, total acidity, moisture, ash, proteins and lipids. In the dry material were carried out analysis of cellulose, lignin, acid detergent fiber. We used the diffusion technique on solid medium for the selection of fungi. The activity of cellulolytic complex was determined by the filter paper (FPA). Extracts fermented with Trichoderma viride were filtered, centrifuged and the supernatants evaluated for cellulolytic activity of the complex. The extract was fractionated with $(NH_4)_2SO_4$, the precipitated proteins were chromatographed on CM-cellulose and the fractions subjected to cellulolytic activity. The activity of celobiase was assessed at pH 4.0, 4.8 and 6.0 and temperatures of 40, 50 and 60 ° C. The survey results showed that the banana stem had low protein content (0.6%) and alkaline pH (7.8), though the humidity is 88% for fresh material is favorable for the growth of fungi. The percentage of cellulose found in the stalk was 36.5%. The selection, *Trichoderma viride* 2820 *Aspergillus niger* 1015 produced more halo (21mm) and therefore were used in solid state fermentation and submerged. Increased production of FPase occurred in submerged fermentation using *T. viride* with 4.7 IU / mL. During the process of purification and characterization of the complex, we observed that the crude fermented with *T. viride* produced CMCase (2.1 IU / mL), FPase (5.7 IU / mL) and celobiase (629 IU / mL). Two celobiases, C1TV and C2TV identified in CM-cellulose, showed different electrophoretic profile. C1TV (508 IU / mL) was most active at pH 4.0 at 60 °C and C2TV (193,1 IU / mL) at pH 4.8 at 50 ° C. In this study, we conclude that the stems treated with steam explosion is possible to produce cellulases, however it is necessary to supplement the substrate with a nitrogen source and pH correction. The highest yield of cellulases was achieved when using *T. viride* in submerged state for 96 hours. Under the conditions studied the banana plant has produced a FPase, a CMCase and two isoforms of Celobiase.

Key words: Solid Fermentation; Submerged Fermentation; cellulases

SUMÁRIO

1. Resumo..... **vii**
2. Abstract..... **viii**
3. Introdução..... **12**
4. Objetivos..... **15**
Geral..... **15**
Específicos..... **15**
5. Hipóteses..... **16**
6. Revisão de Literatura – Artigo de Revisão: Potencial do Engaço da bananeira para Produção de Enzimas Celulolíticas..... **18**
Resumo..... **18**
Abstract..... **19**
Introdução..... **20**
Desenvolvimento..... **21**
Resíduos agroindustriais..... **21**
Processos Fermentativos..... **22**
Aplicação das enzimas celulolíticas..... **23**
Microrganismos produtores de celulases..... **25**
Considerações finais..... **26**
Bibliografia..... **27**
7. Materiais e Métodos..... **31**
Materiais..... **31**
Métodos - Fungos utilizados..... **31**
Caracterização físico-química do engaço de bananeira..... **31**
Seleção Qualitativa dos fungos..... **32**
Preparo do substrato..... **32**
Fermentação em estado sólido (FES)..... **32**
Fermentação em estado submerso (FSm)..... **33**
Extração da enzima..... **33**
Determinação da massa micelial..... **33**
Determinação Proteíco..... **33**

Determinação da atividade celulolítica..... **34**

Condições de purificação parcial..... **35**

Cromatografia..... **35**

Eletroforese em gel de poliacrilamida..... **35**

Efeito da temperatura e pH..... **36**

Análise estatística..... **36**

8. Resultados **38**

Artigos Originais..... **38**

8.1 Aproveitamento do Engaço da Bananeira (*Musa spp)* para Produção de Complexo Celulolítico em Cultivo Sólido e Submerso..... **40**

8.2 Produção e Purificação Parcial de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (*Musa spp*) Utilizando o *Trichoderma viride* 2820 em Estado Submerso..... **63**

9. Considerações Finais..... **81**

10. Referências..... **83**

11. Anexos..... **87**

Anexo A- Aceite para publicação do artigo de Revisão – Revista Higiene Alimentar..... **87**

Anexo B- Documento do envio para o periódico – Química Nova..... **88**

INTRODUÇÃO

3. Introdução

O Brasil ocupa uma posição privilegiada em termos de biodiversidade e capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. Em relação à tecnologia, existe abundância de matéria prima para os processos fermentativos e extrativos, e uma enorme quantidade de biomassa capaz de ser transformada, por via enzimática, em produtos diversificados e de maior valor agregado (MUSSATO et al, 2007). Entretanto essa biomassa é utilizada principalmente para a geração de energia, biopolímeros e biocombustíveis como etanol (CHUM e ARVIZU, 2008).

O potencial de energia oriunda da biomassa tem sido vista como uma boa alternativa em substituição a energia gerada por combustíveis fósseis. Isto por que a abundância e diversidade de matérias-primas distribuídas pelo planeta e a tecnologia desenvolvida pela indústria agrícola fazem da biomassa uma das melhores fontes de energia renovável descobertas até hoje (CHUM e ARVIZU, 2008)

Dados da FAO mostram que somente em 2005 o total de biomassa produzido no mundo foi 571.806 milhões de toneladas (FAO, 2007). Somente na Índia são produzidos, anualmente, cerca de 179 milhões de toneladas de resíduo (SINGH, 2009). No Brasil, para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são gerados aproximadamente 250 a 280 kg de bagaço (CONAB, 2008).

Foi através do Programa Proálcool, criado em 1975, que o Brasil diversificou suas fontes de energia, sendo considerado, hoje um dos maiores produtores de etanol do mundo, demonstrando o papel das fontes renováveis na matriz energética do país e a preocupação em utilizar políticas adequadas para atingir o desenvolvimento sustentável (HEINIMO, 2009; TEIXEIRA et al., 2007)

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na maioria, biomassa lignocelulolítica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada à minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos, gerados pela indústria e comércio de alimentos, tais como casca, caroço e bagaço de cana. Esses resíduos são ricos em açúcar, vitaminas e minerais, facilitando a assimilação por microrganismos (ROSALES et al., 2005; PANDEY et al., 2000).

A economia brasileira é baseada na produção agrícola, tendo como seus principais produtos a soja, cana-de-açúcar, café, mandioca e diversas frutas, o que gera diariamente grandes volumes de resíduos e subprodutos. Esses, podem perfeitamente ter aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e têxteis, além de diminuir problemas ambientais (GRAMINHA et al, 2008)

A indústria biotecnológica oferece grandes oportunidades para valorização econômica dos resíduos, pois permite a produção de metabólitos de alto valor agregado como, por exemplo, as celulases. A tendência do mercado é a utilização de biomassa celulósica para a produção de combustíveis e produtos químicos derivados do petróleo, o etanol e a acetona (AMARANTE, 2005).

Existe um interesse mundial no potencial de comercialização do uso de celulases em meios alimentícios e também na conversão química e biológica de materiais lignocelulolíticos. A celulose é o carboidrato mais abundante atualmente, proveniente da biomassa terrestre e marítima, com uma taxa de síntese aproximadamente 4×10^{10} toneladas por ano. Pesquisas voltadas para os mecanismos enzimáticos da celulose e os problemas envolvidos na conversão da biomassa em produtos úteis, por meio de enzimas isoladas ou de microrganismos lignocelulolíticos, têm sido desenvolvidas nos últimos anos. A produção e o uso de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria vem demonstrando perspectivas promissoras e seu mercado supera US$ 2,3 bilhão por ano (MUSSATTO et al., 2007).

As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações β-(1-4) na celulose (KLEMM et al, 2005). Uma das aplicações, das celulases, na indústria de alimentos, é como aditivo natural na clarificação de sucos de frutas cítrica (RUEGGER e TAUK-TORSIELO, 2004). Outra aplicação importante é a produção de etanol a partir da biomassa que está atraindo a atenção como fonte de energia alternativa.

A cultura da banana gera grandes quantidades de resíduos após a colheita da fruta, sendo considerados os mais importantes em termos de grande volume gerado e de potencial fibroso, o pseudo-caule, a folha e o engaço. Esse ultimo, tem sido escassamente aproveitado, sendo descartado no processo de separação das pencas na *packing house* e disposto sobre o solo, geralmente em área urbana, ou descartado no lixo doméstico (SOFFNER, 2001).

Na cidade de Botucatu-SP, Brasil, são perdidas 3,25 toneladas de bananas a cada seis dias. Este resíduo é rico em material lignocelulolitico, sendo um eficiente substrato para o desenvolvimento de fungos, produtores de enzimas lignolíticas e celulolíticas, o que torna a

produção de celulases, pelo cultivo submerso bastante atraente sob o ponto de vista econômico (SHAH et al, 2005).

Portanto, considerando a importância deste assunto no âmbito da tecnologia ambiental, este trabalho tem por objetivo a utilização do engaço da bananeira como substrato para o crescimento de fungos celulolíticos visando a obtenção de enzimas celulolíticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral – Produzir enzimas celulolíticas por meio de fermentação sólida e submersa utilizando o engaço da banana (*Musa spp*.) como substrato para fungos celulolíticos.

4.2 Específicos

- Analisar o resíduo quanto às características físico-químicas;
- Selecionar qualitativamente, entre microrganismos produtores de celulases, o que apresentam melhor produção de halo;
- Produzir enzimas celulolíticas através da fermentação sólida e submersa;
- Caracterizar e purificar o complexo enzimático;
- Verificar a estabilidade da enzima em diferentes temperaturas e pH's.

5. HIPÓTESE

A cultura da banana gera grande quantidade de resíduos após a colheita da fruta. Os resíduos considerados mais importantes em termos de volume gerado e de potencial fibroso são o pseudo-caule, a folha e o engaço. O estudo do potencial fermentativo do engaço é uma alternativa para a obtenção de produtos com valor agregado como as enzimas celulolíticas. Assim se pressupõe que o engaço da bananeira tratado com explosão de vapor é viável como substrato no crescimento de fungos filamentosos para produção de celulases que apresentam inúmeras aplicações na indústria alimentícia.

6. REVISÃO DE LITERATURA – ARTIGO 1

A revisão da literatura, na forma de artigo de revisão, foi aceito para publicação (Anexo A) pela Revista Higiene Alimentar, v. 24, n. 185, junho de 2010 sendo intitulado "**Potencial do Engaço da bananeira para Produção de Enzimas Celulolíticas".**

Potencial do Engaço da bananeira para Produção de Enzimas Celulolíticas

Marilene da Silva Lima[1*], Adriana Carla Santos de Menezes [2], Tânia Lúcia Montenegro Stamford[3]

[1]Bolsista Doutorado(CNPq - Fone: 0800619697) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Campus universitário, CEP 50670-901, Recife, PE E-mail: marilenelima02@yahoo.com.br.
[2]Bolsista PIBIC/CNPq – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.
[3]Professora Associada I do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, tlmstamford@yahoo.com.br. *- autor para correspondência.

RESUMO

O Brasil ocupa uma posição privilegiada em termos de biodiversidade e capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. A grande quantidade de resíduo produzida anualmente causa sérios problemas ambientais, pois na maior parte dos casos esses subprodutos são abandonados e entram rapidamente em decomposição tornando-se uma ameaça ao meio ambiente. A cultura da banana gera em torno de 220 toneladas de resíduo por hectare. Esses resíduos são ricos em açúcar, vitaminas e minerais, apresentam cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina os quais, devido a sua composição natural, são facilmente assimilados pelos microrganismos. Atualmente uma das mais importantes aplicações de celulases na indústria de alimentos é na extração e clarificação de sucos de frutas e extração do azeite de oliva. Logo se justifica um estudo teórico dando ênfase aos diversos processos que tem sido desenvolvidos a fim de utilizar estes materiais para produção de produtos de valor agregado como álcool, compostos aromáticos, aminoácidos, ácidos orgânicos e enzimas. Dentro deste contexto, os processos de fermentação sólida, representam um importante papel, pois se sabe que vários alimentos que utilizam esse tipo de cultivo microbiano, fazem parte da dieta dos povos dos países Orientais, Asiáticos e Africanos, há muitos séculos. Além disso, minimiza o impacto ambiental.

Palavras chave: Fermentação sólida, Celulases, *Musa sp*

Potential wastes of the banana for Production of Cellulolytics Enzymes

Abstracts

Brazil has been occupied an special position in terms of biodiversity and capacity to generate renewable resourses in large scale. The great amounts of residues annually produced promote serious environmental problems, because in most of these cases the wastes are disposable away and are submitted to a very fast decomposition which may improve environmental contamination. The banana crop generate about 220 ton per hectare annually, and their residues are very reach in sugar, vitamins and minerals, with present 20 % to 60 % cellulose, 20 % to 30 % hemicelluloses and 15 % to 30 % lignin that by own natural composition re easily assimilated by microorganisms. These behaviors justify a theory of study that emphasize various processes that have been developed with the aim to utilize these agricultural wastes to produce materials with aggregate value as alcohol, aromatic compounds, amino acids, organic acids and enzymes. Actually one of the most important applications of cellulases in food industry is the extraction and clarification of fruit sources and extraction of live oil. The banana is a very important crop that produced in more than 100 countries and in 2003 the yield was estimated in up than 68,200 million ton, with more than 4.500 million hectares. Brazil participate with more than 6,5 million ton. Despite this fact the processes of solid fermentation is an important technology and is known that different foods produced by this way is used in special diets in the world as Oriental, Asiatic and African countries beyond many years and although represents a reduction in environmental impact.

Key words: Solid-state, Cellulases, ***Musa sp***

6.1 Introdução

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada a minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos, gerados pela indústria e comércio de alimentos, tais como casca, caroço e bagaço de cana. Esses resíduos são ricos em açúcar, vitaminas e minerais, facilitando a assimilação por microrganismos (ROSALES et al, 2005).

O Brasil ocupa uma posição privilegiada em termos de biodiversidade e capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. Em relação à tecnologia, existe abundância de matéria prima para os processos fermentativos e extrativos, e uma enorme quantidade de biomassa capaz de ser transformada, por via enzimática, em produtos diversificados e de maior valor agregado. A produção e o uso de celulases, em diferentes áreas da agroindústria tais como extração da polpa de frutas, produção de sucos, melhoria na cor e aromas de vinhos, eliminação do excesso de calorias em cerveja; aumento da digestibilidade dos alimentos e rações animais demonstram perspectivas promissoras.

As enzimas são compostos naturais, biodegradáveis, capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários, além disso, o mercado global para enzimas industriais, sozinho, supera US$ 2,3 bilhão por ano (MUSSATTO et al, 2007).

Os processos biotecnológicos para a produção de enzimas, em especial o método de fermentação em estado sólido, têm chamado a atenção nos últimos anos haja vista sua relevância econômica, devido ao baixo custo, importância social e variedade de metabólitos produzidos, em substituição aos processos químicos (PANDEY, 2003).

As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações β-(1-4) da celulose. Uma das aplicações, das celulases, na indústria de alimentos, é como aditivo natural na clarificação de sucos de frutas cítrica (RUEGGER e TAUK-TORSIELO, 2004).

A cultura da banana gera grande quantidade de resíduos após a colheita da fruta, somente na cidade de Botucatu-SP, são perdidas 3,25 toneladas de bananas a cada 6 dias (SHAH et al, 2005). Os resíduos considerados os mais importantes em termos de grande volume gerado e de potencial fibroso é o pseudo-caule, a folha e o engaço, rico em material lignocelulolítico, sendo um eficiente substrato para o desenvolvimento de fungos, produtores de enzimas lignolíticas e celulolíticas (SOFFNER, 2001).

