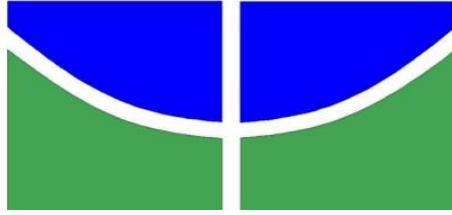


**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Produção e caracterização de mananase
de *Aspergillus foetidus* cultivado em
casca do grão da soja**

Juliana da Conceição Infante de Marco

Brasília / DF
Fevereiro / 2014



**Produção e caracterização de mananase de
Aspergillus foetidus cultivado em casca do
grão da soja**

Juliana da Conceição Infante de Marco

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Microbiana da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília / DF
Fevereiro / 2014

**Produção e caracterização de mananase de
Aspergillus foetidus cultivado em casca do grão da
soja**

Juliana da Conceição Infante de Marco

Orientador:

- Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Banca examinadora:

- Prof^a. Dr^a. Mariana de Souza Castro
- Prof^a. Dr^a. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima

Brasília / DF
Fevereiro / 2014

*“Quando a gente sabe que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas”.*

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

À minha família,

Meus pais Sandra e João Carlos, responsáveis pela minha existência. Pelo amor, carinho e dedicação que tiveram ao decorrer da minha formação pessoal e educacional, dando-me sempre apoio para seguir o meu sonho. À irmã Roberta e ao cunhado Alexandre, por todo carinho, apoio, companheirismo, atenção e estadia durante a reta final do mestrado. Ao meu irmão Marcus e à cunhada Thais, pelo carinho, apoio e momentos de conversas e diversão;

Ao meu amado esposo Mágnio, pelo amor, carinho, união e força para enfrentar esse último ano de muitas mudanças e lutas à distancia. Pela saudade, dedicação, conselhos, atenção, apoio, enfim, por me amar em todos os momentos, e por me fazer crer que sou capaz de ir além;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por ter me recebido no laboratório de enzimologia, incentivando-me desde o início da minha vida acadêmica. Pela paciência, dedicação, ensinamentos, apoio e conversas durante esses 3 anos de convivência. Por acreditar no meu potencial e crescimento, contribuindo muito para minha formação;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Félix, por estar sempre disposto na resolução de dúvidas, por todos os ensinamentos e sugestões, sempre com muito carinho;

À Prof^a. Dra. Eliane Ferreira Noronha pela disponibilidade e atenção na resolução de dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos do laboratório de enzimologia: Antonielle Monclaro, Bárbara Neumann, Brenda Camargo, Caio Gorgulho, Dayane Serpa, Débora Sciuto, Elaine Nascimento, Elizabeth Chaves, Francilene Lopes, Gilvan Duarte, Guilherme Sperandio, Helder Andrey Gomes, Karen Osiro, Leonora Moreira, Marcela Campos, Paula Jaramillo, Pedro Hamann, Priscila Lima e Rachel. Ainda, às técnicas Margarete Lima e Marísia Cortes, pela amizade,

companheirismo e por todos os momentos que passamos juntos e que ficarão guardados na memória e no coração. Todos vocês foram de grande importância para o meu amadurecimento acadêmico;

À todos os meus familiares e amigos queridos que sempre me apoiaram, perto ou longe, com suas orações e pensamentos positivos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana pela qualidade e estrutura oferecidas para o desenvolvimento do projeto;

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em nosso Deus interior.” (Aristóteles)

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro do CNPq, por meio de concessão de bolsa de estudos. E pelos projetos de pesquisa: Redes Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	01
1.1. Biomassa lignocelulósica.....	01
1.1.1. Manana.....	04
1.2. Enzimas de degradação da biomassa lignocelulósica.....	08
1.2.1. Mananases.....	10
1.2.2. Produção e aplicação industrial de Mananases.....	13
1.3. O fungo filamentoso <i>Aspergillus foetidus</i>.....	14
1.4. Soja.....	16
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	19

3.2.	Metas Estabelecidas.....	19
4.	Materiais e Métodos.....	20
4.1.	Fontes de carbono e pré-tratamento.....	20
4.2.	Análise bromatológica da casca do grão da soja.....	20
4.3.	Microrganismo e condições de cultivo.....	22
4.4.	Reagentes.....	23
4.5.	Curva de Indução Enzimática.....	23
4.6.	Determinação da atividade enzimática.....	24
4.7.	Quantificação de proteínas.....	25
4.8.	Etapas de purificação e caracterização.....	25
4.8.1.	Ultrafiltração.....	26
4.8.2.	Cromatografia.....	26
4.8.3.	Eletroforese SDS-PAGE.....	26
4.8.4.	Coloração com nitrato de prata.....	27
4.8.5.	Zimografia.....	27
4.8.6.	Espalhamento de luz dinâmico (ELD)	28

4.9.	Caracterização enzimática.....	28
4.9.1.	Efeito da temperatura na atividade de mananase.....	28
4.9.2.	Efeito do pH na atividade de mananase.....	28
4.9.3	Avaliação da Termoestabilidade na atividade de mananase.....	29
4.9.4	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	29
4.9.5	Influência de íons metálicos na atividade de mananase.....	29
4.9.6	Efeito de compostos fenólicos.....	30
4.9.7	Efeito de licor de auto-hidrólise.....	30
5.	Resultados e Discussão.....	32
5.1.	Análise bromatológica da casca do grão da soja.....	34
5.2.	Curva de indução enzimática.....	35
5.3.	Quantificação de proteínas e atividade específica da mananase no EB.....	36
5.4.	Ultrafiltração.....	38
5.5.	Cromatografia de exclusão molecular.....	39
5.6.	SDS-PAGE e Zimograma.....	40
5.7.	Espalhamento de luz dinâmico (ELD).....	41

6.	Caracterização enzimática.....	43
6.1.	Efeito da temperatura na atividade de mananase do concentrado e de man 58.....	43
6.2.	Efeito do pH na atividade de mananase do concentrado e de man 58.....	45
6.3.	Avaliação da termoestabilidade da atividade de mananase no concentrado e man 58.....	47
6.4.	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	50
6.5.	Influência de íons metálicos na atividade de mananase de man 58.	51
6.6	Efeito de compostos fenólicos.....	52
6.7	Efeito de licor de auto-hidrólise.....	53
7.	Considerações Finais e Perspectivas.....	55
8.	Referências Bibliográficas.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da parede celular vegetal.....	01
Figura 2.	Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose	02
Figura 3.	Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas.....	06
Figura 4.	Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas e enzimas requeridas para sua hidrólise.....	12
Figura 5.	(A) Visualização macroscópica de <i>A. foetidus</i> e (B) visualização em microscópio óptico de <i>A. foetidus</i> com aumento de 400x.....	15
Figura 6.	(A) Casca do grão da soja e (B) Casca do grão da soja moída.....	17
Figura 7.	Diagrama das etapas de caracterização de mananase a partir do extrato bruto (EB) de <i>A. foetidus</i> , cultivado em casca do grão da soja como fonte de carbono.....	25
Figura 8.	Atividades hemicelulolíticas (xilanase e mananase), celulolíticas (CMcase, avicelase e FPase) e pectinolítica (pectinase) do extrato bruto (EB) de <i>A. foetidus</i> crescido na presença da casca do grão da soja e dos resíduos da colheita da soja.....	33

- Figura 9.** Curva de indução da atividade de mananase, pectinase e xilanase de *A. foetidus* crescido em meio líquido contendo casca do grão da soja 1% ao longo de 20 dias..... 36
- Figura 10.** Comparação da curva de indução da atividade de mananase de *A. foetidus* em meio líquido contendo casca do grão da soja 1% ao longo de 20 dias com (A) a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), e (B) a atividade específica expressa em $U.l.mg^{-1}$ 37
- Figura 11.** Perfil cromatográfico do concentrado em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100..... 39
- Figura 12.** Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações coletadas na cromatografia em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100..... 41
- Figura 13.** Gráfico do espalhamento de luz dinâmico (ELD) de man 58.... 42
- Figura 14.** Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase do (A) concentrado e (B) man 58..... 44
- Figura 15.** Efeito do pH sobre a atividade de mananase no (A) concentrado e (B) man 58..... 46
- Figura 16.** Termoestabilidade de mananase do concentrado nas temperaturas de (A) 40°C, 50°C e 60°C durante 18 dias e (B) 70°C e 80°C durante 19 horas..... 48

- Figura 17.** Termoestabilidade de man 58 nas temperaturas de (A) 40°C, 50°C e 60°C durante 11 dias e (B) 70°C e 80°C durante 19 horas..... 49
- Figura 18.** Efeito da concentração de manana na atividade de man 58 utilizando o software Enzifitter..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas das principais enzimas necessárias para degradar a lignocelulose até monômeros.....	08
Tabela 2.	Análise bromatológica da casca do grão da soja.....	34
Tabela 3.	Atividade enzimática de mananase, xilanase e pectinase no concentrado e no ultrafiltrado expressa em UI.mL ⁻¹	38
Tabela 4.	Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de man 58.....	51
Tabela 5.	Efeito de compostos fenólicos na atividade de man 58.....	53
Tabela 6.	Efeito do licor de auto-hidrólise na atividade de man 58.....	54

ABREVIATURAS

BDA: Batata-dextrose-ágar

CMC: Carboximetil-celulose

DNS: Ácido 3,5-dinitro-salicílico (3,5-Dinitrosalicylic acid)

EB: Extrato Bruto

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

ELD: Espalhamento de luz dinâmico

FP: Papel de Filtro

KM: Constante de Michaelis-Menten

Man 58: Mananase semi-purificada

pH: Potencial Hidrogeniônico

SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
(Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TCA: Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid)

UI: Unidade Internacional

Vmax: Velocidade máxima

RESUMO

A casca do grão da soja, um resíduo agroindustrial que possui em sua estrutura elevado teor de manana, foi utilizada no cultivo do fungo *Aspergillus foetidus* para a produção de mananases. A curva de indução enzimática demonstrou um aumento progressivo na produção de mananase, chegando ao máximo no 15º dia de cultivo, com atividade de $1,987 \text{ UI.mL}^{-1}$ quando o fungo foi cultivado em casca do grão da soja. O concentrado, obtido pelo procedimento de ultrafiltração, quando incubado a 60°C em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 apresentou atividade de mananase de $6,392 \text{ UI.mL}^{-1}$ e termoestabilidade a 60°C com atividade de $6,448 \text{ UI.mL}^{-1}$ no 2º dia de incubação, perdendo 50% de atividade no 12º dia. O concentrado foi aplicado em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100, e as frações apresentando atividade de mananase (58-65) foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes e análise por zimografia. A fração 58, denominada man 58, apresentou maior atividade de mananase, sendo selecionada para posteriores passos de caracterização. Man 58 foi mais ativa em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 a 60°C , atingindo maior atividade no 1º dia de incubação ($1,015 \text{ UI.mL}^{-1}$) e mantendo-se estável durante os 11 dias nos quais sua estabilidade à temperatura foi avaliada. Os valores de K_M e V_{max} de man 58 foram $3,29 \text{ mg/mL}$ e $1,76 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente. Man 58 foi ativada na presença de CaCl_2 , FeSO_4 e NaCl , mas foi inibida por AgNO_3 , CoCl_2 , MgSO_4 , FeCl_3 , CuSO_4 , MgCl_2 , ZnCl_2 , ZnSO_4 , CuCl_2 , KCl , e EDTA . Os seis compostos fenólicos testados não apresentaram efeito inibitório significativo em man 58. Os licores de auto-hidrólise inibiram man 58. Quando avaliada por espalhamento de luz dinâmico (ELD), observou-se a presença de outras enzimas agregadas à man 58.

Palavras-chave: Casca de soja, mananase, *Aspergillus foetidus*, man 58.

ABSTRACT

The soybean husk is an agricultural residue presenting in its structure a high level of mannan. It was used as carbon source in the cultivation of *Aspergillus foetidus* aiming the production of mannanase. The curve of enzyme induction showed a progressive production of mannanase, reaching a maximum on the 15th day of cultivation, on soybean husk. The concentrate obtained by ultrafiltration when incubated at 60°C in sodium acetate buffer pH 4.0 50 mM showed activity of mannanase of 6,392 UI.mL⁻¹ and thermostability at 60°C with activity of 6,448 UI.mL⁻¹ on the 2nd day of incubation, losing 50% activity on the 12th day. The concentrate was submitted to chromatography on Sephacryl S-100 gel filtration column, and the fractions showing the activity of mannanase (58-65) were submitted to electrophoresis under denaturing conditions and zymography analysis. The fraction 58 showed better activity of mannanase, called man 58, being selected for further characterization steps. Man 58 was most active at 50 mM sodium acetate buffer pH 4.0 50 mM at 60°C, reaching higher activity on 1st day of incubation (1.015 UI.mL⁻¹) and remained stable during the 11 days when their temperature stability was evaluated. The KM and Vmax values were 3.29 mg/mL and 1.76 IU.mL⁻¹, respectively. Man 58 was activated in the presence of CaCl₂, FeSO₄ and NaCl, but it was inhibited by AgNO₃, CoCl₂, MgSO₄, FeCl₃, CuSO₄, MgCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄, CuCl₂, KCl and EDTA. The six phenolic compounds tested showed little inhibitory effect on man 58. The auto-hydrolysis liquors inhibited man 58. When evaluated by dynamic light scattering (DLS), it was observed the presence of other enzymes aggregated with man 58.

Keywords: Soybean husk, mannanases, *Aspergillus foetidus*, man 58.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomassa lignocelulósica

A lignocelulose, é o principal componente da biomassa vegetal e representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável (Howard *et al.*, 2003). Sua estrutura consiste de uma matriz complexa de celulose, hemicelulose e lignina com uma proporção aproximada de 2:1:1 (Silva *et al.*, 2009) e pequenas quantidades de extrativos, sais minerais, proteínas e pectina (figura 1) (Daschtban *et al.*, 2009; Ferraz, 2010). O termo holocelulose é utilizado para designar os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal (Andreaus *et al.*, 2008).

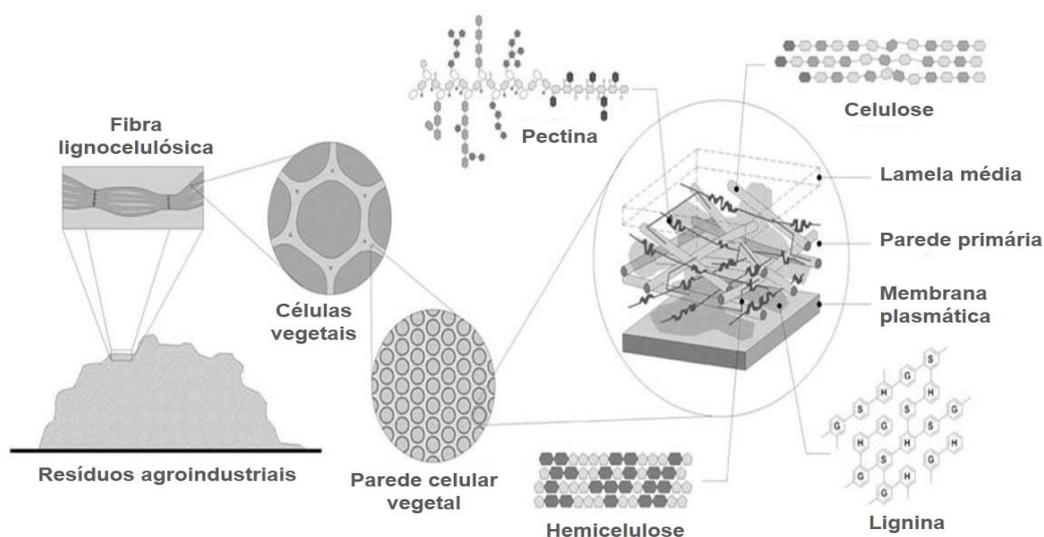


Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal. Adaptado de Siqueira & Filho, 2010.

A composição da lignocelulose varia dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita, condição ou estágio de crescimento (Jeffries & Jin, 2000). Resíduos agrícolas como cascas, caroços, sementes, ramas, bagaços, etc. são fontes de proteínas (enzimas), fibras e óleos, e podem ser utilizados como substrato na elaboração de produtos com maior valor agregado, possuindo aplicações como fonte de energia ou matéria-prima para indústrias

alimentícias e de bioconversão a etanol (Garmus *et al.*, 2009; Octave & Thomas, 2009).

A celulose é o componente mais abundante da biomassa lignocelulósica (cerca de 50%), e suas fibras encontram-se embebidas em uma matriz de hemicelulose (cerca de 30-35%) e lignina (cerca de 20-23%). É um polímero linear com regiões cristalinas altamente organizadas e regiões amorfas onde as cadeias estão agrupadas de maneira mais irregular, sendo assim, mais suscetíveis ao ataque enzimático. Sua cadeia é formada exclusivamente por moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 (Ferraz, 2010). A unidade repetitiva da celulose, chamada de celobiose, é composta por duas moléculas de glicose esterificadas por ligações β -1,4, contendo seis grupos hidroxila que interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (figura 2). Essas ligações de hidrogênio proporcionam uma forte tendência de a celulose formar cristais tornando-a completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Silva *et al.*, 2009).

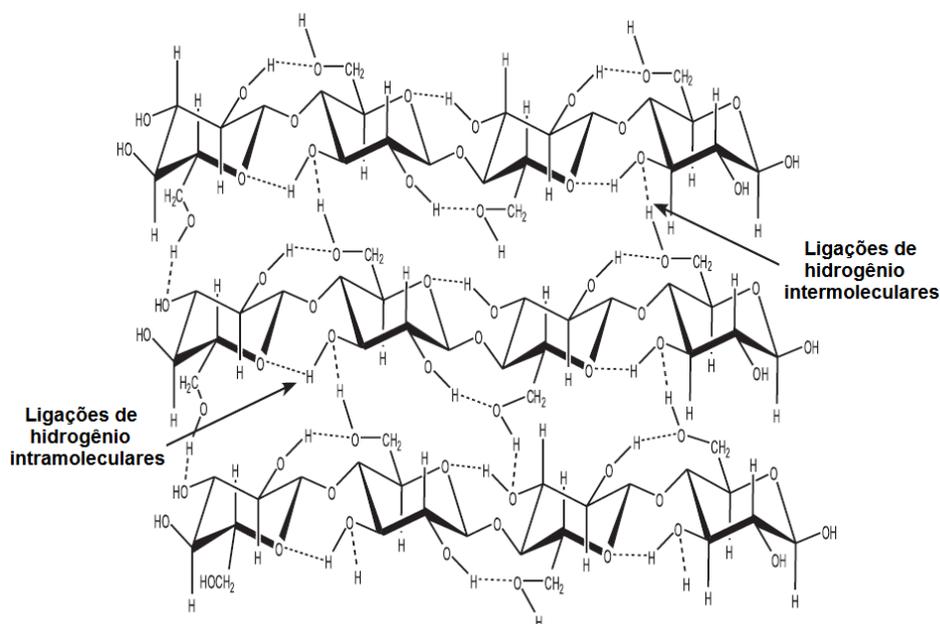


Figura 2. Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose. Adaptado de Santos *et al.*, 2012.

A hemicelulose é o segundo maior constituinte da biomassa lignocelulósica. Seus componentes na parede celular de plantas incluem uma variedade de polissacarídeos com polímeros lineares ou ramificados, compostos ao todo por cinco monossacarídeos comumente encontrados na natureza, sendo estes as pentoses xilose e arabinose, as hexoses glicose, manose e galactose e o ácido glicurônico (Filho, 1998; Gray *et al.*, 2006).

As classes de hemicelulose são nomeadas de acordo com a unidade principal de açúcar. A maior parte dos açúcares da cadeia principal na estrutura da hemicelulose estão unidos entre si por ligações do tipo β -1,4 (Polizeli *et al.*, 2005), formando uma ligação cruzada em uma rede muito resistente (Shalon & Shoham, 2003) e, dependendo da composição da cadeia de açúcar, elas podem ser classificadas como arabinoxilana, acetilglicuronoxilana, xilana, xiloglicana, arabinana, arabinogalactana, galactomanana, glicomanana e galactoglicomanana (Moreira *et al.*, 2011). Desta forma, o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim um conjunto de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos possuindo, cada componente, propriedades distintas (Santos, 2008).