Diante do exposto torna-se necessário o aproveitamento de resíduos agroindustriais do engaço da bananeira visando a produção de enzimas celulolíticas necessárias para o desenvolvimento do Brasil.

6.2 Desenvolvimento

6.2.1 Resíduos Agro-industriais

Segundo GRAMINHA (2008), a economia brasileira está baseada na produção agrícola, tendo como seus principais produtos a soja, milho, cana-de-açúcar, café, mandioca e diversas frutas. As agroindústrias produzem diariamente grandes volumes de resíduos e subprodutos que podem perfeitamente ter aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e têxteis, além de diminuir problemas ambientais.

SOUZA et al. (1995), determinaram as perdas em diferentes etapas na cadeia da banana no Brasil e concluíram que entre a lavoura e o consumidor chega-se a perder 40% da produção. Logo se observa que os recursos agrícolas mostram-se limitados e pressionados pelo crescimento demográfico exponencial da população, tornando-se cada vez mais urgente o desenvolvimento de tecnologias que permitam a utilização desta riqueza natural e abundante.

A indústria biotecnológica oferece grandes oportunidades para valorização econômica destes resíduos, pois permite a produção de metabólitos de alto valor agregado como, por exemplo, as celulases. A tendência do mercado é a utilização de biomassa celulósica para a produção de combustíveis e produtos químicos derivados do petróleo, como o etanol e a acetona (AMARANTE, 2005).

De acordo com dados da EMBRAPA (2005), o Brasil é o segundo produtor mundial de banana, com uma produção de 6,47 milhões de toneladas/ano – cerca de 9,5% da produção mundial. A maior produção, segundo o Instituto de Economia Agrícola do estado de São Paulo - IEA (2005) está concentrada no estado de São Paulo onde foram colhidas 1,1 toneladas de frutos /ano, cultivadas em 54 mil ha, dos quais aproximadamente 65% se encontram no Vale do Ribeira. A Bahia ocupa o segundo lugar com 763.901 t, Pernambuco é

o sexto maior produtor, com 367.481 t. No estado de Pernambuco, a produção está concentrada na região da Zona da Mata e no Agreste.

Segundo SHAH et al (2005) são gerados 220 toneladas de desperdício residual de banana para cada hectare colhido e esse resíduo é descartado diretamente em rios, estradas e lagos, o que causa preocupação ambiental. Dentre os resíduos que são gerados do cultivo da banana está o engaço que representa cerca de 8 a 12% do peso do cacho. Sua composição química foi averiguada por TORRES (1981), para a cultivar Giant cavendishii. O teor de lignina encontrado foi 11,73% e os teores de holocelulose e hemiceluloses foram 53,5% e 15%, respectivamente. SOFFNER (2001) também analisou a composição química do engaço da bananeira *M. cavendishii*, cultivar nanicão e encontrou teores de 8,79% para lignina e 44,46% de holocelulose.

Os resíduos gerados pela agroindústria contem cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina além de serem ricos em açúcar, vitaminas e minerais, sendo um eficiente substrato para o desenvolvimento de fungos, produtores de enzimas lignolíticas e celulolíticas (SHAH, 2005)

6.2.2 Processos Fermentativos

A fermentação sólida (FES) é definida como o cultivo de microrganismos sobre um substrato úmido, insolúvel que atua tanto como suporte físico, como fonte de nutrientes e como fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos. É utilizada na ausência de água, no estado líquido visível, proporcionando assim um ambiente próximo ao natural para o qual os microrganismos estão adaptados (PANDEY et al, 2000).

Segundo PANDEY (2003), foi a partir de 1940 que os países ocidentais direcionaram seus esforços para o desenvolvimento e aprimoramento dos processos de fermentação submersa (FSm), dando pouca ou nenhuma importância a fermentação sólida. Após a 2ª Guerra Mundial, os processos de fermentação submersa ficaram muito conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação da penicilina, tornando-se modelos tecnológicos para a produção de qualquer composto por fermentação. Foi o enriquecimento protéico de rações animais, a principal atividade que motivou a utilização da fermentação sólida nos países Ocidentais após 1940, por se tratar de um processo que permite a utilização de resíduos

agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e, em alguns casos, minimizando a poluição causada por estes resíduos.

O objetivo da fermentação em meio sólido é conduzir o cultivo do fungo ou bactéria em contato com o substrato insolúvel e desta maneira alcançar altas concentrações do produto na fermentação. O principio deste meio de cultura consiste na distribuição homogênea de um inoculo de esporos no substrato sólido, mantendo as condições aeróbias (AMARANTE, 2005).

Esse tipo de fermentação tem sido tradicionalmente praticada na compostagem de resíduos agrícolas para o cultivo de cogumelos e produção de ácidos orgânicos como, por exemplo, o ácido lático que pode ser produzido a partir da fermentação das cascas de banana, (REDDY et al, 2003); arroz (LATIFIAN et al, 2007); sementes de algodão (CSISZÁR et al, 2007); bagaço de cana de açúcar (ADSUL et al, 2004) entre outros.

6.2.3 Aplicação das Enzimas Celulolíticas

A pesquisa por enzimas que ataquem o complexo lignocelulolítico com características adequadas para os diferentes processos biotecnológicos tem sido o foco principal de muitos estudos (SONIA e CHAHA, 2005).

A historia das celulases está ligada às Forças Armada Americana e sua importância e estudos começaram durante a Segunda Guerra Mundial. Neste período o exército americano ficou preocupado com a rapidez com que seu material bélico sofria deterioração no extremo Oriente, sobretudo os derivados de celulose: tecidos, roupas, sacos, etc. Criou-se então, um programa básico para determinar a natureza da deterioração, o agente causal, modo de ação e métodos de prevenção. Desde então, as pesquisas com microrganismos celulolíticos não pararam mais (AMARANTE, 2005).

As enzimas conhecidas como celulases hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. A classificação das hidrolases *O*-glicosídicas (EC 3.2.1.-) conforme a nomenclatura enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molécular IUB-MB é feita com base na sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular (HENRISSAT e BAIROCH, 1993).

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma árdua tarefa, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Adicionalmente, as fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas (BÉGUIN, 1990).

As celulases ou enzimas celulolíticas são algumas vezes descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica. Este grupo reúne:

Endoglicanases (EC 3.2.1.4) – **[EG] s**ão enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β-1,4-D-glicosídicas na região amorfa de cadeia polissacarídica da celulose, gerando oligossacarídeos de comprimento variados e consequentemente novas cadeias terminais. **Exoglucanase** (EC 3.2.1.91), [**CBH**] conhecida também como celobiohidrolase, β-1,4-celobiohidrolase ou Avicelase celobiohidrolases agem sobre as cadeias terminais não redutores de celulose liberando celobiose e glicose.

β-glicosidase (EC 3.2.1.21), conhecida como gentobiase e celobiase. β-glicosidases, que agem sobre celobiose e celodextrinas solúveis hidrolisando-as à glicose (LYND et al, 2002).

De acordo com MUSSATO et al, (2007) o mercado mundial de enzimas industriais corresponde a aproximadamente a 60% e tende a crescer a uma taxa de 5,7% ao ano. Os dados de 2005 indicam que o mercado externo brasileiro corresponderia a US$ 74 milhões, representando 2% do mercado mundial. As celulases representam atualmente apenas 3% da demanda por enzimas industriais no mercado brasileiro (US$ 1 milhão e 204 ton a um preço médio que varia entre 4,20 e 13,9 US$/kg).

Na indústria de alimentos, as celulases são usadas em diferentes processos: extração e clarificação de sucos de frutas e hortaliças (MUSSATO et al, 2007); extrações de componentes como chá verde, proteína da soja, óleos essenciais, aromatizantes e amido da batata doce; processos de produção do vinagre de laranja e produção de vinho (RUEGGER, 2004).

Outra aplicação importante das celulases é a produção de etanol a partir da biomassa que está atraindo a atenção como fonte de energia alternativa. No processo da produção de etanol da biomassa lignocelulolítica, o principal problema está estabelecido na hidrólise. A hidrólise por celulases combinada com hemicelulase, portanto, é essencial para uma eficiente conversão da biomassa lignocelulolítica a álcool (KANG et al, 2004).

6.2.4 Microrganismos produtores de celulases

Devido à grande quantidade de material celulósico existente na terra, sua biodegradação é importante em muitos habitats naturais como: solo, folhas e florestas, sedimentos aquáticos produzidos pelo homem, como compostagem e digestores anaeróbios (PAVARINA, 2002). Ainda, de acordo com este autor, os microrganismos celulolíticos são encontrados em grupos taxonômicos bastantes variados, incluindo fungos, actinomicetos e bactérias sendo geralmente encontrados em toda a biota onde há acúmulo de resíduo celulósico. Alguns dos principais microrganismos produtores de celulases podem ser visualizados na Tabela 1:

Tabela 1. Microrganismos produtores de celulases

Grupo	**Organismos**	
Bactérias	*Acetivibrio* *Cellulolyticus* *Bacterióides* *Cellulomonas sp* *Cellvibrio fulvus*	*C. vulgaris* *C. thermocellum* *C. thermonospora* *Pseudomonas fluorescens* *Ruminococcus albus*
Actinomicetos	*Streptomyces griséus* *Thermoactnomycete sp.* *Thermonospora curvata* *T. fusca*	
Fungos	*Agaricus bisporus* *Aspergillus fumigatus* *A. niger* *A. terreus* *Fusarium solanil* *Penicillium citrinum* *Penicillium trenis*	*Polyporus adustus* *P. versicolor* *Poria sp.* *S. thermophile* *T. longibrschiatum* *T. reesei*

Fonte: PAVARINA (2002) (adaptado)

Estudos realizados no período da Segunda Guerra Mundial consideram o *Trichoderma reesei* um dos microrganismos mais apropriados para a produção de celulases e tem sido objeto de estudo da grande maioria dos pesquisadores desta área (RUEGGER e TAUK-TORSIELO, 2004).

Para fermentações em meio sólido a espécie *Trichoderma harzianum* apresentou características satisfatórias para a produção de celulases por produzir quantidades importantes, ter crescimento elevado (1,2 mm/h), penetrar nos substratos rapidamente e produzir quantidades elevadas do conidosporos na superfície. Além disso, *Trichoderma harzianum* é um antagonista poderoso a um certo número de fungos fitopatógenos (KREDICS et al., 2004).

6.3 Considerações finais

O estudo de aproveitamento de materiais lignocelulósicos como produtos industrialmente utilizáveis é hoje uma realidade por contribuir com a diminuição da poluição existente pela queima desses materiais como fonte de energia para alimentar as caldeiras das indústrias. A enorme quantidade de resíduos gerados no Brasil, o torna um país com um grande potencial para a produção de enzimas de uso industrial através da bioconversão, principalmente por resíduos gerados pela agroindústria: cana-de-açúcar, soja, entre outros. O Brasil precisa utilizar o potencial desse material em processos enzimáticos altamente eficientes e a preços competitivos minimizando assim o impacto causado por esses resíduos ao meio ambiente.

6.4 Bibliografia

ADSUL, M.G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H, BASTAWDE. K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polyssaccharides from Bagasse: applications in Cellulase and Xylanase Production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n.1, p. 67-72, 2004.

AMARANTE, C. B. Estudo da Obtenção do Complexo Enzimático de Celulases a partir de Resíduos Agroindustriais Regionais por Fermentação em Meio Sólido. 2005, 105f. **Dissertação** (mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará -UFPA, Belém.

BÉGUIN, P. Molecular Biology of Cellulose Degradation. **Annual Review of Microbioloy**, v. 44, p. 219-248, 1990.

CSISZAR, E.; SZAKÀCS, G.; KOCZKA, B. Biopreparation of cotton fabric with enzymes produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1765-1771, 2007.

EMBRAPA. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Cenagenda online -** Ano I n. 31. 2005, 65p.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; M. A. A.; BALSALOBRE, M. A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid- state fermentation: Aplication to animal nutrition. **Animal Feed and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

Instituto de Economia Agrícola (IEA). Perspectiva Econômica da banana não é negra e futuro indica: siga a moderniadade e toca inovação. Disponível em: http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=3978. Acesso em: 22 de abril de 2008.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of Cellulases and Hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KREDICS, L.; MANCZINGER, L.; ANTAL, Z.; PÉNZES, Z.; SZEKERES, A.; KEVEI, F.; NAGY, E. In Vitro Water Activity and pH Dependence of Mycelial Growth and Extracellular Enzyme Activies of *Trichoderma* strains with Biocontrol Potencial. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 491-498, 2004.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESHAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3631-3637, 2007.

LYND, L. R.; WEIMER, P.L.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIU, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n 3, p. 566-577, 2002.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje,** v. 41, n. 242, 2007.

PANDEY, A. Solid-state Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.. SOCCOL, C.R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I – bioprocesses an products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAVARINA, E. C. Fungos Microaerónios na Bioconversão de Material Lignocelulolítico. Campinas, 2002. 161f. **Tese** (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Campinas.

REDDY, G.V.; BABU, P .R.; ROYA, K.R.R.M.; KOTHARI, I.L. Utilization of Banana Wastes for the Production of Lignolytic and Cellulolitic Enzymes by Solid Fermentation

Substrate Fermentation Using Two *Pleurotus* Especies (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

ROSALES, E.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of Food Processing Wastes for Production of Relevant Metabólites: application to Laccase production by *Trametes hirsuta.* **Journal of Food Engeneering,** v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da Celulase de Fungos Isolados do Solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, n.2, p. 205-211. 2004.

SHAH, M. P.; REDDY, G.V.; BANERJEE, R.; BABU, P. R.; KOTHARI, I. L. Microbial Degradation of Banana Waste Solid State Bioprocessing Using Two Lignocellulolytic Fungi (Phylostica spp. MPS-001 and *Aspergillus spp*. MPS-002). **Process Biochemistry,** v.40, n. , p. 445-451, 2005.

SOFFNER, M. L. A. Produção de Polpa Celulósica a partir de Engaço de Bananeira. 2001. 70f. Dissertação (mestrado em Ciências – Ciências e Tecnologia da madeira). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz- Esalq, Piracicaba.

SONIA, K. G.; CHAHA, B. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production b thermomyces lanuginosus (D2W3) under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1561-1569. 2005.

SOUZA, A. T.; PEIXOTO, A. N.; WAACHHOLZ, D. Banana. **Florianópolis**: Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina(Estudo de Economia e Mercado de Produtos Agrícolas, 2). 103p., 1995.

TORRES, M. Propriedades Fundamentales de la Fibra de Raquis de Banano (*Musa giant cavendishi*). San José, 1981. 31p. Trabajo (Licenciatura) – Universidad de Costa Rica.

MATERIAIS e MÉTODOS

7. MATERIAIS e MÉTODOS

7.1 Materiais

O resíduo utilizado como substrato foi o engaço da banana, cultivar Prata, obtido de produtores da cidade de São Vicente Férrer, PE. Foram utilizados Carboximetilcelulose, da CRQ (Brasil); celobiose da INLAB (Brasil); papel de filtro Waltman n. 1; sacos para diálise da Sigma Aldrich (EUA).

7.2 Métodos

7.2.1 Fungos utilizados

Os fungos utilizados foram adquiridos nas coleções de culturas dos Departamentos de Nutrição, Antibióticos e Micologia (Catálogo URM 604) da UFPE. Os microrganismos foram repicados mensalmente para manutenção das culturas, em Agar Batata Dextrose, crescidos em estufa à 28°C e mantidos posteriormente sob refrigeração (± 8°C). As cepas utilizadas nos experimentos tinham 5 a 7 dias de cultivo.

Para a realização do *screening* foram utilizados os seguintes fungos filamentosos:

Absidia sp., Aspergillus fumigatus 40640, *Aspergillus niger* ATCC 1004, *Aspergillus niger* ATCC 1015, *Aspergillus. Parasiticus* 3434, *Aspergillus sydowii* 2188, *Fusarium oxysporum* 2502 2502, *Fusarium solani* 2553, *Mucor circinelloide* 3485, *Penicillium citrinum* 3414, *Penicillium estecnii* 2968, *Penicillium Waksmani* 1446, *Trichoderma harzianum* 2841, *Trichoderma viride* 2820, *Symephastrum sp.*

7.2.2 Caracterização físico-química do engaço da bananeira

O engaço foi levado ao Laboratório Experimental de Análise de Alimentos – LEAAL do Departamento de Nutrição da UFPE, lavado e sanitizado com 50 ppm de hipoclorito de sódio. Foram realizadas as seguintes análises físicos-químicas: pH; Sólidos solúveis totais; Acidez total titulável; Umidade, Cinzas, Proteínas e lipídeos (Instituto Adolf Lutz,1985); foram realizadas as determinações de Celulose e lignina, matéria seca e Fibra em Detergente Ácido descritas por Van Soest (1965). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

7.2.3 Seleção Qualitativa dos fungos

Afim de selecionar o melhor fungo produtor de celulases, foi elaborado o meio mineral celulolítico conforme metodologia de Neirotti e Azevedo (1988), contendo (g/L): 3,8g KCl; 2g K_2HPO_4; 0,1 g $MgSO_47H_2O$; 1g $(NH_4)_2SO_4$; 0,6g de extrato de malte; 10g de CMC; 16 g de ágar e citrato de sódio 15mM (para controlar o crescimento da colônia). O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1N. Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo este meio mineral e incubados em estufa de crescimento a 28°C por 5 dias. Após esse período foram submetidos a um choque térmico em estufa a 50°C por 16 horas. A visualização dos halos, na placa de Petri, ocorreu com a adição da solução vermelho congo a 0,25% (p/v) por 30 minutos sendo em seguida lavadas com solução tampão Tris HCl 0,1 M por 5 minutos. Foram selecionados os fungos que apresentaram maior diâmetro de halo.

7.2.4 Preparo do substrato

Após lavagem e sanitização, o engaço foi cortado, com faca de aço inox, em cubos de aproximadamente 2cm e submetido ao processo de explosão de vapor em autoclave a 121ºC por 2 horas em intervalos de 30 minutos a fim de provocar ruptura física do complexo celulolítico. Em seguida o engaço foi triturado em liquidificador doméstico marca Walita (Brasil) e depois lavado em água corrente para retirada parcial da lignina (Reguly, 1996), e seco em estufa com circulação de ar a 60°C por 16 horas. Após a secagem foi triturado em moinho multi-uso da marca TECNAL (Brasil), obtendo o material com espessura de 150 µm e armazenado em sacos de polietileno a temperatura ambiente para as fermentações.

7.2.5 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Em Erlemyer de 250 mL foram pesadas 5 gramas de engaço e adicionado 20 mL da solução de sais contendo (g/L): 5g KH_2PO_4, 5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,8 g $CaCl_2$; 0,6g $MgSO_47H_2O$; 0,6g de uréia; 0,05g $FeSO_47H_2O$; 0,014g $ZnSO_4H_2O$ (Dutta, 2008). O pH do meio foi ajustado utilizando HCl 1N de acordo com o fungo utilizado. Para o fungo *T. viride* 2820 o pH foi ajustado para 4,8 e para o *A. niger 1015* o pH foi ajustado para 5,0. O material foi

autoclavado a 121°C por 15 minutos. Foi adicionado suspensão de esporos numa concentração de 10^6 UFC/g. As amostras foram mantidas em estufa a 28°C durante 5 dias. A cada 24 horas foram retirados 3 Erlemyers e a amostra de 1g de cada um deles foi retirada. Em cada amostra adicionou-se 10 mL de tampão citrato pH 4,8, 0,05 M, para extração da enzima.

7.2.6 Fermentação em Estado submerso (FSm)

Para a fermentação em meio submerso foram pesados dois gramas do substrato e colocados em Erlemeyer de 250mL e adicionado 50 mL do meio de cultura contendo (g/L): 5g KH_2PO_4, 5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,8 g $CaCl_2$; 0,6g $MgSO_47H_2O$; 0,05g $FeSO_47H_2O$; 0,014g $ZnSO_4H_2O$ (Dutta, 2008). Após autoclavagem de 121°C por 15 minutos o pH foi ajustado para 4,8 com HCl 1N estéril passado em membrana bacteriológica. Em seguida foi inoculado com suspensão de esporos na concentração de 10^6 e colocado em agitador orbital a 150 rpm durante 7 dias. A cada 24 horas três Elermeyers foram retirados e uma alíquota de 10 mL, de cada um deles, foi retirada para extração da enzima.

7.2.7 Extração da enzima – nas amostras provenientes da fermentação em meio sólido foi adicionado 10 mL de tampão citrato 0,5 M, pH 4,8, em seguida foram filtradas em papel de filtro, e centrifugadas em centrífuga modelo MPW 350-R da Med. Instruments (Polônia), a 9.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -18°C em freezer para determinação da atividade celulolítica. As amostras do cultivo submerso foram filtradas em papel de filtro, centrifugadas a 9.000g por 15 minutos e armazenadas para as análises enzimáticas.

7.2.8 Determinação da massa micelial - As amostras coletadas na fermentação submersa foram filtradas em papel de filtro e colocadas em estufa a 80°C até peso constante. Na fermentação em estado sólido, foi realizada a determinação da massa micelial pela diferença entre a umidade inicial da amostra no meio de cultura e a umidade final, ao serem colocadas em estufa a 80°C.

7.2.9 Determinação Protéico – A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al (1951) usando albumina de soro bovino (31-500 µg/mL) como padrão.

7.2.10 Determinação da atividade celulolitica – o ensaio para determinar a atividade individual do complexo celulolítico seguiu a metodologia da IUPAC (Ghose, 1987):

Exoglucanase - a atividade da exoglucanase (atividade em papel de filtro –FPA) foi determinada pela dosagem de açúcar redutor usando glicose como padrão. Tiras de papel de filtro (6×1 cm) Waltman n1 constituíram o substrato que foi adicionado a 0,5 mL do filtrado e 1 mL da solução tampão citrato pH 4,8 em tubos de ensaio. Em seguida a amostra foi levada para o banho-maria a 50°C por 60 minutos. Após esse período adicionou-se 3 mL do ácido 3,5 dinitrosalicílico, sendo em seguida os tubos colocados em água fervente por 5 minutos para paralisar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. A atividade em Papel de Filtro (FPase) foi expressa em UI/mL.

Endoglucanase – mediu-se a atividade da endoglucanase (Carboximetil Celulase, CMCase) pela dosagem de açúcares redutores resultantes, através do método do ácido dinitrosalicílico. Misturou-se 0,5 mL da amostra enzimática com 0,5 mL de uma solução de Carboximetil Celulose-CMC a 2% (em tampão citrato 0,05M, pH 4,8), em seguida foi levado ao banho-maria a 50ºC por 30 minutos. Após esse período, paralisou-se a reação adicionando 3 mL de ácido dinitrosalicílico. Em seguida colocou-se a amostra em água fervente por cinco minutos. A leitura da amostra foi realizada em espectofotômetro a 550 nm. A Atividade da CMCase foi expressa em UI/mL.

Celobiase - a atividade da celobiase foi determinada pela produção de açúcares redutores. A alíquota de 1 mL da amostra-enzima foi adicionada a 1 mL de solução de 15 milimolar de celobiose pura em tampão 0,05 M de citrato, pH 4,8. A mistura foi levada ao banho-maria a 50ºC por 30 minutos. A reação foi paralisada por imersão da amostra em água fervente por 5 minutos. Em seguida foi determinada a atividade pelo método glicose-oxidase. A Atividade da Celobiase foi expressa em UI/mL.

Uma curva padrão foi feita a partir de uma solução de 5mg de glicose (Vetec) por mL produzindo uma curva padrão de 10 pontos. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 550nm. Uma unidade da enzima (UI) é definida como o resultado da produção de 1µmole de glicose equivalente/minuto

7.2.11 Condições de Purificação Parcial – O extrato fermentado por 96 h foi submetido a saturação de 0-20%, 20-40% e 40-60% com sulfato de amônio - $(NH_4)_2SO_4$. O precipitado coletado após centrifugação a 9000g por 15 minutos em temperatura de 4ºC, foi dialisado em membrana de celulose Sigma-Aldrich (EUA) inicialmente por 6 horas utilizando água destilada e, em seguida, contra solução tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,5 por 12 h a 4 ºC.

7.2.12 Cromatografia

Cromatografias de troca iônica foram realizadas utilizando o trocador aniônico dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e o trocador catiônico carboximetil-celulose (CM-celulose; Sigma-Aldrich, Estados Unidos). A F0-60% (0,7 mg de proteínas) foi aplicada em colunas (7,5x1,5 cm) equilibradas com citrato-fosfato 10 mM pH 5,5 a um fluxo de 20 mL/h. A eluição foi efetuada com NaCl 1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e monitoradas pela absorbância a 280 nm. As frações que apresentaram conteúdo protéico foram avaliadas quanto às atividades da Exoglucanase, Endoglucanase e Celobiase (Ghose, 1987).

7.2.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Frações obtidas a partir da cromatografia em CM-celulose foram avaliadas quanto ao padrão protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas ácidas (Davis, 1964), ou básicas (Reisfeld et al., 1962). A detecção das bandas protéicas foi realizada com uma solução de Azul de Coomassie a 0,02% (p/v) ou com Negro de Amido a 1% (p/v) em ácido acético a 10% (v/v). As mesmas frações também foram avaliadas através de eletroforese em condições desnaturantes (em presença do sulfato sódico de dodecila, SDS) de acordo com Laemmli (1970). A detecção das bandas protéicas foi realizada com uma solução de Azul de Coomassie a 0,02% (p/v).

O peso molecular das celulases foi estimado usando padrões de proteínas (Sigma-Aldrich, USA): β-galactosidase (120kDa), soro bovino (91 kDa), glutamato (62), ovalbumina (46kDa), anidrase carbônica (38kDa), mioglobina (26 kDa), lisozima (19kDa), aprotinina (9 kDa).

7.2.14 Efeito da Temperatura e pH – dois tipos diferentes de frações da celobiase foram coletadas durante a cromatografia, essas foram denominadas C_1TV e C_2TV e submetidas a três diferentes pHs (4,0; 4,8; e 6,0) e temperaturas (40°C, 50°C e 60°C) para otimizar as melhores condições para essas enzimas.

7.2.15 Análise estatística – A análise estatística foi realizada utilizando-se teste de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação de diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software Statística versão 7,0.

RESULTADOS

8. Resultados – Artigos Originais

A seguir serão apresentados os artigos originais referentes às observações dos ensaios laboratoriais de investigação da produção de Celulases utilizando dois processos fermentativos: em estado sólido e submerso, bem como caracterização, purificação parcial e estabilidade das enzimas. Os dois artigos científicos foram submetidos a revistas nacionais, os quais serão apresentados em ordem cronológica de elaboração em suas versões originais.

Aproveitamento do Engaço da Bananeira (*Musa spp)* para Produção de Complexo Celulolítico em Cultivo Sólido e Submerso.

O primeiro artigo original deste estudo é intitulado: **"Aproveitamento do Engaço da Bananeira (*Musa spp)* para Produção de Complexo Celulolítico em Cultivo Sólido e Submerso."** Este artigo foi submetido como artigo original à revista **Archivos Latino Americanos de Nutrición**.

8.1 Aproveitamento do Engaço da Bananeira (*Musa spp)* para Produção de Complexo Celulolítico em Cultivo Sólido e Submerso.

Marilene da Silva Lima[1], Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira[1], Celiane Gomes Maia da Silva[2], Keila Aparecida Moreira[3], Tânia Lúcia Montenegro Stamford[1*].

[1]Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;
[2]Departamento de Ciências Domésticas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;
[3] Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil

Resumo

A fim de minimizar o impacto ambiental, torna-se necessário o aproveitamento de resíduos, como o engaço da bananeira, buscando obter produtos com maior valor agregado. Este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade do engaço da bananeira como substrato, para crescimento de fungos filamentosos em processos fermentativos, no estado sólido e submerso, na produção de enzimas celulolíticas. Foram realizadas determinações físico-químicas no engaço com lignina e sem lignina como pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. Para a delignificação parcial, o engaço foi cortado em cubos, submetido a tratamento térmico em autoclave e em seguida lavado em água corrente para retirada da lignina, seco em estufa a 60ºC e posteriormente triturado a fim de se obter uma farinha para analises da matéria seca, celulose, lignina, fibra em detergente ácido. Foi realizado *screening* com 16 fungos, utilizando Carboximetil-celulose para selecionar os melhores cepas produtoras de celulases utilizando a técnica de difusão em meio sólido. A atividade do complexo celulolítico, nas fermentações, foi determinada através da produção de glicose utilizando a técnica do papel de filtro (FPA). Os resultados da pesquisa mostraram que o engaço apresentou pH alcalino (7,8), entretanto a umidade de 88%, no material fresco, é favorável para o crescimento de fungos. O percentual de celulose encontrado foi de 36,5% no engaço. Na seleção, *Trichoderma viride* 2820 e *Aspergillus niger 1015* apresentaram maior produção de halo (21mm) e por isso, foram utilizados nas fermentações em estado sólido e submerso. Maior produção da FPase ocorreu na fermentação submersa utilizando *T. viride* com 4,7 UI/mL. Conclui-se que, para produzir o complexo celulolítico utilizando o engaço de bananeira é necessária a correção do pH e que maior produtividade de FPase foi alcançada quando utilizando *T. viride* em estado submerso por 96 horas .

Palavras chave: resíduo agroindustrial**,** *T. viride, A. níger*.

Abstract

In order to minimize the environmental impact, it is necessary for recovery of waste such as banana stem, seeking to produce products with higher added value. This study aimed to verify the viability of the banana stem as substrate for growth of filamentous fungi in fermentation processes in solid and submerged in the production of cellulolytic enzymes. Determinations were carried out physicochemical the stalk with lignin and lignin free as pH, soluble solids, total acidity, moisture, ash, proteins and lipids. For the partial delignification, the banana stem was cut into cubes, heat-treated in an autoclave and then washed in running water to remove the lignin, oven-dried at 60° C and then crushed in order to get a meal for analysis of dry matter , cellulose, lignin, acid detergent fiber. Screening was performed with 16 fungi, using Carboxymethyl-cellulose to select the best strains producing cellulases using the diffusion technique on solid medium. The activity of cellulolytic complex, the fermentation was determined by glucose production using the technique of filter paper (FPA). The survey results showed the alkaline pH (7.8), though the humidity is 88% for fresh material is favorable for the growth of fungi. The percentage of cellulose was found to be 36.5% in the stalk. The selection, *Trichoderma viride* 2820 and *Aspergillus niger* 1015 produced more halo (21mm) and therefore were used in solid state fermentation and submerged. Increased production of FPase occurred in submerged fermentation using *T. viride* with 4.7 IU / mL. It follows that to produce the complex cellulolytic using the banana stem is required pH correction, and greater productivity FPase was achieved when using *T. viride* in submerged state for 96 hours.