As duas hemiceluloses mais importantes e representativas são as hetero-1,4,- β -D-xilanas, que compreendem o principal componente hemicelulósico em angiospermas e gramíneas e as hetero-1,4,- β -D-mananas, que estão presentes na parede celular de gimnospermas e em estruturas especializadas como sementes e frutos (Moreira & Filho, 2008; Girio *et al.*, 2010; Van Zyl *et al.*, 2010). Xiloglicanas e galactomananas são encontradas tanto na parede primária (função estrutural), como com função de reserva em sementes de algumas espécies (Lima, 2002).

1.1.1. Manana

A cadeia principal de manana consiste de resíduos de manose unidos por ligações do tipo β -1,4 ou uma combinação de resíduos de glicose e manose associados pelo mesmo tipo de ligação. Além disso, a cadeia principal da manana pode ter cadeias laterais ligadas a resíduos de α -1,6-galactose (Moreira & Filho, 2008). A manana pode ser classificada em quatro subfamílias: manana linear, glicomanana, galactomanana e galactoglicomanana (Petkowicz *et al.*, 2001).

A manana linear está presente no endosperma de sementes, proporcionando dureza e resistência a danos mecânicos (exposição a água) em diversas espécies de plantas, tais como semente de marfim (*Phytelephas spp.*), café verde (*Coffea spp.*), polpa seca do côco (copra), sendo encontrada também na parede celular de algumas algas (*Codium spp.*) (Chauhan *et al.*, 2012).

As glicomananas representam o constituinte mais abundante da hemicelulose das gimnospermas. Sua cadeia principal é formada por resíduos de manose e glicose intercalados na proporção 2:1 unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Sua estrutura pode conter também unidades de galactose dispostas lateralmente à cadeia do polímero por ligação glicosídica do tipo α -1,6 sendo representada pelas galactoglicomananas (Martins, 2012).

Cadeias lineares de mananas e glicomananas contendo mais de 5% (p/p) de D-galactose são denominadas galactomananas e galactoglicomananas, respectivamente (Moreira e Filho, 2008; Van Zyl *et al.*, 2010).

As galactomananas estão presentes em gimnospermas, mas são mais comumente encontradas na família Leguminosae, podendo representar de 1 a 38% do peso seco da semente. Foram identificadas em outras espécies de plantas das famílias Ebenaceae e Palmae, como *Coffea arabica*, *Cocos nucifera*, *Phoenix dactylifera*, *Elaies guinensis*, *Phytelephas macrocarpa*, entre

outros (Dea & Morrison, 1975; Dey, 1978; Ademark, *et al.*, 1998; Vries & Visser, 2001; Srivastava & Kapoor, 2005). Em alguns casos excepcionais, como *Glycine max*, *Gymnocladus dioica* e *Mucuna* a goma ocorre na casca, no lado interior do tegumento e no interior da semente, respectivamente (Srivastava & Kapoor, 2005).

Atualmente, as galactomananas tem atraído o interesse acadêmico e industrial, devido a sua propriedade em formar soluções viscosas ou géis em meio aquoso. A goma da galactomanana pode ser utilizada de diversas formas para o uso humano, como retentores de água, espessantes, gelificantes, emulsificantes, ligantes, bem como formadores de películas. Todas essas características têm possibilitado o seu uso em diversos setores, tais como indústria de papel, têxtil, petrolífera, farmacêutica, de alimentos, de cosméticos, de explosivos e etc. As propriedades das gomas podem ser reforçadas pela interação com outros monômeros e polímeros, principalmente por sua capacidade de interagir de forma sinérgica, devido aos inúmeros grupos OH presentes (Srivastava & Kapoor, 2005). A estrutura representativa das quatro diferentes formas de mananas está ilustrada na figura 3.

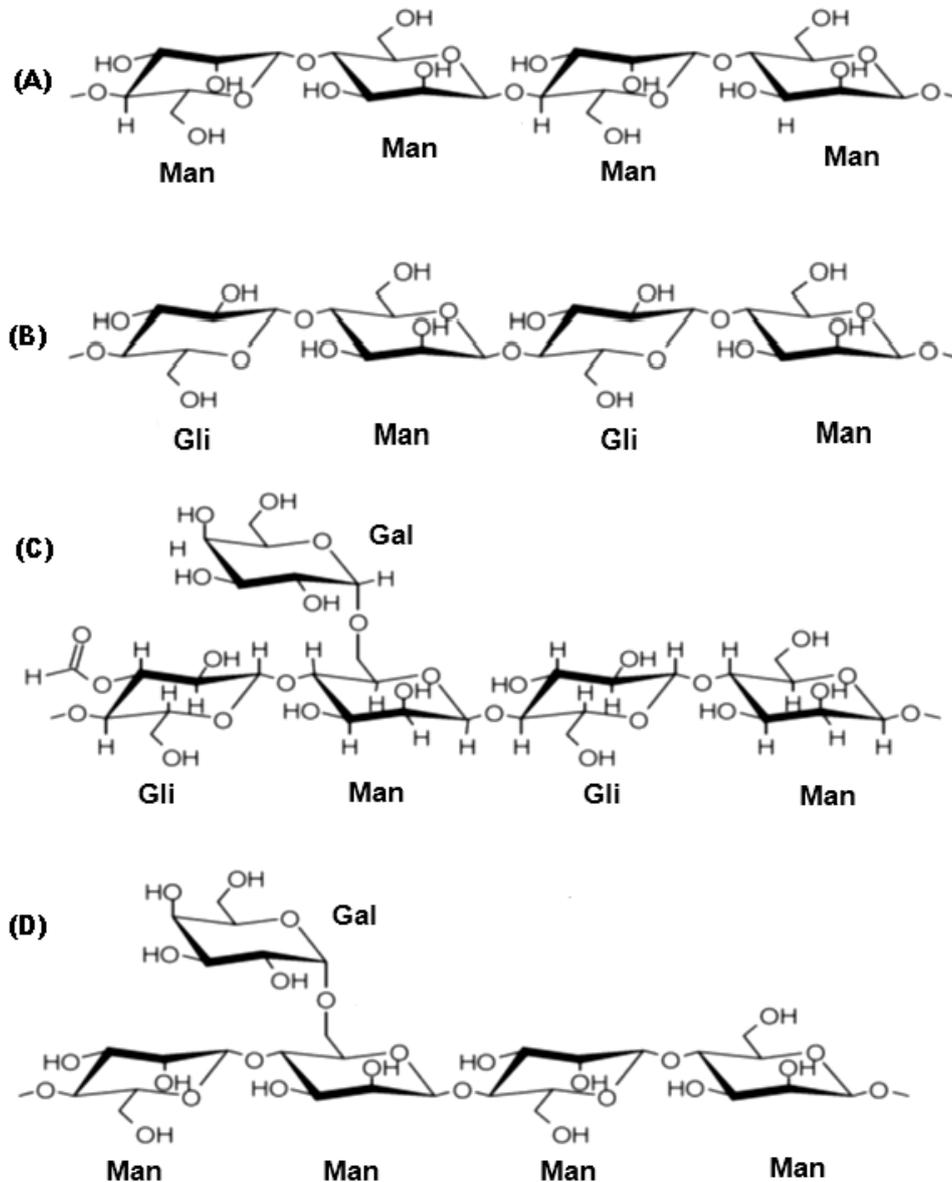


Figura 3. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas. (A) manana linear, (B) glicomanana, (C) galactoglicomanana, (D) galactomanana. Adaptado de Van Zyl *et al.*, 2010.

As pectinas são polissacarídeos heterogêneos, que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células vegetais superiores. Consiste em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1,4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como cadeias laterais (Uenojo & Pastore, 2007; Scheller & Ulvskov, 2010).

A lignina está associada com a celulose e a hemicelulose na composição da lignocelulose, sendo uma macromolécula hidrofóbica com estrutura tridimensional altamente ramificada de álcoois aromáticos (Sun & Cheng, 2002; Silva *et al.*, 2009) constituídos por unidades de fenilpropano, tais como álcool p-cumárico, coniferílico, guaiacílico, siringílico e sinapílico. É encontrada na maioria das plantas superiores e em concentração mais alta na lamela média do que nas subcamadas da parede secundária dos traqueóides, vasos, fibras, etc. sendo muito resistentes à degradação (Abreu & Oertel, 1999; Hendriks & Zeeman, 2009). Compreende cerca de 20-30% do material lignocelulósico, e envolve as células funcionando como uma “cola” que confere coesão à estrutura celular (Ferraz, 2010). O papel da lignina na parede celular das plantas é conferir suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo (Jovanovic *et al.*, 2009).

Os extrativos consistem de ceras, gorduras, resinas, taninos, óleos essenciais, compostos fenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois e substâncias inorgânicas e compreendem cerca de 2-4% do material lignocelulósico (Kuhad & Singh, 2007; Ferraz, 2010).

1.2. Enzimas de degradação da biomassa lignocelulósica

A busca por enzimas, especialmente de origem microbiana, é cada vez maior devido às suas aplicações em uma grande variedade de processos industriais (Chapla *et al.*, 2010)

A degradação da biomassa lignocelulósica por fungos ocorre de forma extracelular e é atribuída à ação de uma série de enzimas que atuam sinergicamente. Os componentes da biomassa lignocelulósica devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores tornando-se suscetíveis ao transporte através da parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos (Sylvia *et al.*, 1998; Moreira & Siqueira, 2002; Ferraz, 2010). Na tabela 1 estão listadas algumas das principais enzimas necessárias para degradar a lignocelulose até monômeros.

Tabela 1. Algumas das principais enzimas necessárias para degradar a lignocelulose até monômeros. *Fonte:* Van Dyk & Pletschke, 2012.