Key words: agro waste , *T. viride, A. niger*

*Autor para Correspondência – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Campus universitário, CEP 50670-901, Recife, PE E-mail: tlmstamford@yahoo.com.br

8.1 INTRODUÇÃO

Devido o aumento da demanda energética no mundo, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm atraído a atenção de todos. Assim, os materiais de origem lignocelulolítica provenientes de atividades agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, palha, restos de culturas de grão e frutíferas, têm sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética (1). A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza e está presente nos materiais lignocelulolíticos renováveis e é, considerada o principal substrato orgânico, no mundo, para a produção de glicose, óleos, ácidos orgânicos, produtos como acetona, ou glicerol (2,3)

A hidrólise enzimática da celulose requer a ação de um complexo sistema enzimático, as celulases. Esse complexo é composto por três enzimas que atuam sinergicamente, endoglucanases (1,4-β-D-Glucanase (EC 3.2.1.4); exoglucanase (1,4-β-D-glucano-celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β-glicosidase (EC 3.2.1.21) (3,4). Uma das aplicações, das celulases, na indústria de alimentos, é como aditivo natural na clarificação de sucos de frutas cítrica (4,5).

Outra aplicação importante é a produção de etanol a partir da biomassa que está atraindo a atenção como fonte de energia alternativa. O maior entrave para a exploração do potencial comercial das celulases são rendimento, estabilidade, especificidade e o alto custo de produção (6).

A fermentação em estado submerso é considerada uma reação de mistura perfeita, onde, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. Nesse tipo de fermentação os substratos sólidos encontram-se dissolvidos ou submersos no líquido. (7,8).

A cultura da banana gera grande quantidade de resíduos após a colheita da fruta, sendo considerados os mais importantes em termos de grande volume gerado e de potencial fibroso, o pseudo-caule, a folha e o engaço. Esse último tem sido escassamente aproveitado, sendo descartado no processo de separação das pencas na *packing house* e disposto sobre o solo, geralmente em área urbana, ou descartado no lixo doméstico (9).

O objetivo desse trabalho foi produzir enzimas celulolíticas utilizando o engaço da bananeira como substrato para crescimento de fungos filamentosos, através da fermentação em estado sólido e submerso.

8.1.2 Materiais e Métodos

Materiais

O resíduo utilizado como substrato foi o engaço da banana, cultivar Prata, obtido na CEASA-CEAGEPE através de produtores da cidade de São Vicente Férrer, PE. Carboximetilcelulose, marca CRQ (Brasil); Celobiose (D-celobiose) Purex .

Métodos

Caracterização físico-química do engaço da bananeira

O engaço foi levado ao Laboratório Experimental de Análise de Alimentos – LEAAL do Departamento de Nutrição da UFPE, lavado e sanitizado com 50 ppm de hipoclorito de sódio. Foram realizadas as determinações físicos-químicas: pH; sólidos solúveis totais (SST); acidez total titulável (ATT); Umidade, cinzas, proteínas e lipídeos (10); celulose e lignina,

matéria seca e fibra em detergente ácido - FDA (11). Todas as análises foram feitas em triplicata

Seleção dos fungos

A fim de selecionar o melhor fungo produtor de celulases, foi elaborado o meio mineral celulolítico (12), contendo (g/L): 3,8g KCl; 2g K_2HPO_4; 0,1 g $MgSO_47H_2O$; 1g $(NH_4)_2SO_4$; 0,6g de extrato de malte; 10g de CMC; 16 g de ágar e citrato de sódio 15mM (para controlar o crescimento da colônia). O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1N. Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo este meio mineral e incubados em estufa de crescimento por 5 dias a 28°C. Após esse período foram submetidos a um choque térmico em estufa a 50°C por 16 horas. A visualização dos halos, na placa de Petri, ocorreu com a adição da solução vermelho congo a 0,25% (p/v) por 30 minutos sendo em seguida lavadas com solução tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, por 5 minutos. Foram selecionados os fungos que apresentaram maior diâmetro de halo.

Fungos utilizados

Os fungos utilizados foram adquiridos nas coleções de culturas dos Departamentos de Nutrição, Antibióticos e Micologia da UFPE. Os microrganismos foram repicados mensalmente para manutenção das culturas, em Agar Batata Dextrose, crescidos em estufa a 28°C e mantidos posteriormente sob refrigeração. As cepas utilizadas nos experimentos tinham 5 a 7 dias de cultivo.

Para a realização da seleção foram utilizados os seguintes fungos filamentosos:

Absidia sp., Aspergillus fumigatus 40640, *Aspergillus niger* ATCC 1004, *Aspergillus niger* ATCC 1015, *Aspergillus. Parasiticus* 3434, *Aspergillus sydowii* 2188, *Fusarium oxysporum* 2502 2502, *Fusarium solani* 2553, *Mucor circinelloide* 3485, *Penicillium*

citrinum 3414, *Penicillium esteckii* 2968, *Penicillium Waksmani* 1446, *Trichoderma harzianum* 2841, *Trichoderma viride* 2820, *Symephastrum sp.*

Preparo do substrato

Após lavagem e sanitização, o engaço foi cortado, com faca de aço inox, em cubos de aproximadamente 2cm e submetido ao processo de explosão de vapor em autoclave a 121,5ºC por 2 horas em intervalos de 30 minutos a fim de provocar ruptura física do complexo celulolítico. Em seguida o engaço foi triturado em liquidificador doméstico (Walita -Brasil) e depois lavado em água corrente para retirada parcial da lignina (13), e seco em estufa com circulação de ar a 60°C por 16 horas. Após a secagem foi triturado em moinho multi-uso (TECNAL -Brasil), passado em peneira de 20 "mesh", obtendo o material com espessura de 150 µm e armazenado em sacos de polietileno a temperatura ambiente para as fermentações.

Fermentação em Estado Sólido (FES)

Em Erlemyer de 250 mL foram pesadas 5 gramas de engaço e adicionado 20 mL da solução de sais contendo (g/L): 5g KH_2PO_4, 5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,8 g $CaCl_2$; 0,6g $MgSO_47H_2O$; 0,6g de uréia; 0,05g $FeSO_47H_2O$; 0,014g $ZnSO_4H_2O$ (14). Para o fungo *T. viride* o pH foi ajustado para 4,8 e para o *A. niger 1015* o pH foi ajustado para 5,0, utilizando HCl 1N. O material foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Foi adicionado suspensão de esporos numa concentração de 10^6 . As amostras foram mantidas em estufa a 28°C durante 5 dias. A cada 24 horas foram retirados 3 Erlemyers para posterior análises.

Fermentação em Estado submerso (FSm)

Para a fermentação em meio submerso foram pesados dois gramas do substrato e colocados em Erlemayer de 250mL e adicionado 50 mL do meio de cultura contendo (g/L): 5g KH_2PO_4, 5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,8 g $CaCl_2$; 0,6g $MgSO_47H_2O$; 0,05g $FeSO_47H_2O$; 0,014g $ZnSO_4H_2O$ (14). Após autoclavagem de 121°C por 15 minutos o pH foi ajustado para 4,8 com HCl 1N estéril passado em membrana bacteriológica. Em seguida foi inoculado com suspensão de esporos na concentração de 10^6 e colocado em agitador orbital a 150 rpm durante 5 dias. A cada 24 horas três Elermyers foram retirados para análises.

Extração da enzima – nas amostras provenientes da fermentação em meio sólido foi adicionado 10 mL de tampão citrato 0,5 M, pH 4,8 em seguida foram filtradas em papel de filtro, centrifugadas a 9.000g por 15 minutos em centrífuga modelo Excelsa Baby I da FANEM (Brasil) e o sobrenadante armazenado em freezer (-18ºC). As amostras do cultivo submerso foram filtradas, centrifugadas e armazenadas para as análises enzimáticas.

Determinação da massa micelial - As amostras coletadas na fermentação submersa foram filtradas em papel de filtro e colocadas em estufa a 80°C até peso constante. Na fermentação em estado sólido, foi realizada a determinação da massa micelial pela diferença entre a umidade inicial da amostra no meio de cultura e a umidade final, ao serem colocadas em estufa a 80°C.

Proteínas – A análise de proteínas foi realizada utilizando kit para proteínas totais da LABTEST baseado na reação do biureto e utilizando albumina bovino como padrão. O resultado foi expresso em mg/mL.

Atividade enzimática – A atividade em papel de filtro (FPA) foi determinada pela dosagem de açúcar redutor (15), usando glicose como padrão. Tiras de papel de filtro (Waltman n.1) medindo 6×1cm (50mg) constituíram o substrato que foi adicionado de 0,5 mL do liquido metabólico a amostra da enzima e 1 mL da solução tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 em tubos de ensaio. Em seguida foi levado para o banho-maria a 50°C por 60 minutos. Após esse período adicionou-se 3 mL do ácido 3,5 dinitrosalicílico para paralisar a reação e em seguida os tubos foram colocados em água fervente por 5 minutos. A atividade da FPase foi expressa em UI/mL.

A curva padrão foi feita a partir de uma solução de 5mg de glicose (Vetec) por mL nas concentrações de 0,3 a 5,0 produzindo uma curva padrão com 10 pontos. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro SP-22 da Biospectro (Brasil) 540nm. Uma Unidade Internacional da enzima (UI) é definida como o resultado da produção de 1μmole de glicose equivalente/minuto

Análise estatística – As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste de Tukey) para determinação de diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software Statistica versão 7,0

8.1.3 Resultados e Discussão

Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas demonstraram que os sólidos solúveis totais (SST), proteínas e lipídeos não apresentaram modificações com o tratamento, porém

observou-se que o pH, acidez total titulável (ATT) e cinzas apresentaram resultados diferentes no engaço parcialmente delignificado e não-delignificado (Tabela 1). A retirada parcial da lignina do substrato deixou o material mais alcalino passando de 6,5 para pH 7,8. Um Estudo da fisiologia com a linhagem *Trichoderma* demonstrou que o melhor crescimento para esse microrganismo ocorre em pH na faixa de 3,0 a 3,8 (16), ou seja, é necessário que haja diminuição do pH do engaço, como meio fermentativo, com intuito de melhorar o desenvolvimento de fungos filamentosos.

Tabela 1. Determinações físico-químicas do engaço da bananeira.

Determinações	**Engaço lignificado**	**Engaço parcialmente delignificado**
Umidade	88%	76%
pH	6,5	7,8
SST	4,0 (°Brix)	4,0(ºBrix)
ATT	0,50 ml/s%	0,05mls%
Cinzas	11,6%	0,9%
Proteínas	0,6 (g/100g)	0,7(g/100g)
Lipídeos	0,25 (g/100g)	0,32 (g/100g)

SST – Sólidos Solúveis Totais; ATT – Acidez Total Titulável

O engaço apresentou 88% de umidade, resultado este semelhante ao da casca de laranja (82%) utilizada para produção de enzimas lignocelulolíticas (17). Assim, materiais que apresentam uma faixa de umidade entre 73 a 92% revelam que o engaço da banana é um substrato favorável ao crescimento microbiano.

Os valores de lipídeos no engaço foram de 0,25 g/100g resultado este inferior ao encontrado em casca de batata (18) em fermentação sólida 0,6%; entretanto, alguns estudos

utilizando diferentes resíduos da mandioca encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo como: casca de mandioca com 0,5% (18) e 0,6% na casca do fruto de café (20); resíduo de mandioca na produção de ácido fumárico 1,06% (21) e farinha de mandioca com 0,53% (22).

Os resultados da composição da fibra do engaço da bananeira (Tabela 2) mostraram que o percentual de celulose (64,5%) e lignina (9,2%), no engaço lignificado foram superiores aos encontrados no engaço parcialmente delignificado (36,5% e 3,4%, respectivamente). Esses percentuais de celulose, de ambos os tratamentos, é maior que os encontrados em alguns substratos lignocelulolíticos utilizados para produção de celulases como casca de arroz com 23,6% (23), silagens de milho e sorgo com 25,43% e 23,59% respectivamente (24), sendo, inferior ao encontrado na cana-de-açúcar com 40% de celulose (13). Os valores de lignina, nesse estudo, podem ser considerados baixos se comparados a materiais lignocelulolíticos utilizados em processos fermentativos, como bagaço de cana que variou de 13-19%, palha de arroz de 9-13% e palha de trigo de 13-24% (13).

A análise desses componentes é particularmente importante devido ao fato de que as fibras de celulose estão geralmente fixadas com polímeros (hemicelulose e lignina) que funcionam como uma barreira à degradação natural da celulose (25). Além disso, nas fibras de celulose coexistem regiões de alta cristalinidade e regiões amorfas menos organizadas. Quanto maior a proporção da forma cristalina, maior a resistência ao ataque enzimático, entretanto, as regiões amorfas são de mais fácil hidrólise. O tratamento do substrato com explosão de vapor ou *"Steam Explosion"*, por exemplo, causa a cisão de algumas ligações entre a celulose e a lignina. O substrato torna mais susceptível à penetração pela água, ácidos e enzimas aumentando assim o potencial hidrolítico da celulose, pois a presença de alguns compostos, de degradação (lignina), produzidos pode exercer efeito inibitório nas operações

subseqüentes. Polpas produzidas a partir de pré-tratamentos com vapor são substratos adequados à produção de enzimas (26).

Observou-se, neste estudo, que o tratamento com vapor removeu cerca de 63% da lignina inicial do substrato, cujo material constitui um componente inibitório, para produção de celulases (13). Além disso, o tratamento proporcionou um abrandamento da celulose tornando a região mais amorfa, facilitando assim a ação das enzimas durante a fermentação. Mesmo ocorrendo perda de celulose durante o tratamento de delignificação, o percentual final obtido foi superior a muitos resíduos utilizados em processos fermentativos como casca de arroz e silagens de milho (23, 24).

Tabela 2. Composição da fibra do engaço da bananeira (%).

Determinações	Engaço com lignina	Engaço parcialmente delignificado
MS (%)	93,0	84,9
FDA MS(%)	73,4	39,7
Celulose (%)	64,5	36,5
Lignina (%)	9,2	3,4

MS- Matéria seca; **FDA**- Fibra em Detergente Ácido

Seleção dos microrganismos

O diâmetro das colônias e dos halos produzidos pelos 16 fungos utilizados neste trabalho estão apresentados na Figura 1. Observa-se que os fungos que produziram as maiores colônias foram *Absidia sp.* com 82,5 mm e *Fusarium solani* com 63,5 mm, entretanto o fungo

que apresentou maior halo foi o *Aspergilus niger* ATCC 1015 com 21,0 mm e o *Trichoderma viride* 2820 com 21,0 mm.

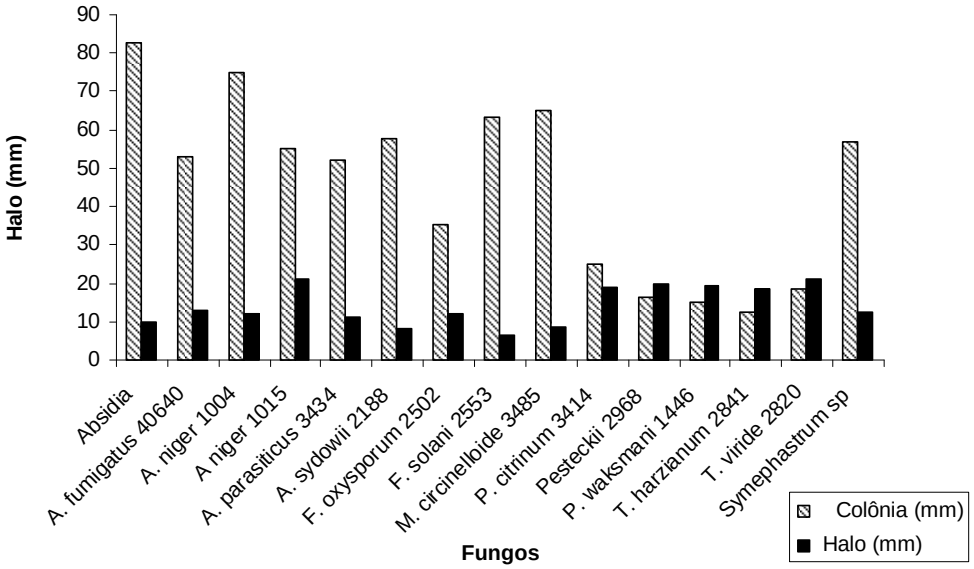


Figura 1. Média do diâmetro do halo (mm) e da colônia (mm) de diferentes fungos celulolíticos testados com Carboximetil celulose – CMC

Resultados superiores aos obtidos nesse trabalho foram encontrados num estudo feito por Ruegger (5) com 80 linhagens de fungos celulolíticos isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins em São Paulo e verificou que as espécies que produziram maiores halos foram *Trichoderma harzianum* II (72 mm), *Chalara paradoxa* (60 mm) e *Aspergillus niger* (42 mm). Tal resultado deve-se, provavelmente, ao fato desses microrganismos terem sido conservados em ágar extrato de malte (glicose, peptona e extrato de malte), meio mais nutritivo que o utilizado em nosso experimento que foi o ágar batata dextrose. Ressalta-se assim, a importância do controle de fatores ambientais de crescimento desses microrganismos na presença de fontes de aminoácidos e/ou fontes orgânicas de nitrogênio, além de outros.

Fermentação em estado sólido e submerso

pH

No processo fermentativo em estado sólido o pH elevou-se nas primeiras 24 hs, permanecendo constante até o final do experimento com o *A. niger* e *T. viride*. Na fermentação submersa utilizando o *A. niger 1015* houve elevação do pH, com pico máximo 6,8 (Figura 2). O mesmo ocorreu com o *T. viride* 2820 em estado submerso atingindo máximo de 6,6, diminuindo após as 96 hs de fermentação.

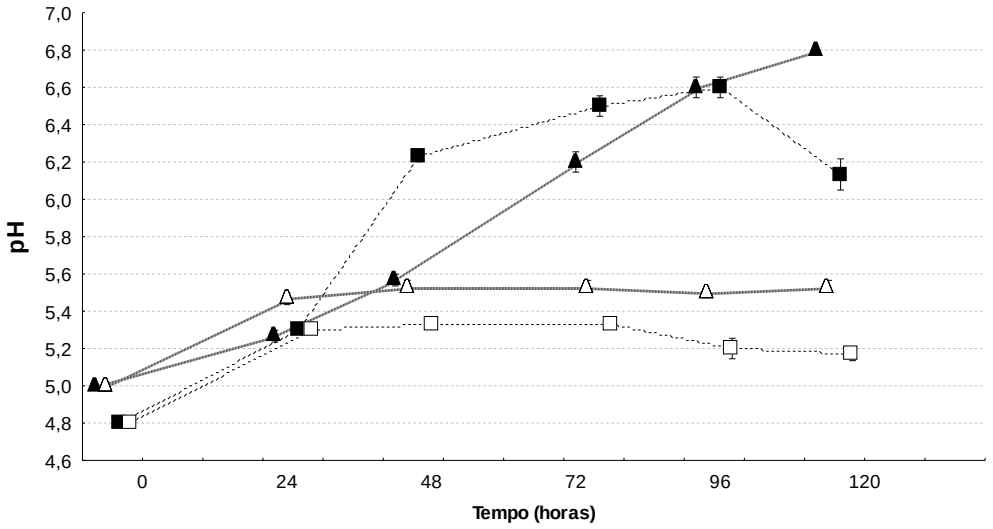


Figura 2. pH do *A. niger 1015* e *T. viride* em estado sólido e submerso durante 120 horas. (Δ) *A. niger 1015* em estado solido; (▲) *A. niger 1015* em estado submerso; (□) *T. viride* em estado sólido; (■) *T. viride* em estado submerso.

Um estudo feito por Camassola e Dillon (27) comparou a produção de celulases utilizando *Penicillium echinulatum* em estado submerso, utilizaram resíduos de cana-de-açúcar e celulose como substrato. Observaram que o pH, do meio, manteve-se constante (6.4) durante toda a fermentação. No nosso experimento o pH manteve-se constante apenas na fermentação em estado sólido. Durante a fermentação submersa, houve elevação do pH para

ambos os fungos utilizados. *A. niger* iniciou com pH 5,0 passando a 6,8 no final do experimento. *T. viride* iniciou com pH 4,8 passando a 6,6 com 96 horas de cultivo. Para verificar possível contaminação por bactérias no substrato foi realizada a análise microbiológica de contagem total para bactérias, apresentando resultado negativo, indicando que esse comportamento foi próprio do metabolismo dos fungos estudados na presença deste substrato.

Determinação da massa micelial

Os dados da Figura 3 mostram que os fungos *A. niger* e *T. viride* usaram como fonte de carbono o engaço da bananeira e tiveram crescimento diferenciado nos processos fermentativos utilizados. *T. viride* apresentou melhor produção de biomassa (0,22 mg/mL) com 120 horas de cultivo no processo submerso. Observou-se que os fungos apresentaram uma fase lag de 24 horas.

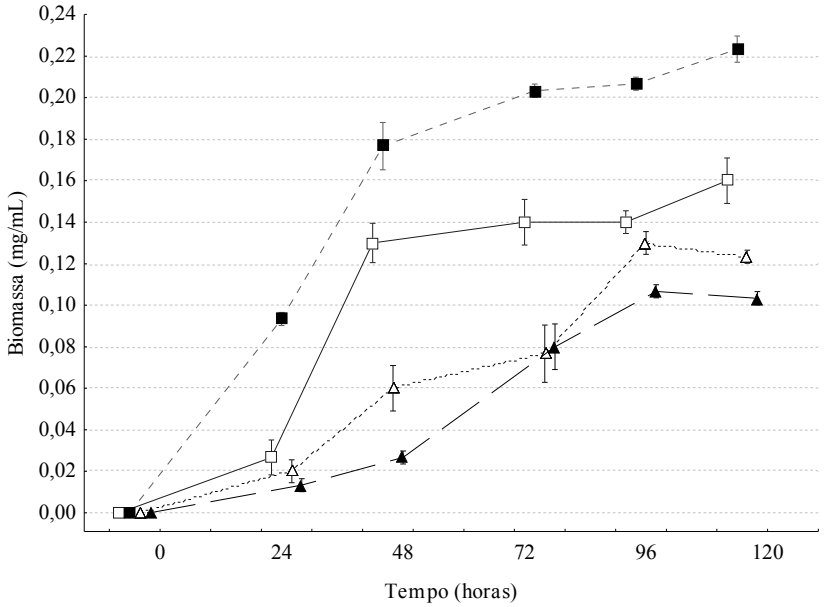


Figura 3. Biomassa produzida por *A. niger* 1015 e T. viride em estado sólido e submerso durante 120 horas. (Δ) *A. niger* 1015 em estado sólido; (▲) *A. niger* 1015 em estado submerso; (□) *T. viride* 2820 em estado sólido; (■) *T. viride* em estado submerso.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ahamed e Vermete (28) utilizando celulose suplementada com extrato de levedura em estado submerso com o fungo *T. reesei*. Estes autores obtiveram a produção de biomassa de 0,14 mg/mL após 72 horas de fermentação. De acordo com Soccol (21) a textura do substrato pode interferir no crescimento micelial. Substrato como bagaço de mandioca puro, pode ficar excessivamente denso e compacto, ocasionando uma queda na produção de micélio. No presente trabalho o tratamento com explosão de vapor utilizado no engaço da bananeira mostrou ser efetivo, pois não apresentou esta característica desfavorável.

Atividade enzimática em papel de filtro (FPA) produzida pelo *A. niger* ATCC *1015* e *T. viride* 2820 **em estado sólido e submerso.**

Observa-se através da figura 4, que a produção da enzima mostrou que *T. viride* em estado sólido e submerso produziu quantidades maiores da enzima que o *A. niger*. A melhor produção foi obtida com o *T. viride* no tempo de 96 horas em fermentação submersa (4,7 UI/mL).

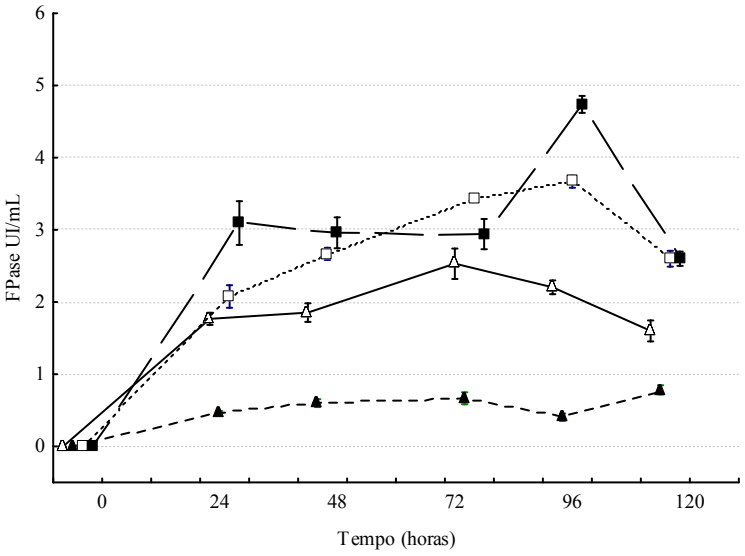


Figura 4. Atividade em Papel de Filtro (FPase) produzida pelo A. niger 1015 e T. viride em estado sólido e submerso durante 120horas. (Δ) A. niger 1015 em estado sólido; (▲) A. niger 1015 em estado submerso; (□) T. viride em estado sólido; (■) T. viride em estado submerso.

Schwan-Estrada et al (29) observaram, durante a produção de celulases utilizando o *Cylindroclaridiu clavantum* em meio celulose microcristalina, aumento seguido de diminuição na produtividade de celulases durante o processo fermentativo submerso fato este observado no presente trabalho. Este comportamento pode ser explicado pela escassez de nutrientes necessários ao metabolismo do microrganismo, levando a uma redução na

produtividade e/ou também decorrente do acúmulo de metabólitos secundários, gerando a inibição da enzima, principalmente no acúmulo de glicose e celobiose (25, 30).

A produção de celulases bagaço de cana-de-açúcar, tratado com explosão de vapor, utilizando o *Penicillium pinophilum*, foi estudada por Sinhg *et al* (31). Os autores verificaram aumento na produção do complexo FPase e CMCase com 96 horas de fermentação atingindo produção de 130 UI/ml, resultados esses superiores aos encontrados neste estudo, como também Liu *et al* (23) observaram baixa produção da FPase (5,5 UI/gds) utilizando o *T. viride* em palha de arroz no estado sólido, após 72 horas de fermentação.

De modo geral, fungos filamentosos, principalmente espécies de *Trichoderma*, são os mais usados para obtenção de celulases em função de sua capacidade de produção de proteína extracelular (32).

8.1.4 Conclusão

Pode-se concluir com o presente estudo que o engaço de bananeira apresenta potencial como substrato para uso em processos fermentativos, entretanto exige que seja suplementado com outra fonte de nitrogênio. Por apresentar pH alcalino, indica que o meio deve ser corrigido para a fermentação. Observou-se que os fungos *T. viride* 2820 e *A. níger 1015* apresentaram maior diâmetro de halo quando utilizada a CMC como substrato. Maior produtividade da enzima FPase ocorreu quando utilizou-se *T. viride* 2820 em estado submerso em 96 horas de cultivo.

8.1.5 Agradecimento

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

8.1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HEINIMO, J.; JUNGINGER, M. Production and trading of biomass for energy – na overview of the global status. Biomass and Bionergy, v. 33, p. 1310-1320, 2009.

2. Wyman, C.E. Potencial Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, end Power. Biotechnology Progress, 2003, 19(2):254-262.

3. Al-Zuhair, S. The Effect of Crystallinity of Cellulose on the Rate of Reducing Sugars Production by Hteregeneous Enzymatic Hydrolysis. Bioresource Technology. 2007. Doi:10.1016/j.biotech2007.09.003.

4. Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.; Bohn, A . Cellulose : fascinating Biopolymer Anal Sustable Rw Material. Angew. Chem., In Ed. 2005, 44: 3358-3393.

5. Ruegger, M. J. S.; Tauk-Tornisielo, S. M. Atividade da Celulase de Fungos Isolados do Solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. Revista Brasileira de Botânica., 2004, v. 27, n.2, p. 205-211.

6. Bhat, M.; Bhat, S. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications. Biotechnology Advances 1997, 15 (3/4):583-620.

7. Gervais, P.; Molin, P. The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13(2-3): 85-101.

8. Ramana Murthy, M.V., Karanth, N.G., Rao, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: Advances in Applied Microbiology, 1993, 38: 99-147.

9. KLUGE, R. A.; SCARPARE FILHO, J. A.; VICTORIA FILHO, R. Densidade e sistema de espaçamento de bananeiras “nanicão” (*Musa* AAA subgrupo *cavendisii*): produção de ráquis e relação ráquis/cacho. Scietia agrícola, v. 56, n. 4, p. 811-818, 1999.

10. Instituto Adolf Luttz. Normas Analíticas, Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3 ed: São Paulo, v.1, 533p. 1985.

11. Van Soest, P. J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. J. Anim. Sci. 1965,24(3):834-843.

12. Neirotti, E.; Azevedo, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em Humicola SP. Rev. Microbiol.1988**,** 19(1):78-81.

13. Reguly, J. C. Biotecnologia dos Processos Fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: Universitária/UFPel, 1996, v.1, 327p.

14. Dutta, T.; Sahoo, R.; Sengupta, R.; Ray, S. S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. Industrial Microbiology Biotechnology. 2008, 35:275-282.

15. Ghose, T. K. Mensurement of Cellulase Activies. Pure and Appl. Chem, 1987, 59(2):257-268.

16. STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Isolation and characterization of a Trichoderma strain capable of fermenting cellulose to ethanol. Applied Microbiology Biotechnology, v. 59, p. 721-726, 2002.