Celulose	Hemicelulose	Pectina	Lignina	
celobiohidrolase	endo-xilanase	acetil xilana esterase	pectina metil esterase	lacase
endoglicanase	β -xilosidase	endomananase	pectato liase	manganês peroxidase
β -glicosidase	β -manosidase	α -L-arabinofuranosidase	poligaracturonase	lignina peroxidase
	α -glicuronidase	ácido ferúlico esterase	ramnogalacturonano liase	
	α -galactosidase	ácido p-coumárico esterase		

As celulases são produzidas por bactérias e fungos, sendo que, poucas espécies são capazes de produzir celulases suficientes para solubilizar a celulose cristalina (Bhat & Bhat, 1997). Para que ocorra a completa hidrólise da celulose é necessária a ação de três grupos de enzimas atuando sinergicamente. Esses grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.4, endocelulase), que rompem a molécula de celulose criando extremidades redutoras e não-redutoras e liberando fragmentos menores que servem de substrato para as exo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.91, exo-glicosidase ou celobiohidrolase) que clivam moléculas de celobiose a partir da celulose ou de oligossacarídeos derivados de celulose, sendo específica para extremidades redutoras e não-redutoras e as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21, celobiase) que liberam D-glicose das extremidades não-redutoras de oligossacarídeos provenientes da celulose, especialmente a celobiose (Jovanovic *et al.*, 2009; Ferraz, 2010).

As hemicelulases são produzidas por vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras já investigados e relatados na literatura. São componentes-chave na degradação da biomassa e do fluxo de carbono na natureza. A estrutura variável e organização da hemicelulose exige uma ação combinada de muitas enzimas, atuando de forma sinérgica, para sua completa degradação (Shalon & Shoham, 2003). Sua hidrólise ocorre de forma semelhante da celulose, onde as enzimas envolvidas nesse processo são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligação existentes no polímero. Assim, as hemicelulases são divididas em dois grupos: endo-hemicelulases e exo-hemicelulases (Ferraz, 2010).

As xilanas e mananas geralmente possuem diferentes grupos substituintes ligados à cadeia principal, sendo necessárias enzimas auxiliares para removerem esses grupos e darem acesso às enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal. No caso das xilanas, algumas enzimas auxiliares são α -L-arabinofuranosidases, α -glicuronidase, acetil xilana esterase e ácido ferúlico esterase, que clivam especificamente as ligações entre

hemicelulose e lignina. α -L-arabinofuranosidasas possuem diferentes especificidades, algumas clivam ligações α -1,2 ou α -1,3, enquanto que outras são capazes de clivar resíduos de arabinose a partir de arabinoxilana (Meyer *et al.*, 2009).

As pectinases são produzidas por várias espécies de plantas e microrganismos e incluem enzimas como pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante), que removem os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (Uenojo & Pastore, 2007).

A lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas como a maioria dos outros polímeros naturais (celulose, amido, proteínas, etc). A biodegradação da lignina é um processo oxidativo, que envolve enzimas como a lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e lacase (Souza, 2008).

1.2.1. Mananases

As mananases são enzimas classificadas como carboidrases e são responsáveis por degradar cadeias de mananas que encontram-se naturalmente presentes na fração da hemicelulose juntamente com celulose e lignina, compondo a parede celular de diversas espécies vegetais (Weingartner, 2010). Características como proporção e distribuição de manose e glicose na cadeia principal da manana, são importantes para determinar as enzimas responsáveis para sua completa degradação (McCleary, 1991).

Para que ocorra a completa hidrólise da estrutura da manana, é necessária a ação sinérgica de endo e exo-hidrolases, juntamente com enzimas que clivam as cadeias laterais. A heterosinergia (a ação sinérgica

entre enzimas da cadeia principal e as das cadeias laterais) e a homosinergia (a ação sinérgica entre enzimas das duas cadeias principais ou, entre as enzimas das duas cadeias laterais) são relatadas na degradação de mananas (Moreira & Filho, 2008; Shallom & Shoham, 2003; van Zyl *et al.*, 2010).

As enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal da manana incluem β -mananase, β -glicosidase e β -manosidase (figura 4). Enzimas adicionais, tais como acetil manana esterase e α -galactosidase são necessárias para remover substituintes laterais que são unidos em vários pontos da estrutura da manana, criando mais locais suscetíveis para a completa hidrólise enzimática. A endo- β -D-mananase (EC 3.2.1.78, manana endo-1,4- β -D-manosidase) cliva aleatoriamente dentro da cadeia principal de 1,4- β -D-manana de galactomanana, glicomanana, galactoglicomanana e manana (McCleary, 1988, Moreira & Filho, 2008). A estrutura representativa das enzimas requeridas para a hidrólise das quatro diferentes formas de mananas está ilustrada na figura 4.

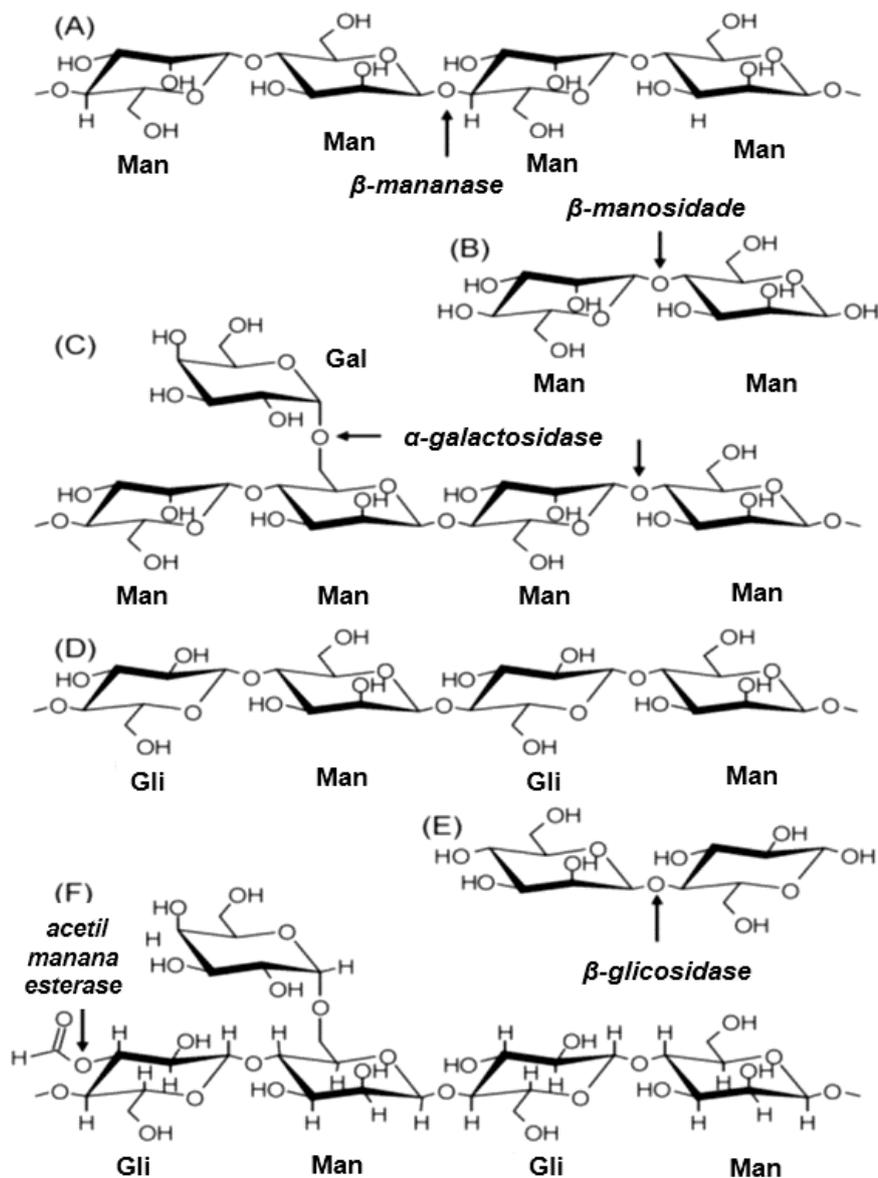


Figura 4. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas e enzimas requeridas para sua hidrólise. (A) manana linear, (C) galactomanana ramificada, (D) glicomanana linear, (F) galactoglicomanana ramificada. A estrutura da manana é hidrolisada pela β -mannanase, ao passo que a α -galactosidade e a acetil manana esterase liberam galactose e grupos acetil respectivamente. Os produtos gerados pela β -mannanase, (B) manobiose e (E) glicomanose são em seguida hidrolisados por β -manosidade e β -glicosidase para então gerarem monossacarídeos de manose, glicose e galactose. Adaptado de Van Zyl *et al.*, 2010.

1.2.2. Produção e aplicação industrial de Mananases

Após os antibióticos, as enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica (Ulhoa & Silva, 2007), tornando possível o fornecimento de enzimas adaptadas para as condições de novos processos e permitindo uma maior expansão da sua utilização industrial (Kirk *et al.*, 2002).

As enzimas são aplicadas em vários processos industriais, como na produção de medicamentos, além de serem importantes na realização de análises clínicas. São também empregadas em sínteses orgânicas, sendo uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens, entre elas, elevada velocidade de reação, compatibilidade com substratos sintéticos e ainda apresentam alta especificidade quanto ao tipo de reação que catalisam. Já em medicamentos, a grande eficiência das enzimas aliada a sua especificidade tornam-nas, a princípio, agentes de grande potencial para uso terapêutico. Entretanto, deve-se levar em conta aspectos como especificidade, melhor atividade em função do pH, termoestabilidade, presença de ativadores ou inibidores, preço e viabilidade. Para aplicações terapêuticas, a enzima precisa ter características apropriadas como, alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, baixa resposta imunológica e alta afinidade pelo substrato (Godoi, 2007).

Uma variedade de organismos como bactérias (Olaniyi & Arotupin, 2013), fungos (Ademark *et al.*, 1998; Ferreira & Filho, 2004; Van Zyl *et al.*, 2010; Weingartner, 2010) e plantas (Petkowicz *et al.*, 2001; Lisboa *et al.*, 2006) têm sido relatada como produtora de mananases (McCleary, 1988; Viikari *et al.*, 1993, 1994), gerando grande interesse industrial, podendo ser utilizada para os mais diversos fins: na ração animal, como anti-espessantes, na extração de petróleo e nas indústrias de detergentes, nos aditivos alimentares que promovem o crescimento de microbiota intestinal benéfica, na produção de mano-oligossacarídeos, no processamento de papel e celulose, nos processos têxteis entre outros e, dependendo sempre do objetivo final do produto, elas se

encontram sós ou em conjunto com outras enzimas (Ademark *et al.*, 1998; Moreira & Filho, 2008; Weingartner, 2010; Mohamad *et al.*, 2011).