17. CORAZZA, M.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. Química Nova, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

18. Mukherjee, A. K. e Rai,H. A . S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Egeneering Journal. 2007, dói: 10.1016/j.bej.2007.09.017

19. Pandey, A. Soccol, C.R.; Mitchel, D. New developments in solid state fermentation: I – bioprocesses an products. Process Biochemistry. 2000,35:1153-1169.

20. Cereda, M. P. Caracterização de resíduos da industrialização da mandioca. In: Cereda, M. P. (Ed.), Industrialização de mandioca .11-50. 1994.

21. Soccol, C. R. Contribuição ao Estudo da fermentação no Estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, Biotransformação de Resíduo Sólido de Mandioca por Rhizopus e Basidiomacromicetos do gênero Pleurotus. Tese (Professor Titular. Universidade Federal do Paraná). 1994, Pp.1994.

22. Stertz, S.C. Bioconversão da Farinha de Mandioca Crua (Manihot esculenta, crantz) por fungos do gênero Rhizopus em fermentação no estado sólido. Tese (mestrado. Universidade Federal do Paraná).1997.

23. Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G.; Shi, J.; Chen, S. Effect of Biosurfactan on Cellulose and Xylanase Production By Trichoderma viride in Solid Substrate Fermentation. Process Biochemistry. 2006, 41:2347-2351.

24. Silva, A. V.; Pereira, O. G.; Garcia, R.; Valadares Filho, Cecon, P.R.; Ferreira, C.L.L.F. (2005). Composição Bromatológica e Digestibilidade in vitro da Materia \Seca de Silagens de Milho e Sorgo Tratadas com inoculantes Microbiano. Revista Brasielira de Zootecnia. 2005, 34(6):1881-1890.

25. Leschine, S. Cellulose Degradation in Anaerobic Enviroments. Annual Review of Microbiology. 1995, 49:399-426.

26. Baudel, H., M. Pré-tratamento e Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol. III Workshop Tecnológico. 2005.

27.Camassola, M.; Dillon, A.J.P. Biological Preatratment of Sugar Cane Bagasse for the Production of Cellulase and Xlanases by Penicillium echinulatum. Industrial Crops and Products. 2009, 29:642-647.

28. Ahamed, A.; Vermete, P. Culture-based Strategies to Enhance Cellulase enzyme Production from Trichoderma reesei RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions. Biochemical Engineering Journal. 2008, 40:399-407.

29. Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J.R.; Fiori, A. C. G.; Paschoalati, S. F. (2003). Atividade Celulolítica in vitro de Cylindrocladium clavatum eo Efeito de Filtados de Cultivo do Fito patógeno Sobre Plântulas de Eucalipto. Acta Scientiarum:Agronomy. 2003, 25(1):155-160.

30. Mandels, M.; Andreoti, R.; Roche, C. Mesurement of Saccharifyng Cellulase . Biotchnol. Biogen. Symp. 1976, 6:21-31.

31. Singh, R.; Varma, A. J.; Seeta Laxman, R.; Rao, M. Hydrolysis of cellulose derived steam exploded bagasse by Penicillium cellulaeses: Comparison with commercial cellulose. Bioresource Technology. 2009, Doi:10.1016/j.biortech.2009.07.060.

32. Berlin, A.; Gilkes, N.; Kilbur, D.; Bura, R.; Markov, A.; Skomarovsky, A.; Okunev, O.; Gusakov, A.; Maximenko, V.; Gregg, D.; Sinitsyn, A.; Saddler, J. Evaluation of Novel Fungal Celllase Preparations for Ability to Hydrolyze Softwood Substrates-evidence for the Role of Acessory Enzymes. Enzyme and Microbial Technology. 2005, 37(2):175-184.

Produção e Purificação Parcial de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (*Musa spp.***) Utilizando o** *Trichoderma viride* 2820 **em Estado Submerso**

O segundo artigo original deste estudo é intitulado: "**Produção e Purificação de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (***Musa spp.***) Utilizando o** *Trichoderma viride* 2820 **em Estado Submerso"** Este artigo foi enviado para a revista Química Nova (anexo B).

Produção e Purificação Parcial de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (*Musa spp*) Utilizando o *Trichoderma viride* 2820 em Estado Submerso

Marilene da Silva Lima[1], Thiago Henrique Napoleão[2], Thayza Christina Montenegro Stamford[3], Departamento de Fisiologia e Patologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.; Patrícia Maria Guedes Paiva[2], Tânia Lúcia Montenegro Stamford[1*].

[1]Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil. Campus universitário, CEP 50670-901.
[2]Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil. Campus universitário, CEP 50670-901.

*Autor para Correspondência, e-mail: tlmstamford@yahoo.com.br

8.2 Produção e Purificação Parcial de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (*Musa spp.*) Utilizando o *Trichoderma viride* 2820 em Estado Submerso

Resumo

Extratos fermentados do engaço de bananeira utilizando *T. viride*, em estado submerso, por 96 horas, foram filtrados, centrifugados e os sobrenadantes avaliados quanto à atividade do complexo celulolítico. O extrato foi tratado com $(NH_4)_2SO_4$, as proteínas precipitadas foram cromatografadas em CM-celulose. As frações foram testadas quanto a atividade do complexo celulolítico. A atividade da celobiase foi avaliada a pH 4,0, 4,8 e 6,0 e em temperaturas de 40, 50 e 60°C. Foram produzidas FPase (5,7 UI/mL), CMCase (2,1 UI/mL) e celobiase (629 UI/mL). Duas celobiases, C_1TV e C_2TV, identificadas em CM-celulose, apresentaram diferentes perfis eletroforéticos. C_1TV (508 UI/mL) foi mais ativa em pH 4,0 a 60 ºC e C_2TV (193,1 UI/mL) em pH 4,8 a 50ºC. Os dados desta pesquisa mostraram que o engaço de bananeira utilizando *T. viride* é viável como substrato na produção de enzimas celulolíticas, tendo maior produtividade de celobiases com duas isoformas desta enzima.

Palavras chaves: *Trichoderma viride,* celulases, resíduo agroindustrial.

Abstract

Extracts of fermented banana stem using *T. viride*, state submerged for 96 hours, were filtered, centrifuged and the supernatants evaluated for cellulolytic activity of the complex. The extract was treated with $(NH_4)_2SO_4$, the precipitated proteins were chromatographed on CM-cellulose. The fractions were tested for cellulolytic activity of the complex. The activity of celobiase was assessed at pH 4.0, 4.8 and 6.0 and temperatures of 40, 50 and 60 ° C. Were produced FPase (5.7 IU / mL), CMCase (2.1 IU / mL) and celobiase (629 IU / mL). Two celobiases, C_1TV and C_2TV identified in CM-cellulose, showed different electrophoretic profiles. C_1TV (508 IU / mL) was most active at pH 4.0 at 60 ° C and C_2TV (193,1 IU / mL) at pH 4.8 at 50 ° C. Our data showed that the banana stem using *T. viride* is viable as a substrate for the production of cellulolytic enzymes, thereby increasing the productivity of celobiases with two isoforms of this enzyme.

Key words: *Trichoderma viride***,** cellulases, agro wast

8.2.1 Introdução

As celulases são enzimas de importante aplicação na indústria. O complexo celulolítico é formado por três enzimas: endoglucanase (EC. 3.2.1.4, endo-1,4-β glucanase); exoglucanase (EC. 3.2.1.91, 1,4-β cellobiohydrolase) e β-glicosidase (EC. 3.2.1.21) que clivam as ligações glicosídica β-1,4, de forma sinérgica, no qual o produto da ação de uma enzima é substrato para a ação de outra. [1,2] Essas enzimas têm sido largamente utilizadas na bioconversão de materiais lignocelulolíticos em açúcar e etanol. [3]

Um dos entraves na hidrólise de materiais celulósicos diz respeito às características amorfa e cristalina da celulose. Regiões amorfas têm estruturas moleculares menos organizadas sendo mais suscetíveis à ação das enzimas em comparação com a região cristalina, onde a estrutura é altamente organizada dificultando a ação enzimática. Pré-tratamentos nos substratos a fim de uniformizar o material e disponibilizar o acesso a essas regiões, são necessários. [4]

Alguns estudos têm mostrado que substratos pré-tratados antes do processo fermentativo, produzem mais enzimas que aqueles sem o pré-tratamento. [5] Diferentes processos de pré-tratamento do substrato têm sido desenvolvidos e incluem hidrólise ácida, hidrólise álcalina, líquidos quentes, oxidação, SO_2 e explosão de vapor. [6] A explosão de vapor é um processo que tem por princípio causar a desintegração do substrato, criando uma maior superfície para a ação das celulases. Simultaneamente durante a explosão de vapor são separadas, lignina, celulose e hemicelulose aumentando assim a ação global das enzimas. [7]

Etapas de recuperação, concentração e purificação constituem uma parte importante do processo biotecnológico para obtenção de enzimas com alta pureza, visto que os custos das operações de recuperação podem alcançar até 80 % do custo final do produto. [8] O método de

separação e purificação adequado é importante a fim de minimizar gastos de produção, de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável.

A indústria biotecnológica tem utilizado o fenômeno da adsorção de proteínas em matrizes sólidas como princípio para a separação e purificação de bioprodutos. [9] Estima-se que a cromatografia de troca iônica é utilizada em cerca de 75% dos esquemas preparativos. As razões para tal sucesso e ampla aplicação são o elevado poder de resolução, elevada capacidade e custo relativamente baixo. [10]

O *Trichoderma sp*. é um dos microrganismo extensamente estudado na produção de celulases. Tem sido visto que essa espécie pode produzir, pelo menos, duas exoglucanases e cinco endoglucanases. [11]

Estudos sobre os parâmetros da fermentação, a fim de obter o máximo de produção de celulases, são necessários. Assim, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar enzimas do complexo celulolítico produzidas pelo *Trichoderma viride* no engaço da bananeira em estado submerso.

8.2.2. Materiais e Métodos

Materiais

O resíduo utilizado como substrato foi o engaço da banana, cultivar Prata, obtido na CEASA-CEAGEPE através de produtores da cidade de São Vicente Férrer, PE. Carboximetilcelulose, da CRQ (Brasil); celobiose da_INLAB; papel de filtro Waltman n. 1; sacos para diálise da Sigma Aldrich (EUA).

Microrganismo

O fungo *Trichoderma viride* 2820, adquirido da coleção do departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O microrganismo foi repicado mensalmente para manutenção da cultura, em Agar Batata Dextrose, crescido em estufa a 28°C e mantido sob refrigeração. A cepa utilizada no experimento tinha 7 dias de cultivo.

Substrato

Após aquisição, o engaço foi levado ao Laboratório Experimental de Análise de Alimentos – LEAAL do Departamento de Nutrição da UFPE, em seguida foi autoclavado a 121ºC em intervalos de 30 minutos totalizando duas horas. O material foi então lavado exaustivamente com água potável para retirada parcial da lignina. Após esse procedimento o material foi levado para a estufa a 60ºC por 18 horas. Em seguida foi triturado em moinho multi-uso da marca TECNAL (Brasil) e armazenado em sacos de polietileno a temperatura ambiente para a fermentação

Fermentação em meio submerso

Para a fermentação em meio submerso foram pesados dois gramas do substrato e colocados em Erlemayer de 250mL e adicionado 50 mL do meio de cultura contendo (g/L): 5g KH_2PO_4, 5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,8 g $CaCl_2$; 0,6g $MgSO_47H_2O$; 0,05g $FeSO_47H_2O$; 0,014g $ZnSO_4H_2O$. [12] Após autoclavagem de 121°C por 15 minutos o pH foi ajustado para 4,8 com HCl 1N estéril passado em membrana bacteriológica. Em seguida foi inoculado com suspensão de esporos na concentração de 10^6 e colocado em agitador orbital a 150 rpm

durante 168h. A cada 24 horas três Elermyers foram retirados e uma alíquota de 10 mL, de cada um deles, foi retirada para extração da enzima.

Extração da enzima – As amostras foram filtradas em papel de filtro e em seguida centrifugadas em centrífuga modelo MPW 350-R da Med. Instruments (Polônia), a 9.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -18°C em freezer para determinação da atividade celulolítica.

Proteínas – A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al usando albumina de soro bovino (31-500 µg/mL) como padrão. [13]

Determinação da atividade celulolítica – o ensaio para determinar a atividade individual do complexo celulolítico seguiu a metodologia da IUPAC, onde uma unidade da enzima (UI) é definida como o resultado da produção de 1µmole de glicose equivalente/minuto [14]:

Exoglucanase - a atividade da exoglucanase (atividade em papel de filtro –FPA) foi determinada pela dosagem de açúcar redutor usando glicose como padrão. Tiras de papel de filtro (6×1 cm) Waltman n1 constituíram o substrato que foi adicionado a 0,5 mL do filtrado e 1 mL da solução tampão citrato pH 4,8 em tubos de ensaio. Em seguida foi levado para o banho-maria a 50°C por 60 minutos. Após esse período adicionou-se 3 mL do ácido 3,5 dinitrosalicílico, em seguida os tubos foram colocados em água fervente por 5 minutos para paralisar a reação. A atividade da FPase foi expressa em UI/mL.

Endoglucanase – mediu-se a atividade da endoglucanase (Carboximetil Celulase, CMCase) pela dosagem de açúcares redutores resultantes, através do método do ácido dinitrosalicílico. Misturou-se 0,5 mL da amostra enzimática com 0,5 mL de uma solução de Carboximetil Celulose-CMC a 2% (em tampão citrato 0,05M, pH 4,8), em seguida foi levado ao banho-

maria a 50ºC por 30 minutos. Após esse período, paralisou-se a reação adicionando 3 mL de ácido dinitrosalicílico. Em seguida colocou-se a amostra em água fervente por cinco minutos. A leitura da amostra foi realizada em espectofotômetro a 540 nm. A atividade da CMCase foi expressa em UI/mL.

Celobiase - a atividade da celobiase foi determinada pela produção de açúcares redutores produzidos. A alíquota de 1 mL da amostra-enzima foi adicionada a 1 mL de solução de 15 milimolar de celobiose pura em tampão 0,05 M de citrato, pH 4,8. A mistura foi levada ao banho-maria a 50ºC por 30 minutos. A reação foi paralisada por imersão da amostra em água fervente por 5 minutos. Em seguida foi determinada a atividade pelo método glicose-oxidase. A atividade da celobiase foi expressa em UI/mL.

Uma curva padrão foi feita a partir de uma solução de 5mg de glicose (Vetec) por mL nas concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 produzindo uma curva padrão de 10 pontos. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 540nm.

Condições de Purificação Parcial – O extrato fermentado por 96 h foi submetido a saturação de 0-20%, 20-40% e 40-60% com sulfato de amônio - $(NH_4)_2SO_4$. O precipitado coletado após centrifugação a 9000g por 15 minutos em temperatura de 4ºC, foi dialisado em membrana de celulose Sigma-Aldrich (EUA) inicialmente por 6 horas utilizando água destilada e, em seguida, contra fosfato de sódio pH 5,5 por 12 h a 4 ºC.