De acordo com Neto (2001), o grau de purificação de uma enzima depende do uso a que se destina. Dessa forma, purificações realizadas para estudos acadêmicos podem ser extensivas, sendo que somente pequenas quantidades de enzima ativa são produzidas, ficando para segundo plano o custo e o tempo para realização do processo. Na indústria de detergentes, por exemplo, são necessárias grandes quantidades de enzimas e a pureza é considerada secundária quando comparada aos custos. Caldos enzimáticos impuros, ou parcialmente purificados, podem ser utilizados como catalisadores em conversões químicas industriais (Belter *et al.*, 1988; Kilikian & Pessoa, 2001). Nesse contexto, o presente trabalho apresenta resultados comparativos de uma amostra concentrada e uma amostra semi-purificada man 58, apresentando características promissoras para futuras aplicações industriais.

1.3. O fungo filamentoso *Aspergillus foetidus*

Os fungos filamentosos são uma classe de microrganismos de grande interesse industrial, sendo amplamente distribuídos na natureza, encontrados no solo, em vegetais e animais, podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas e são fundamentais na ciclagem de nutrientes na biosfera. Podem também associar-se simbioticamente com raízes de plantas, formando micorrizas (Grimm *et al.*, 2005; Strullu-Derrien & Strullu, 2007).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencem ao grupo dos Ascomicetos, podendo ser isolados do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar. Possuem características que os fazem microrganismos ideais para aplicações industriais como: boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de enzimas responsáveis pela degradação de polissacarídeos de parede celular de plantas, sendo estas de grande interesse

para a indústria de alimentos. *Aspergillus spp.* também tem sido usado como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (Vries & Visser, 2001; Ja'afaru & Fagade, 2007).

O fungo filamentososo *A. foetidus* (figura 5) faz parte da seção Nigri juntamente com *A. niger*, sendo utilizado para diversos fins biotecnológicos, incluindo a produção de enzimas e ácidos orgânicos. *A. foetidus* é considerado um organismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro) juntamente com *A. oryzae* e *A. niger*, além de não produzir micotoxinas como a ocratoxina A, o que lhe permite ser usado em aplicações industriais (Vries & Visser, 2001; Schuster *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2006).

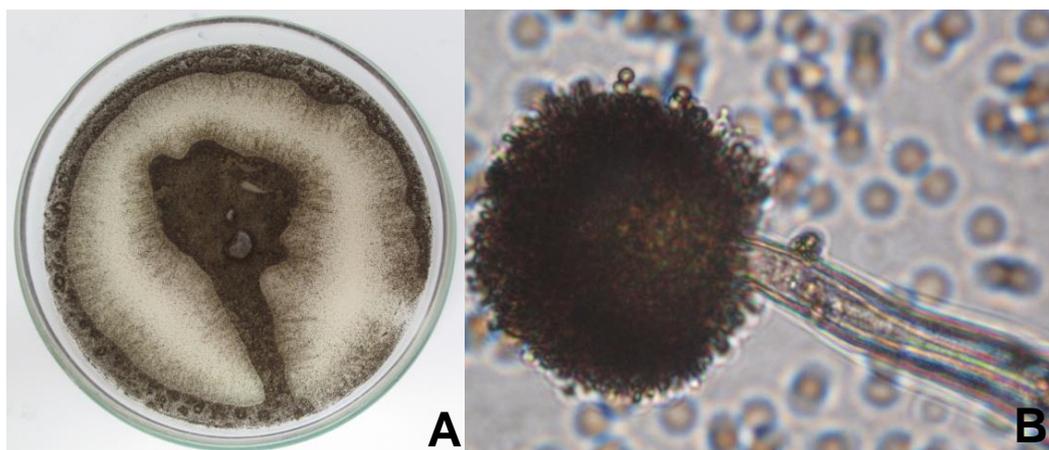


Figura 5. (A) Visualização macroscópica de *A. foetidus* e (B) visualização em microscópico óptico de *A. foetidus* com aumento de 400x.

De acordo com Pariza & Johnson (2001), as hemicelulases de *A. foetidus* são utilizadas em preparações para uso no processamento de alimentos. Shah *et al.* (2006) relataram que xilanases de *A. foetidus* promoveram uma melhoria na qualidade do pão de trigo integral. Para Sharma & Singh (2012), *A. foetidus* tem um grande potencial para degradar corantes têxteis e solucionar o problema da demanda química de oxigênio presente nos efluentes de indústrias têxteis. De acordo com Chakraborty *et al.* (2013), *A. foetidus* demonstrou tolerância na presença de grandes quantidades de

chumbo, sendo de grande interesse para a biorremediação de chumbo em sistemas de tratamento de água.

1.4. Soja

A soja (*Glycine max*) é uma cultura cuja origem se atribui ao continente asiático, sobretudo a região do rio Yangtse, na China. As primeiras informações sobre o grão da soja aparecem no período entre 2883 e 2838 a.C, quando a soja era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milho. O grão foi citado e descrito pelo imperador chinês Shen-nung, considerado o “pai” da agricultura chinesa, que deu início ao cultivo de grãos como alternativa ao abate de animais. A soja de cinco milênios atrás difere muito da soja atual, pois eram plantas rasteiras que se desenvolviam ao longo de rios e lagos – uma espécie de soja selvagem. O processo de “domesticação” da soja ocorreu no século XI a.C., a partir de cruzamentos naturais feitos por cientistas chineses. Somente foi introduzida na Europa no final do século XV, como curiosidade, nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha, mas após o final da Primeira Guerra Mundial, em 1919, o grão de soja se tornou um item de comércio exterior importante. Pode-se considerar o ano de 1921, quando foi fundada a American Soybean Association (ASA), como o marco da consolidação da cadeia produtiva da soja em esfera mundial. Posteriormente, a produção de soja foi para as Américas, onde encontrou terras mais férteis, e atualmente sua grande maioria é cultivada nos Estados Unidos, Brasil e Argentina, que juntos produzem cerca de 85% da soja do mundo (Aprosoja, 2013; Embrapa, 2013; Imcopa, 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012), historicamente a produção brasileira de soja tem crescido a uma taxa anual de 5,8% e deve aumentar por meio de uma combinação de expansão de fronteira em regiões onde ainda há terras disponíveis, ocupação de terras de

pastagens e pela substituição de lavouras onde não há terras disponíveis para serem incorporadas.

O grão da soja e seus derivados como a casca de soja, a lecitina de soja e o farelo de soja são utilizados pela indústria de adesivos e nutrientes, de alimentação animal, de adubos, de formulador de espumas, de fabricação de fibra, de revestimento entre outros. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, também é produzida a lecitina, um agente emulsificante (substância que faz a ligação entre a fase aquosa e oleosa dos produtos), muito usada na fabricação de salsichas, maioneses, achocolatados, entre outros. (Embrapa, 2013; Imcopa, 2013).

A casca do grão da soja (figura 6), um subproduto obtido da industrialização do grão da soja, corresponde a uma fina camada (tegumento) que recobre o grão, e consiste de uma fonte rica em fibra pouco lignificada, com um teor de proteína bruta de cerca de 12% e um teor de fibra bruta ao redor de 36% (celulose e hemicelulose). Tem grande destaque no cenário nacional, em virtude da alta produção brasileira de soja (Medeiros, 2004; Restle *et al.*, 2004); dessa forma, para cada tonelada de soja processada são produzidos 50 kg de casca de soja, e apesar dos diversos destinos, uma fração deste subproduto é descartado como resíduo no ambiente (Zambom *et al.*, 2001).

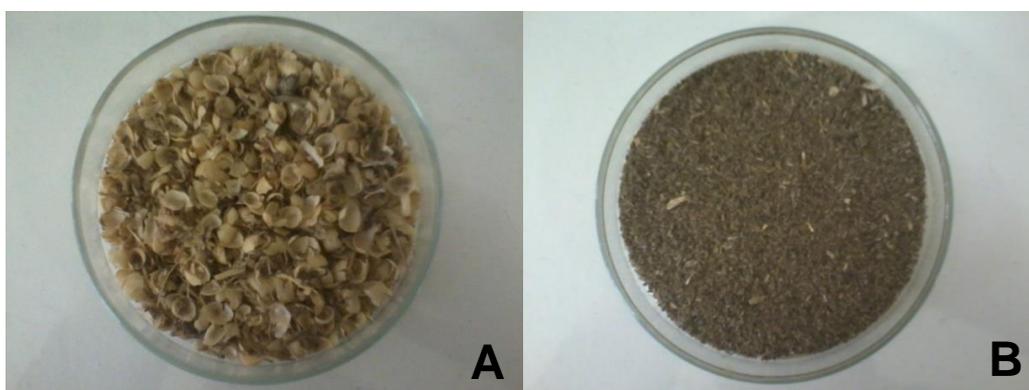


Figura 6. (A) Casca do grão da soja e (B) Casca do grão da soja moída.

2. JUSTIFICATIVA

A estrutura da biomassa lignocelulósica consiste de uma matriz complexa de celulose, hemicelulose e lignina, sendo necessária uma série de enzimas agindo de forma sinérgica para a sua completa degradação. Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza e secretam grandes quantidades de enzimas que degradam eficientemente essa estrutura complexa.

É possível encontrar na literatura vários trabalhos demonstrando a aplicabilidade do fungo *A. foetidus*, como por exemplo no trabalho de Pariza & Johnson (2001), no qual *A. foetidus* mostrou ser produtor de hemicelulases com aplicações em processos industriais, incluindo: preparações para uso no processamento de alimentos, na degradação de corantes têxteis de grande importância para o tratamento de efluentes (Sharma & Singh, 2012) e por apresentar tolerância na presença de grandes quantidades de chumbo, indicando aplicação em processos de biorremediação de chumbo em sistemas de tratamento de água (Chakraborty *et al.*, 2013).

A casca do grão da soja, por sua vez, é um subproduto obtido da industrialização do grão da soja, podendo ser utilizado como fonte de material para crescimento do microrganismo produtor de enzimas com aplicabilidade em uma variedade de processos industriais.

Nesse contexto, a presente pesquisa tem como propósito, produzir e caracterizar mananases de *A. foetidus*, crescido na casca do grão da soja, com o intuito de agregar valor a esse resíduo que seria descartado no ambiente, utilizando-o como matéria-prima renovável e de baixo impacto ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilizar cascas do grão da soja e resíduos da colheita da soja como fontes de carbono para cultivo em meio líquido de *Aspergillus foetidus* com o intuito de produzir, purificar e caracterizar mananases.