Cromatografia

Cromatografia de troca iônica foi realizada utilizando-se colunas (7,5x1,5 cm) contendo o trocador aniônico dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose; Sigma-Aldrich, EUA) ou o trocador catiônico carboximetil-celulose (CM-celulose; Sigma-Aldrich, EUA)

equilibradas com citrato-fosfato 10 mM pH 5,5 a um fluxo de 20 mL/h. A F0-60% (0,7 mg de proteínas) foi aplicada à coluna e a eluição foi efetuada com NaCl 1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e monitoradas pela absorbância a 280 nm. As frações que apresentaram conteúdo protéico foram avaliadas quanto às atividades de FPase, CMCase e celobiase.[14] Duas celobiases foram separadas na cromatografia em CM-celulose e denominadas celobiase 1 e 2 de *T. viride* (C_1TV e C_2TV).

Efeito da Temperatura e pH na atividade de celobiase – A atividade de C_1TV e C_2TV foi avaliada nos valores de pH 4,0, 4,8 e 6,0 e nas temperaturas de 40, 50 e 60°C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

C_1TV e C_2TV foram avaliadas quanto ao padrão protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas ácidas, ou básicas.[15,16] A detecção das bandas protéicas foi realizada com uma solução de Azul de Coomassie a 0,02% (p/v) ou com Negro de Amido a 1% (p/v) em ácido acético a 10% (v/v). As mesmas frações também foram avaliadas por eletroforese em condições desnaturantes (em presença do sulfato sódico de dodecila, (SDS-PAGE).[17] A detecção das bandas protéicas foi realizada com uma solução de Azul de Coomassie a 0,02% (p/v).

A massa molecular foi estimada usando padrão de proteínas (Sigma-Aldrich, USA): β-galactosidase (120kDa), soro bovino (91 kDa), glutamato (62), ovalbumina (46kDa), anidrase carbônica (38kDa), mioglobina (26 kDa), lisozima (19kDa), aprotinina (9 kDa).

Análise estatística – Na análise estatística dos dados (software Statistica versão 7.0) utilizou-se teste de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e

teste de Tukey) para determinação de diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos aplicados.

8.2.3. Resultados e Discussão

Determinação da Atividade Celulolítica

Os dados da Figura 1 mostram que durante o processo fermentativo o maior pico alcançado na produção das celulases ocorreu entre 96 e 120hs. O *T. viride*, no engaço, demonstrou pouca produção de FPase (5,7 UI/mL) e CMCase (2,1 UI/mL) quando comparados com os resultados obtidos com a celobiase que alcançou maior pico de produção com 629,2 UI/mL, durante a fermentação.

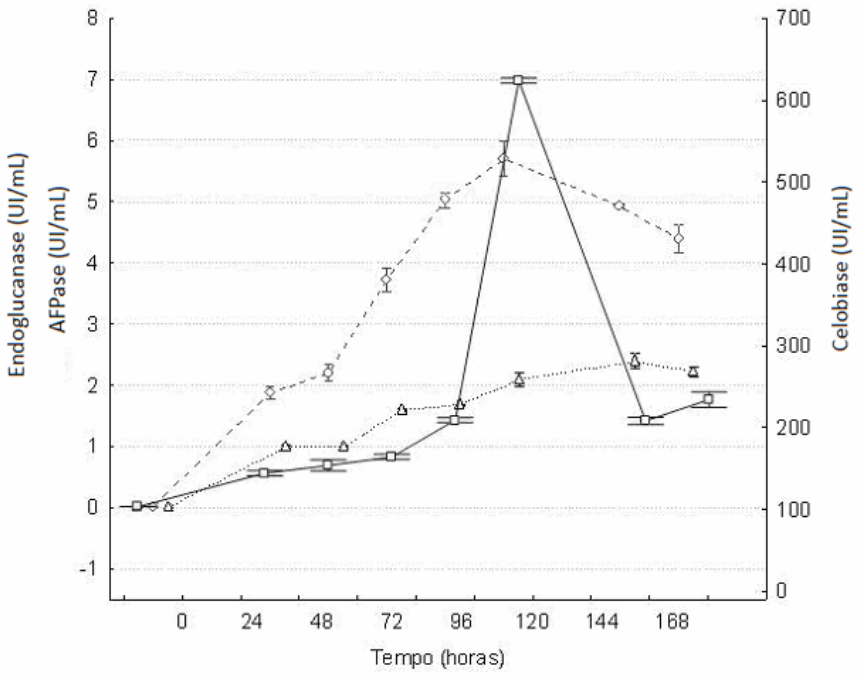


Figura 1. Produção de celulases em estado submerso utilizando o *T. viride* 2820. (Δ)CMCase; (□) celobiase; (◊) FPase.

Essa alta produtividade da celobiase encontrada neste experimento pode ser explicada. As condições de cultura e a elevação do pH durante a fermentação, são fatores que promove o aumento na produção desta enzima. Esse fato justifica o aumento da celobiase neste estudo, visto que o pH alcançado em seu pico máximo de produção foi 6,8 (dados não mostrados). Além disso, estudos mostram que espécies de *Trichoderma reesei* podem produzir mais de um tipo de celobiase aumentando assim sua quantidade no meio. A celobiase tem importante papel, também, na formação da CMCase e FPase.[18] Os dados desse experimento corroboram com um estudo realizado com o *T. viride* em meio Avicel no estado submerso. Esse fungo produziu 3 tipos de FPase, 3 tipos de CMCase e apenas uma celobiase, entretanto a produtividade desta ultima foi extremamente superior à produção das demais e sugeriram, ainda, que esta enzima apresenta ótimo potencial para a produção de bio-etanol.[11] Quando o *T. viride* foi utilizado em palha de arroz, a maior produtividade foi de CMCase em relação a FPase e celobiase, demonstrando a influência das condições de cultura sobre a produção das enzimas . [19]

Comportamento do complexo celulolítico em cromatografia de troca iônica

A FPase, CMCase e celobiase não adsorveram em matriz de CM-Celulose (Figura 2A); dois picos de atividade de celobiase (C_1TV e C_2TV) e FPase foram obtidos na etapa de lavagem da coluna. C_2TV foi o pico principal. A Tabela 1 mostra que os maiores valores de atividade específica, bem como fatores de purificação, foram obtidos para C_1TV e C_2TV.

Em coluna de DEAE-celulose as diferentes atividades também não adsorveram, contudo em relação à celobiase observou-se um comportamento distinto daquele detectado na

coluna de CM-celulose; C_2TV, que foi eluído após C_1TV na coluna de CM-celulose, foi o primeiro a ser obtido na DEAE-celulose (Figura 2B). Tal resultado revela que as atividades da celobiase observadas diferem em natureza de carga desde que, apesar da não adsorção ao trocador de íons, a fraca interação com a matriz foi suficiente para separar estas atividades em duas frações não adsorvidas. A presença de duas atividades com diferentes comportamentos na matriz trocadora de íons sugere a presença de duas formas moleculares de celobiase.

A ocorrência de isoformas de celulases também foi observada em estudos com o *Penicillium citrinum* em casca de arroz, que produziu duas CMCase e *Penicillium pinophilum*, produziu oito CMCase.[12,20] Um estudo utilizando apenas celulose e celulose mais xylana na produção de celulases mostrou que a celulose, como única fonte de carbono, produziu duas FPase e duas CMCase enquanto que a celulose mais xylana produziu apenas uma endoxilanase. [21] Os autores sugeriram que diferentes enzimas de uma mesma classe são produzidas quando utilizado uma única fonte de carbono no substrato associado ao fato que, as moléculas indutoras do substrato tendem a produzir enzimas semelhantes a elas mesmas.

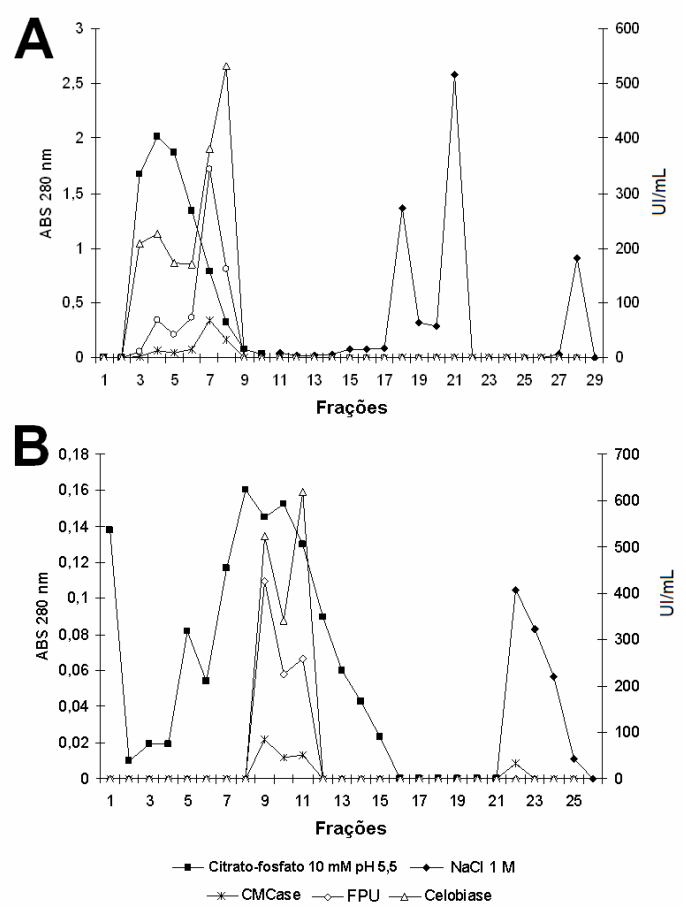


Figura 2. Cromatografia de F40-60% em colunas de CM-celulose (A) e DEAE-celulose (B). Citrato-fosfato 10 mM pH 5,5 foi utilizado na etapa de lavagem e as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl 1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e avaliadas quanto às atividades de exoglucanase (FPU), endoglucanase (CMCase) e β-glicosidase (celobiase).

Tabela 1. Perfil do complexo celulolítico

Etapas da Purificação	Proteína Total (mg/mL)	*atividade total (U)	Atividade específica (UI/mL^{-1})	Rendimento (%)	Fator de Purificação
		CMCase			
Extrato bruto	20	0,46	2,1	100	1
F40-60%	21	1,0	1,5	217,4	0,7
Cromatografia	3,9	4	6,2	869	2,9
		FPase			
Extrato bruto	20	1,3	5,7	100	1
F40-60%	21	2,1	3,1	161,5	0,5
Cromatografia	3,9	7,4	11,3	569	2,0
		Celobiase			
		C1TV			
Extrato bruto	22	140	629,2	100	1
F40-60%	21	403,5	576,4	288,2	0,9
Cromatografia	3,9	171,6	264,5	122,5	0,4
		C2TV			
Extrato bruto	22	140	629,2	100	1
F40-60%	21	403,5	576,4	288,2	0,9
Cromatografia	3,9	174	183,0	124,2	0,3

*-(μmol/min/mL)

Efeito da Temperatura e pH na atividade de Celobiase

O efeito da temperatura e do pH na atividade de C_1TVe C_2TVpode ser visto na Figura 3. Os dados mostram que houve diferença estatística entre as duas frações. À medida que diminuiu o pH e elevou-se a temperatura, houve aumento da atividade da C_1TV(A) em relação a C_2TV(B). Os diferentes valores de pH na temperatura de 50°C não influenciaram a atividade dessas enzimas. As melhores condições observadas, neste estudo, para a atividade da C_1TV(A) ocorreram nos pHs 4,0 e 4,8 a 60ºC, tendo a condição ótima em pH 4,0 (508 UI/mL), já a C_2TV(B) apresentou melhores resultados no pH 4,8 a 50°C (193,1UI/mL). A diferença no comportamento dessas enzimas sob as condições de pH e temperatura, reforça a indicação da presença de duas celobiases produzidas por *T. viride*.

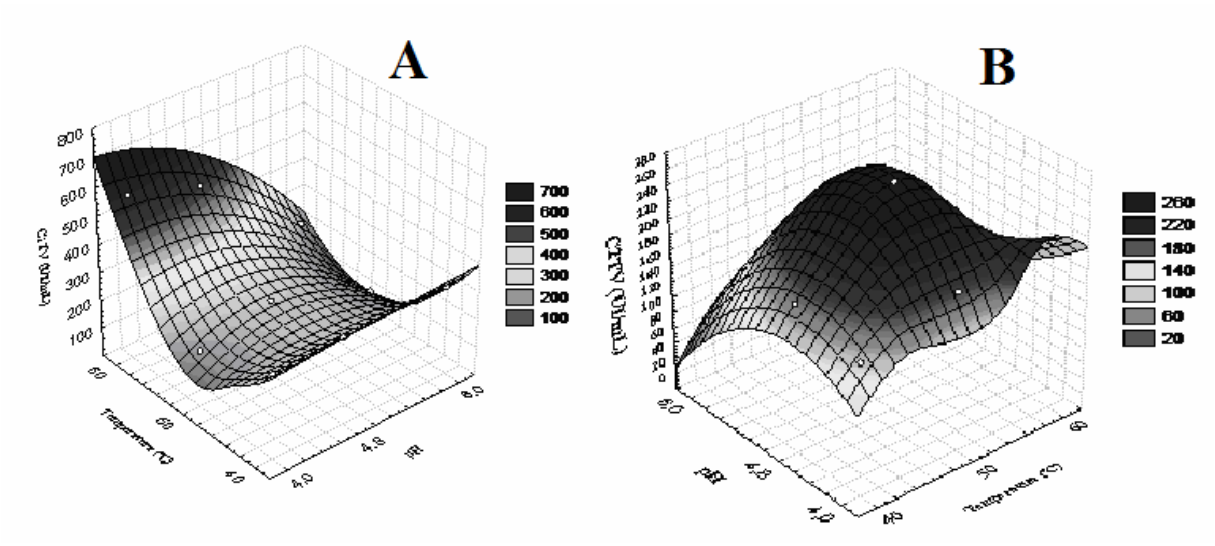


Figura 3. Efeito de diferentes pHs e Temperaturas sobre as frações C_1TV (A) e C_2TV (B) da Celobiase em UI/mL produzidas por *T. viride*.

Celobiase produzida por *Ceriporiopsis subvermispora* utilizando *chips* (2,5cm × 1,5cm × 0,2cm) de eucalipto, como substrato, foram submetidas a diferentes temperaturas

(40°- 70°C) e pHs (3,5; 5,0; 5,5 e 6,5). A maior atividade ocorreu a 70°C no pH 5,5 e em 50°C com pH 5,0.[22] As celulases FPase e CMCase produzidas por *Penicillium citrinum* apresentaram maior atividade enzimática quando foram submetidas a temperatura de 60°C e os pHs foram 6,5 e 8,5, respectivamente.[12]

Eletroforese

PAGE revelou que C_1TV e C_2TV apresentaram bandas polipeptídicas de natureza acídica. A C_1TV (Figura 4A1) apresentou 3 bandas enquanto que a C_2TV mostrou presença de uma única banda (figura 4A2). SDS-PAGE revelou que C_1TV (Figura 4B2) apresentou 8 polipeptídeos de massas moleculares 28,4; 33,7; 36,4; 42,7; 44,9; 49,6; 53,3 e 67 kDa, enquanto C_2TV (figura 4B3) apresentou 4 polipeptídeos de 28,4; 35,7; 40,5 e 56,7 kDa.