3.2. Metas Estabelecidas

- Cultivar o fungo *A. foetidus* em meio de cultura líquido, contendo cascas do grão da soja e resíduos da colheita da soja como fontes de carbono;
- Concentrar o extrato bruto (EB) utilizando sistema de ultrafiltração com membrana de retenção de 10 kDa;
- Obter frações com atividade de mananase por filtração em gel (Sephacryl S-100) ;
- Caracterizar o concentrado e a fração com atividade de mananase (semi-purificada - man 58) quanto ao efeito do pH, efeito da temperatura e termoestabilidade;
- Analisar o efeito dos compostos fenólicos, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, vanilina, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido tânico sobre a atividade de man 58, bem como o efeito de licor de auto-hidrólise de sabugo de milho.
- Avaliar o grau de pureza de man 58 por espalhamento de luz dinâmico (ELD).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fontes de carbono e pré-tratamento

As cascas do grão da soja provêm da espécie *Glycine max* e foram obtidas na Fazenda Tropical, em Cabeceiras, GO. Os resíduos da colheita da soja (caule, vagens e cascas) foram obtidos na Fazenda Três Pinheiros, em Planaltina, DF. O material foi submetido a um pré-tratamento no qual foi autoclavado a 121°C por 2 h e lavado em água corrente; posteriormente, secado em estufa a 60°C por 48 h, triturado, embalado em saco plástico e armazenado em caixa de isopor.

4.2. Análise bromatológica da casca do grão da soja

A análise da composição bromatológica da casca do grão da soja foi realizada no Laboratório de Química Tecnológica - DPPG no Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro (Li *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2010).

A análise dos extraíveis foi feita pesando 5 g do material lignocelulósico (m_0) que posteriormente foi transferido para um extrator Soxhlet. A extração ocorreu por 8 horas, usando cerca de 300 mL de hexano PA. Após a extração, o material foi seco a 35-40°C e pesado (m_1). A diferença da massa corresponde ao teor de extraíveis ($m_1 - m_0$).

O percentual de extraíveis (%E) pode ser calculado por:

$$\%E = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100\%$$

Para a análise da hemicelulose, pesou-se 1 g (m_1) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e acrescentou-se 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (0,5 M; 20 g/L). A mistura foi fervida por 3,5 horas, filtrada e lavada com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35-40°C e pesado (m_2). A diferença das massas corresponde à hemicelulose.

O percentual de hemicelulose (%HC) foi determinado por:

$$\%HC = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100\%$$

A análise da lignina foi feita pesando 1 g (m_1) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e este foi acrescido de 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 72% (72 mL de ácido sulfúrico concentrado com 28 mL de água destilada). A mistura ficou em repouso por 24 horas e posteriormente, foi diluída com 300 mL de água destilada e fervida por 1 hora. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido foi lavado com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35-40°C e pesado (m_3). Esta massa corresponde ao teor de lignina. O percentual de lignina (%L) foi determinado por:

$$\%L = \frac{m_3}{m_1} \times 100\%$$

A análise de celulose foi determinada pela diferença entre a massa original e os teores de hemicelulose, lignina e extraíveis.

O percentual de celulose (%C) foi determinado por:

$$\%C = 100 - \%E - \%HC - \%L$$

4.3. Microrganismo e condições de cultivo

O fungo *A. foetidus* foi isolado do solo de cerradão na região do entorno do Distrito Federal e, posteriormente, identificado morfológicamente pelo Prof. Dr. Luís Roberto Batista, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras – MG. Este fungo faz parte da micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, no âmbito da rede Sisbiota de Fungos Filamentosos: autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010770/2013-5.

O fungo foi repicado em placas de Petri em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA) contendo (m/v) caldo de batata 2%, dextrose 1% e ágar 2%, e mantido a 28°C até esporulação. Após crescimento, o fungo foi armazenado em criotubo contendo glicerol 18% (v/v) e preservado em ultrafreezer a -80°C.

O cultivo em condições submersas de *A. foetidus* foi realizado utilizando erlenmeyers de 500 mL em triplicatas biológicas, contendo em cada um 250 mL de meio líquido suplementado com a seguinte composição em g/L: 7,0 g de KH_2PO_4 ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 g de extrato de levedura em pH 7,0 e 1% de casca do grão da soja ou resíduos da colheita da soja como fontes de carbono. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 30 min.

Posteriormente, os esporos de *A. foetidus* crescido em placas de Petri foram raspados e misturados com 50 mL de NaCl 0,9%. Uma gota desta solução de esporos foi colocada na câmara de Neubauer, onde pôde ser feita a contagem dos esporos em microscópio óptico para a obtenção de uma suspensão de 10^8 esporos/mL – relação de 1 mL de solução de esporos para cada 100 mL de meio de cultura. Após inoculação da solução de esporos nos erlenmeyers na concentração de 1 %, o cultivo foi colocado em agitador

rotatório a 120 rpm, 28°C, por um período de 20 dias. Passado esse período, o cultivo foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro Whatman® n°1 a fim de separar a massa micelial do sobrenadante. O sobrenadante obtido, agora denominado extrato bruto (EB), foi preservado em azida sódica 0,1% e guardado em câmara fria a 4°C, sendo posteriormente utilizado como fonte de enzimas.

4.4. Reagentes

Os substratos manana (galactomanana – Locust bean), xilana (oat spelt xylan), carboximetil-celulose (CMC), pectina (citrus fruits) e celulose microcristalina (Avicel) foram adquiridos da Sigma – Aldrich (St. Louis, MO. USA). O Kit de determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford foi adquirido da Bio-Rad Inc. (Hercules, CA. USA).

4.5. Curva de Indução Enzimática

A curva de indução enzimática foi determinada a partir das alíquotas de 1 mL retiradas das triplicatas biológicas dos meios de cultura líquido do primeiro dia até completar 20 dias de cultivo no agitador rotatório. As alíquotas foram armazenadas em tubos tipo eppendorfs e centrifugadas a fim de separar a fase sólida da líquida. Foram feitos ensaios dessas alíquotas para determinação das atividades celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas, e quanto à quantidade de proteínas presentes no sobrenadante.

4.6. Determinação da atividade enzimática

Foram feitos ensaios para determinação da atividade enzimática, utilizando diferentes substratos, incluindo CMC 1% (carboximetil-celulose), Avicel 1% (celulose microcristalina), FP (papel de filtro), manana 1%, xilana 1% e Pectina 1%. O ensaio foi realizado incubando-se 50 μL de soluções de substratos 1% (m/v) e 25 μL de EB, a 50°C durante 30 min (Filho *et al.*, 1993). Após este tempo foram adicionados 150 μL de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959), com o intuito de detectar a quantidade de açúcar redutor liberado durante o ensaio, sendo então incubadas em banho fervente por 10 min. Ao final, foram adicionados 750 μL de água destilada e, posteriormente foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2^e, Molecular Devices Co., EUA).

Para a determinação da atividade de avicelase, foram incubados 50 μL de EB e 50 μL de avicel 1% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 por 2 h a 50°C (Filho *et al.*, 1993). As etapas seguintes seguiram o mesmo procedimento dos ensaios relatados anteriormente.

Para atividade de FPase foram utilizadas tiras papel de filtro Whatman[®] n°1 (1 x 6 cm) para cada tubo de ensaio e 150 μL de EB, os quais foram incubados por 1 h a 50°C. Após esse período de incubação adicionou-se 300 μL de DNS (Miller, 1959) seguido de fervura a 98°C por 10 min. Ao final, foram adicionados 1,5 mL de água destilada. As etapas seguintes seguiram o mesmo procedimento dos ensaios relatados anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo definida como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$).

4.7. Quantificação de proteínas

A quantidade de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o Kit Protein Assay (Bio - Rad Laboratories, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8. Etapas de purificação e caracterização

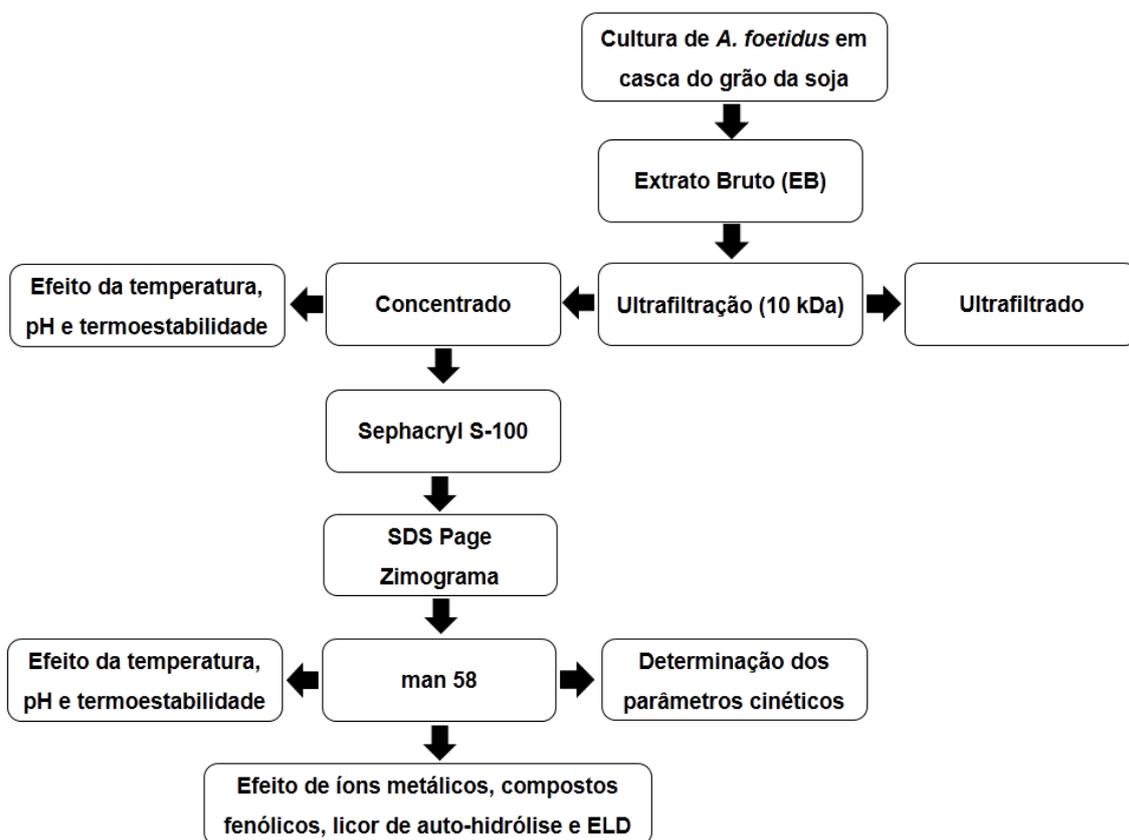


Figura 7. Diagrama das etapas de caracterização de mananase a partir do extrato bruto (EB) de *A. foetidus*, cultivado em casca do grão da soja como fonte de carbono.

4.8.1. Ultrafiltração

O EB foi concentrado utilizando sistema de ultrafiltração com membrana de retenção de 10 kDa (PM 10 Millipore Co., MA, EUA), pressão de 5 Kgf/cm² e temperatura de 10°C em sistema de ultrafiltração do tipo Amicon. Foram obtidas duas frações: concentrado e ultrafiltrado.

4.8.2. Cromatografia

O concentrado foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl S-100 (3 cm x 72 cm) previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 contendo NaCl 0,9 % e azida sódica 0,002%. Foram aplicados 10 mL de amostra concentrada e frações de 4 mL foram coletadas com fluxo de 1mL/4min. Foram feitos ensaios enzimáticos para detecção da atividade de mananase das frações coletadas e leitura da absorbância a 280 nm para a determinação da quantidade total de proteínas presentes. O pico 58 foi escolhido para dar continuidade a pesquisa, pois apresentou mais alta atividade de mananase, sendo denominado man 58.

4.8.3. Eletroforese SDS-PAGE

As frações com atividade enzimática provenientes da cromatografia foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram precipitadas por ácido tricloroacético (TCA) 10%, homogeneizadas e incubadas a 4°C por 1 h. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 min a 4°C, sendo posteriormente lavadas 3 vezes, com 1 mL de acetona e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao final foram secas em temperatura ambiente. O sedimento, contendo as proteínas precipitadas, foi ressuspenso em tampão de amostra 1X

e fervido por 5 min. Após a etapa de fervura, as amostras (10 μ g) foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12% à temperatura ambiente e corrente de 20 mA por 40 min.

4.8.4. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida das amostras em SDS-PAGE, as bandas proteicas foram reveladas por coloração com nitrato de prata (Blum, *et al.*, 1987). O gel foi incubado em solução fixadora (v/v) (metanol 40% e ácido acético 7%) durante 1 h, sob agitação. Em seguida, ainda sob agitação, o gel foi lavado por três vezes (20 min cada) em solução de etanol 50% (v/v). Após as lavagens, o gel foi incubado por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), lavado três vezes em água destilada e incubado na solução de coloração (nitrato de prata 0,2% (m/v), formaldeído 0,03% (v/v) em água destilada) por 15 min, sob agitação. Por fim, o gel foi lavado três vezes em água destilada e submetido à solução reveladora (carbonato de sódio 6,0% (m/v), tiosulfato de sódio 0,004% (v/v), formaldeído 0,02% (v/v) em água destilada). A reação foi interrompida com solução fixadora, após o aparecimento das bandas.

4.8.5. Zimografia

As amostras enzimáticas provenientes da cromatografia foram submetidas ao método de zimografia em SDS-PAGE 12% (v/v), copolimerizado com solução de manana 0,1% (v/v). As amostras de proteínas foram preparadas conforme descrito no item 4.8.3. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de Triton X-100 2,5% (v/v) por 1 h, sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 por 1 hora a 60°C. A reação foi interrompida pelo resfriamento do gel através de incubação a 4°C em câmara fria. Posteriormente, o gel foi lavado com água

destilada e corado com solução de vermelho Congo 0,1% (m/v) por 30 min, sob agitação. Por fim, o gel foi descorado em solução de NaCl 1M até o aparecimento de bandas definidas. Foi adicionado 10 µL de solução de ácido acético 0,5% (v/v), para melhor visualização das bandas.

4.8.6. Espalhamento de luz dinâmico (ELD)

O grau de pureza de man 58 foi avaliada por espalhamento de luz dinâmico, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern, London, UK). As medidas foram realizadas a 28°C com tempo de aquisição de 60 segundos e 15 aquisições por medida. O cálculo da massa molecular é feito com base no raio hidrodinâmico da proteína e leva em consideração proteínas perfeitamente globulares.

4.9. Caracterização enzimática

4.9.1. Efeito da temperatura na atividade de mananase

Foram realizados microensaios em termociclador nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C e 80°C para avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática de mananase, para o concentrado e fração man 58. Para leitura da absorbância o concentrado teve que ser diluído 5 vezes. Os ensaios enzimáticos foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.2. Efeito do pH na atividade de mananase

Foram realizados ensaios para determinação da atividade enzimática do concentrado e man 58 na presença de diferentes tampões, em diferentes faixas

de pH: tampão acetato de sódio (pH 3,0 - 6,0), tampão fosfato de sódio (pH 6,0 - 7,5) e tampão Tris HCL (pH 7,5 - 9,0). Foram adicionados 25 µL da enzima, 50 µL de manana 1% e 75 µL do tampão 50 mM. Os ensaios enzimáticos foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.3. Avaliação da Termoestabilidade na atividade de mananase

As amostras do concentrado e de man 58 foram incubadas nas temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C e alíquotas foram coletadas e testadas da 1ª incubação até perder 50% de atividade enzimática. Os ensaios enzimáticos foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para determinação dos parâmetros cinéticos (KM e Vmax) de man 58, foi utilizado o substrato manana previamente diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 com diferentes concentrações em intervalos de 0,33 a 26,6 mg/mL. O ensaio foi feito adicionando-se 5 µL de Man 58 e 10 µL da respectiva manana. A constante de Michaelis-Menten (KM) e a velocidade máxima de reação (Vmax) foram determinadas utilizando-se o software Enzifitter (Leatherbarrow, 1999). Os ensaios foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.5. Influência de íons metálicos na atividade de mananase

O efeito dos íons metálicos e EDTA sobre a atividade de man 58 foi determinado pela pré-incubação das amostras enzimáticas com as soluções contendo íons metálicos (MgSO₄, AgNO₃, FeSO₄, CoCl₂, FeCl₃, CuSO₄, EDTA,

CaCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄, CuCl₂, KCl, NaCl) nas concentrações finais de 1 mM e de 10 mM. O efeito dos íons e EDTA foi avaliado pela pré-incubação das amostras por 20 min, a 28°C. A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu a atividade enzimática sem a presença dos íons metálicos e EDTA. Os controles foram feitos substituindo-se o volume dos íons metálicos e EDTA por água destilada. Os ensaios enzimáticos foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.6. Efeito de compostos fenólicos

O efeito de compostos fenólicos na atividade de man 58 foi avaliado pela pré-incubação da mesma com ácido ferúlico, ácido p-cumárico, vanilina, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido tânico, na concentração de 1 mg/mL, em água (vanilina e ácido ferúlico) ou álcool (ácidos cinâmico, 4-hidroxi-benzóico, p-cumárico e tânico). O efeito de inibição foi medido imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos (Ximenes *et al.*, 2011). A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu a atividade enzimática sem a presença dos compostos fenólicos. Os controles foram feitos com a pré-incubação das enzimas com água ou álcool e submetidos às mesmas condições de ensaio. Os ensaios foram feitos em quintuplicatas técnicas.

4.9.7. Efeito de licor de auto-hidrólise

Os licores de auto-hidrólise foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli do Laboratório de Microbiologia/Biologia Celular, da Universidade de São Paulo (USP). Os licores foram obtidos a partir do sabugo de milho, que sofreu auto-hidrólise em um

reator a 200°C, por 30 minutos (Licor-30') e por 50 minutos (Licor-50'), conforme descrito em Michelin *et al* (2012). O protocolo para analisar o efeito do licor de auto-hidrólise na ação enzimática de man 58 foi adaptado do item 4.6, da seguinte maneira: foram aplicadas nos poços das placas 5 µL de amostra, 5 µL de manana 2% e 5 µL do licor previamente diluído 10 x, para que o volume final de substrato no ensaio fosse de 1%. A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu a atividade enzimática controle sem a presença de licor. Os ensaios foram feitos em quintuplicatas técnicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a produção de mananase, foi feito um pré-tratamento das fontes de carbono (cascas do grão da soja e resíduos da colheita da soja) (item 4.1). A mesma metodologia foi utilizada no trabalho de Martins (2012), que descreveu a importância desse processo por dois motivos: (i) aumentar a área de superfície e acessibilidade da enzima através de alterações na porosidade e tamanho da partícula de forma a potencializar o acesso das hifas às fibras da parede celular vegetal, aumentando a produção de enzimas hidrolíticas; (ii) eliminar açúcares presentes no material, ou seja, o fungo estaria degradando de fato a fonte de carbono e não simplesmente se alimentando de açúcares residuais do processo de moagem da fonte de carbono. Métodos físicos, tais como pré-tratamentos com moagem e trituração, têm sido utilizados para a degradação da lignocelulose como um método ecológico e de baixo custo (Bhatia *et al.*, 2012).

Após o processo de pré-tratamento, foi feito cultivo em condições submersas, mencionado no item 4.3. Foram realizados ensaios enzimáticos para atividades hemicelulolíticas (xilanases e mananases), celulolíticas (cmcase, avicelase e FPase) e pectinolítica (pectinases) do extrato bruto (EB) de *A. foetidus* crescido na presença da casca do grão da soja e dos resíduos da colheita da soja como fontes de carbono.

Na figura 8, pode-se observar que as maiores atividades enzimáticas detectadas foram: mananase (0,945 UI.mL⁻¹), pectinase (0,816 UI.mL⁻¹) e xilanase (0,458 UI.mL⁻¹) quando a casca do grão de soja foi a fonte de carbono utilizada.

De todas as atividades enzimáticas testadas, os resíduos da colheita da soja apresentaram resultados menores, quando comparados a casca do grão da soja (figura 8). Tal resultado já era esperado, pois os resíduos da colheita da soja tinham em sua mistura restos de caules e vagens, que apresentam uma

estrutura mais rígida na parede celular da planta quando comparada as cascas da soja. Dessa forma, a hemicelulose e pectina interagem com as fibrilas de celulose, formando ligações covalentes cruzadas, o que conseqüentemente reduz a biodegradabilidade da parede celular (Vries & Visser, 2001). Também foi relatado na literatura que polímeros de manana são mais concentrados na casca do que em qualquer outra fração do grão da soja (Odetallah *et al.*, 2002; Srivastava & Kapoor, 2005).

Observa-se também uma alta atividade de pectinase quando o fungo cresceu na presença da casca do grão da soja. De acordo com Machado *et al.*, (2012), a casca da soja também é rica em pectina.

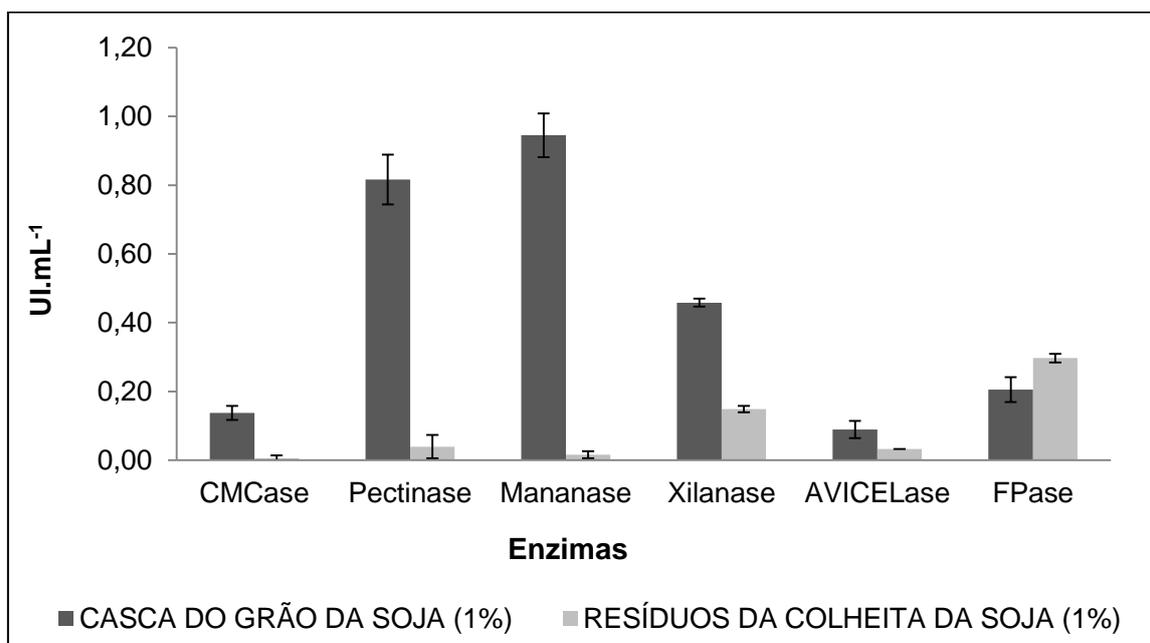


Figura 8. Atividades hemicelulolíticas (xilanase e mananase), celulolíticas (CMCase, avicelase e FPase) e pectinolítica (pectinase) do extrato bruto (EB) de *A. foetidus* crescido na presença da casca do grão da soja e dos resíduos da colheita da soja.

Após a etapa de “screening”, foi utilizada a casca do grão da soja como fonte de carbono indutora para a produção de mananase.

5.1. Análise bromatológica da casca do grão da soja

A casca de soja é um subproduto comercial, no que diz respeito aos métodos industriais envolvidos na produção do grão e do farelo de soja (Embrapa, 2004). Nesse contexto, a tabela 2 mostra a análise bromatológica da casca do grão da soja pré-tratada e moída utilizada neste trabalho e um comparativo relatado em outros trabalhos na literatura.

Tabela 2. Análise bromatológica da casca do grão da soja.

Casca do grão da soja	Este trabalho	Rojas (2012)	Cassales <i>et al.</i> , (2011)	Retore <i>et al.</i> , (2010)	Mielenz <i>et al.</i> , (2009)
Celulose	24,4%± 5,6	35,8%	31%	47,78%	29-51%
Hemicelulose	33,8%± 6,3	23,1%	26%	20,42%	10-20%
Lignina	36,6%± 0,9	4,3-4,8%	3,4-5,7%	5,26%	2,8%
Extraíveis	5,3% ± 0,3	5%	3,2%	-	-

O teor de celulose (24,4%) mesmo parecendo inferior aos descritos pelos autores comparados na tabela 2, está dentro da faixa percentual encontrada na literatura (Mielenz *et al.*, 2009; Menon & Rao, 2012). Hemicelulose (33,8%) e lignina (36,6%) apresentaram porcentagem superior aos dados comparados na tabela 2. Restle *et al.*, (2004) e Oliveira (2006) relataram que a casca de soja é amplamente utilizada na indústria de ração para animais ruminantes por apresentar em sua composição elevados teores de celulose e hemicelulose e baixa presença de lignina. A diferença na composição química das cascas de soja pode estar associada a origem da casca, condições de crescimento do grão e seu processamento. Além disso, os trabalhos citados na tabela apresentaram diferentes técnicas de análise bromatológica.

5.2. Curva de indução enzimática

O fungo *A. foetidus* cresceu em meio líquido (item 4.3) na presença de cascas do grão da soja, durante 20 dias. A figura 8 mostra o perfil de indução de mananase, pectinase e xilanase.

O crescimento de fungos e sua produção de enzimas são determinados por uma variedade de parâmetros, como a composição, a temperatura e o pH do meio, além disso, a escolha da fonte de carbono tem um papel importante na produção de enzimas (Juhász *et al.*, 2005). Dessa forma, para que ocorra a otimização da utilização dessas enzimas na indústria, é necessária uma prévia caracterização enzimática, que seja capaz de determinar os principais parâmetros que influenciam a atividade e a estabilidade enzimática (Milanezi, 2010; Moreira, 2013).

A curva de indução enzimática (figura 9) demonstrou um aumento progressivo na produção de mananase, chegando ao máximo no 15º dia de cultivo, com atividade de $1,987 \text{ UI.mL}^{-1}$ e com oscilações nos dias subsequentes. A produção de xilanase apresentou aumento gradual, porém em menor destaque quando comparada a mananase. Houve aumento progressivo do 3º ao 5º dia e queda no 6º dia, voltando a aumentar sua produção no 7º dia, chegando ao máximo no 17º dia de cultivo, com atividade de $0,858 \text{ UI.mL}^{-1}$, e mantendo um padrão similar até completar o 20º dia. A produção de pectinase apresentou oscilações, mantendo-se estável somente entre os dias 13 e 16; após esse período alcançou sua maior produção no 17º dia, com atividade de $0,798 \text{ UI.mL}^{-1}$. Com base nas observações feitas com a análise da curva de indução, foi definido dar continuidade ao trabalho estabelecendo a produção de mananase, no 15º dia de cultivo.

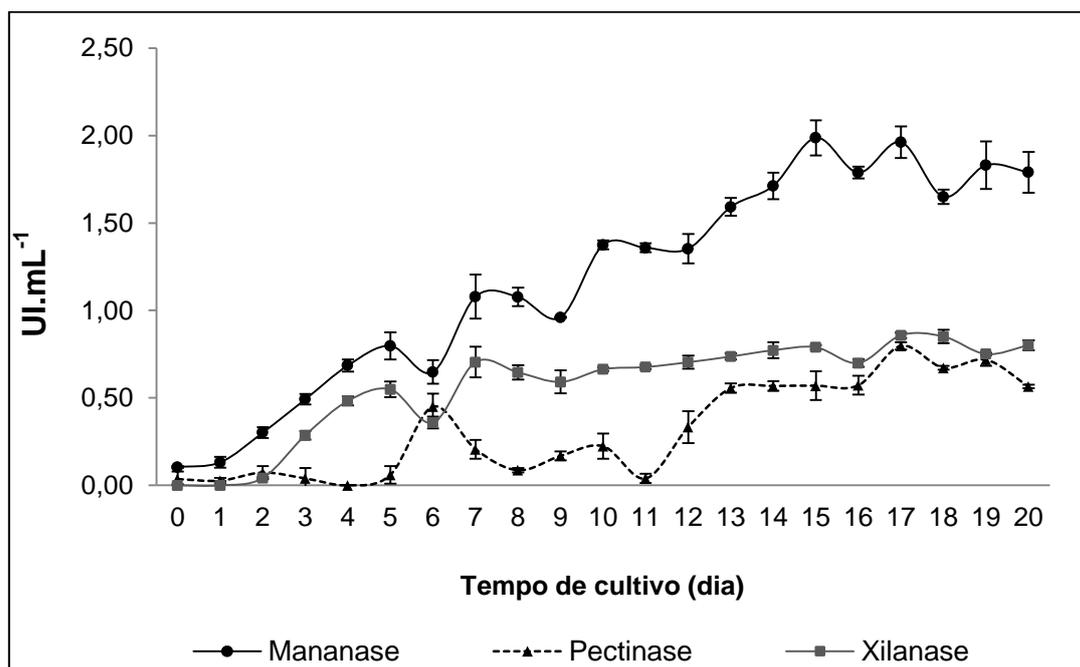


Figura 9. Curva de indução da atividade de mananase, pectinase e xilanase de *A. foetidus* crescido em meio líquido contendo casca do grão da soja 1% ao longo de 20 dias.

5.3. Quantificação de proteínas e atividade específica da mananase no EB.

A quantificação de proteínas totais presentes nas amostras coletadas durante o período de 20 dias na curva de indução foi determinada pelo método de Bradford (1976). A figura 10 (A) mostra que no 15º dia houve maior produção de mananase ($1,987 \text{ UI.mL}^{-1}$). Posteriormente foi feito o cálculo de atividade específica expressa em UI.mg^{-1} para os 20 dias de atividade enzimática de mananase na curva de indução. A figura 10 (B) mostra que o melhor dia de atividade específica é o 10º ($52,413 \text{ UI.mg}^{-1}$), sendo que o 15º ($25,383 \text{ UI.mg}^{-1}$) apresentou maior atividade enzimática de mananase, podendo ser indício da ação sinérgica de outras enzimas com a mananase.