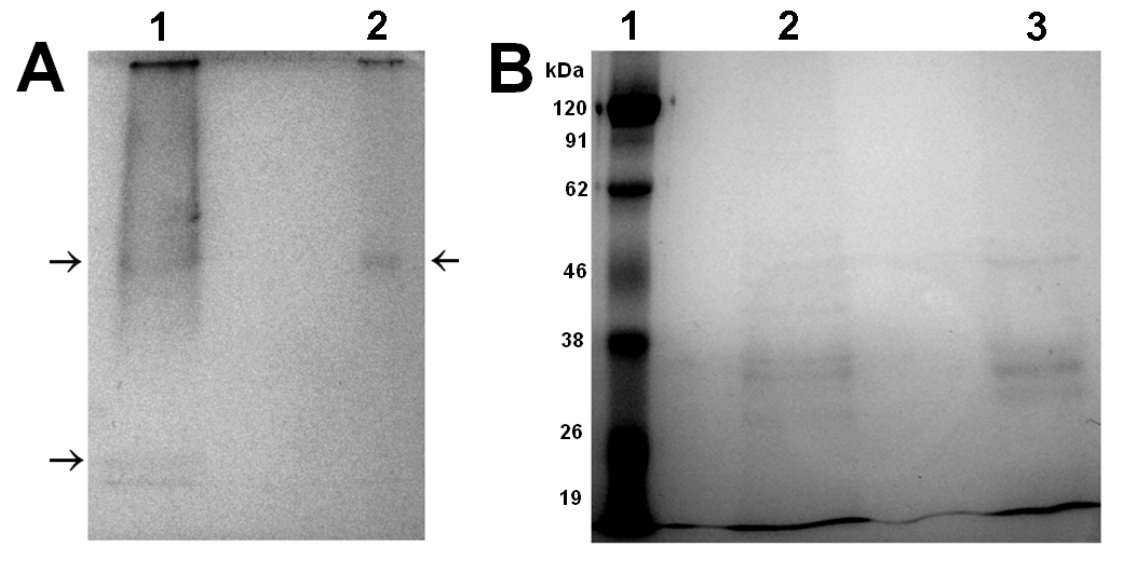


Figura 4. (A) PAGE para proteínas nativas acídicas de C_1TV (1) e C_2TV (2). (B) SDS-PAGE de C_1TV (2) e C_2TV (3). Marcadores de massa molecular (1) foram utilizados como padrão na eletroforese.

O perfil eletroforético de C_1TV em SDS-PAGE (Figura 4B2) reflete as múltiplas proteínas detectadas no gel para proteínas ácidas (Figura 4A1). Em C_2TV as bandas de diferentes massas moleculares detectadas (Figura 4B2) revelam as subunidades de C_2TV.

Além da celobiase, as proteínas detectadas em C_1TV podem corresponder a xilanases e/ou lacases. A natureza do substrato e o fungo utilizado nesse experimento podem ter contribuído para a produção dessas enzimas. A espécie *Trichoderma* tem sido relatada como bom produtor dessas enzimas.[21] Estudos utilizando o *Trichoderma*, entre eles, a espécie *viride* produziram celulases associadas à produção de xilanases e lacases.[19,18] Mesmo passando por lavagem em água para retirada parcial de lignina, o engaço ainda apresentou quantidades desse material ligado a celulose (dados não mostrados) o que provavelmente foi utilizado como substrato fermentativo para produção das xilanases e lacases.

8.2.4 Conclusão

De acordo com os resultados dessa pesquisa pode-se inferir que o engaço de bananeira, tratado com explosão de vapor é viável como substrato para a fermentação em estado submerso, utilizando o *T. viride*, pois durante o processo fermentativo foram produzidas uma FPase, uma CMCase e duas celobiases que diferiram entre si quanto ao perfil eletroforético e estabilidade. As celobiases C_1TV e C_2TV foram mais ativas quando submetidas a pH 4,0 a 60 ºC e pH 4,8 a 50 ºC, respectivamente. O melhor tempo de fermentação foi de 96 horas.

8.2.5 Bibliografia

1. Sun, W.; Cheng, C.; Lee, W. Protein Expression and Enzymatic Activity of Cellulases Produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on Rice Straw. *Process Biochemistry*. **2008**, v. 43, p. 1083-1087.

2. Graminha, E. B. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirota, R. D. P. B.; M. A. A.; Balsaobre, M. A.A.; Silva, R.; Gomes, E. Enzyme production by solid- state fermentation: Aplication to animal nutrition. *Animal Feed and Technology* ,**2008**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22.

3. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolisis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **2002**, v. 83, n. 1, p. 1-11.

4. ZANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

5. Sukumaran, R. K.; Singhania, R. R.; Mathew, G. M.; Pandey, A. Cellulase Production Using Biomass Feed Stock and its Application in Lignocelllose Saccharification for Bio-ethanol Production. *Renewable Energy*. **2009**, 34:421-424.

6. Hendriks, A. T. W.M.; Zeeman, G. Pretreatments to enhace the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Techonology*, **2009**, 100: 2, 10-18.

7. Wei, S. Z.; Chen, Z. H.; Hue, W.; Yu, R. M. Study on enzymatic hydrolysis of steam treated straw using a ball mill shaker. *Journal Beijing University Chemical Technology*, **2006**, 33: 6, p. 26-30.

8. Castilho, L. R.; Medronho, R. A. e Alves, T. L. M. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *A. niger*. *Process Biochemistry*, **1999**, v. 34, p. 181-186.

9. Quadri, M. B.; Cruz, J. M.; Santana, C. C. Modelagem numérica do processo de adsorção em coluna de insulina sobre a resina ACCEL plus. In: 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção,

maio de 1998, Florianópolis, SC. *Anais de Trabalhos Apresentados* Universidade Federal de Santa Catarina, p. 231-240, **2000**.

10.Chang, Y. K.; Chase. H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnology and Bioenginnering*, **1996**, v. 49, p. 512-526.

11. Zhou, J.; Wang, Y.; Chu, J.; Zhuan, Y.; Zhang, S.; Yin P. Identification and Purification of the Main Components of Cellulases from a Mutant Strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technology*, **2008**, v. 99, p. 6828-6833.

12. Dutta, T.; Sahoo, R.; Sengupta, R.; Ray, S. S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Industrial Microbiology Biotechnology*. **2008**, 35:275-282.

13. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Meansurement With the Folin Phenol Reagent. *Journal Biology and Chemistry*. **1951** v. 193, p. 265-275

14. Ghose, T. K. Mensurement of Cellulase Activies. *Pure and Appl. Chem*. **1987**, v. 59, n. 2, p. 257-268.

15. Davis, B.J. Disc electrophoresis. II Method and application to Human Serum Proteíns. *Annual N. Y. Acad. Sci*. **1964**, v. 121, p. 404-427.

16. Reisfiel, R. A.; Lewis, U.J.; Williams, D. E. Disk eletroforesis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*. **1962**, v. 195, p. 281-283, 1962.

17.Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the read of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227:680-5.

18. Juhász, T.; Szengyel, Z.; Réczey, K.; Siika-aho, M.; Viikari, L. Characterization of Cellulases and Hemicellulases Produced by *Trichoderma reesei* on Various Carbon Souces. *Process Biochemistry*. **2005**, v. 40, p. 3519-3525.

19. Liu, J.; Yuan, X.; Zengh, G.; Shi, J.; Chen, S. Effect of Biosurfactan on Cellulose and Xylanase Production By Trichoderma viride in Solid Substrate Fermentation. *Process Biochemistry*. **2006**, v. 41, p. 2347-2351.

20. Picart, P.; Diaz, P.; Pastor, F. I.J. Cellulases from two Penicllium sp. Strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letter Applied Microbiology*. **2007**, v. 45, p. 108-113.

21. Jorgensen, H.; Kutter, Jorg, P.; Olsson, L. Separation and Quantification of Cellulases and Hemicellulases by Capillary Eletroforesis. *Analytical Biochemistry*. **2003**, v. 317, 85-93.

22. Heidorne, F. O.; Magalhães, O. P.; Ferraz, L.; Milagres, A. M. F. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, v. 38, p. 436-442.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a produção de celulases utilizando o engaço de bananeira, como substrato, em meio submerso pelo *Trichoderma viride*. Pode-se considerar o engaço tratado com a explosão de vapor como uma alternativa viável para a produção de enzimas celulolíticas. A fermentação em estado submerso produziu CMCase, FPase e Celobiases. O *T. viride* produziu duas celobiases com diferentes perfis eletroforético com maior produção desta enzima que outros fungos celulolíticos. Assim, podemos concluir que tal estudo contribuiu de forma significativa não somente para comunidade científica, mas também para as indústrias. A utilização de resíduos como o engaço, na produção de enzimas celulolíticas, pode auxiliar tanto a indústria alimentícia, têxtil, farmacológica e produção de bioetanol, como também minimizar o impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMARANTE, C. B. Estudo da Obtenção do Complexo Enzimático de Celulases a partir de Resíduos Agroindustriais Regionais por Fermentação em Meio Sólido. 2005, 105f. **Dissertação** (mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará -UFPA, Belém.

CHUM, H. L.; ARVIZU, D. E. Biocombustíveis líquidos como alternativa viável para combustíveis fósseis. **Revista Brasileira de bioenergia**. V.8, n.3, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 10 out. 2009.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II Method and application to Human Serum Proteíns. **Annual N. Y. Acad. Sci**. **1964**, v. 121, p. 404-427.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Industrial Microbiology Biotechnology**. **2008**, 35:275-282.

GHOSE, T. K. Mensurement of Cellulase Activies. **Pure and Appl. Chem**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

FAO. Statistics Agricultural. Production. Crops. Disponível em: http://www.fao.org. Acesso em 20 de junho de 2008.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; M. A. A.; BALSALOBRE, M. A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid- state fermentation: Aplication to animal nutrition. **Animal Feed and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A . New Families in the classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-acid Sequence Similarities**. Biochemical Journal**, v. 293, n 3, p. 781-788, 1993.

HEINIMO, J.; JUNGINGER, M. Production and Trading of Biomass for Energy-na overview of the Global Status. **Biomass and Bionergy**, v. 33, p. 1310-1320, 2009.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas Analíticas, Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3 ed: São Paulo, v.1, 533p. 1985.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A . Cellulose : fascinating Biopolymer Anal Sustable Rw Material. Angew. **Chem., In Ed**, 44: 3358-3393, 2005.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the read of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-5, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Meansurement With the Folin Phenol Reagent. **Journal Biology and Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MUKHERJEE, A. K. e RAI,H. A . S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Egeneering Journal. 2007, dói: 10.1016/j.bej.2007.09.017

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje,** v. 41, n. 242, 2007.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em Humicola SP. Rev. Microbiol.1988**,** 19(1):78-81.

PANDEY, A.. SOCCOL, C.R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I – bioprocesses an products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

ROSALES, E.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of Food Processing Wastes for Production of Relevant Metabólites: application to Laccase production by *Trametes hirsuta.* **Journal of Food Engeneering,** v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos Processos Fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: Universitária/UFPel, 1996, v.1, 327p.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da Celulase de Fungos Isolados do Solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, n.2, p. 205-211. 2004.

REISFIELD, R. A.; LEWIS, U.J.; WILLIAMS, D. E. Disk eletroforesis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.

SHAH, M. P.; REDDY, G.V.; BANERJEE, R.; BABU, P. R.; KOTHARI, I. L. Microbial Degradation of Banana Waste Solid State Bioprocessing Using Two Lignocellulolytic Fungi (Phylostica spp. MPS-001 and *Aspergillus spp*. MPS-002). **Process Biochemistry,** v.40, n. , p. 445-451, 2005.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; SEETA LAXMAN, R.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology (2009),** doi:10.1016/j.biortech.2009.07.060.

SOFFNER, M. L. A. Produção de Polpa Celulósica a partir de Engaço de Bananeira. 2001. 70f. **Dissertação** (mestrado em Ciências – Ciências e Tecnologia da madeira). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz- Esalq, Piracicaba.

TEIXEIRA, S.; VELÁZQUEZ, M. S. G.; APOLINÁRIO, S. M. Biomass as na energy source: the brazilian perspectives. **Revista Brasileira de Bioenergia**, v.. 10, n. 2, 35-39, 2007.

VAN SOEST, P. J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. **J. Anim. Sci**, 24(3):834-843,1965.

ANEXOS

11. ANEXO A

YAHOO! BRASIL MAIL Classic

Re: Publicação Sábado, 30 de Janeiro de 2010 10:29

De: "Autores" <autores@higienealimentar.com.br>

Para: "marilene silva lima" <marilenelima02@yahoo.com.br>

Informo que o trabalho POTENCIAL DO ENGAÇO DA BANANEIRA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS está aprovado para publicação na Revista Higiene Alimentar v.24, n.185, junho/2010.

Atmte.
Sílvia P.Nascimento
Coordenadora Científica

----- Original Message -----
From: marilene silva lima
To: autores@higienealimentar.com.br
Sent: Thursday, January 21, 2010 9:47 AM
Subject: Publição

Bom dia,
Recebi em 28/07/2009 o parecer referente ao aceite do artigo entitulado POTENCIAL DO ENGAÇO DA BANANEIRA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS. Gostaria de saber se o mesmo já foi publicado ou se já possui numero e volume para que eu possa anexar na minha tese. O mesmo faz parte do meu trabalho de conclusão do Doutorado. Aguardo noticias
Atenciosamente Marilene Lima

ANEXO B

E-mail | Contatos | Agenda | Bloco de notas | Quais as novidades? | E-mail por celular | Opções

Verificar e-mail | Novo | Busca de e-mail | Experimente o novo Yahoo! Mail

Você quer namorar?

Pastas
Entrada (581)
Rascunhos (1)
Enviadas
Spam (1) [Esvaziar]
Lixeira [Esvaziar]

Minhas fotos
Meus anexos

Bate-papo [Ocultar]
Eu estou Invisível
1 Contato online [Adicionar]
vivianne_padilha - Ocupado
Não listado? Novo bate-papo
Configurações

Minhas pastas [Adicionar - Editar]
Doutorado 2009
Mestrado 2009
Pibic 2009 (3)

anterior | próxima | Voltar para as mensagens | Marcar como não lida | Imprimir

Apagar | Responder | Encaminhar | Spam | Mover...

[QN] - SubmissãoTemporária - tmp tmp_5821
Terça-feira, 2 de Fevereiro de 2010 13:28
De: "sbqedit@iq.usp.br" <sbqedit@iq.usp.br>
Para: tlmstamford@yahoo.com.br

REF.: tmp tmp_5821

Prezado Prof. Stamford, Tânia Lúcia

Obrigado por submeter seu manuscrito "Produção e Purificação Parcial de Celulases a Partir do Resíduo da Bananeira (Musa spp.) Utilizando O Trichoderma viride 2820 em Estado Submerso" para publicação na Química Nova, QN.

O NÚMERO TEMPORÁRIO é: tmp_5821 tmp.

Assim que o seu arquivo PDF for verificado, o seu manuscrito será inserido no sistema, e você receberá um outro e-mail com o NÚMERO DE REFERÊNCIA, confirmando assim a submissão.

Caso você tenha alguma outra dúvida a respeito desta submissão, por favor, entre em contato com a Gerente Editorial da QN no e-mail: sbqedit@iq.usp.br.

Atenciosamente,

Pricila Gil
SBQ - gerente editorial
Caixa Postal: 26037
05513-970 São Paulo - SP

Tel.: +55.11.30322299
Fax.: +55.11.38143602
web: http://quimicanova.sbq.org.br
e-mail : sbqedit@iq.usp.br

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo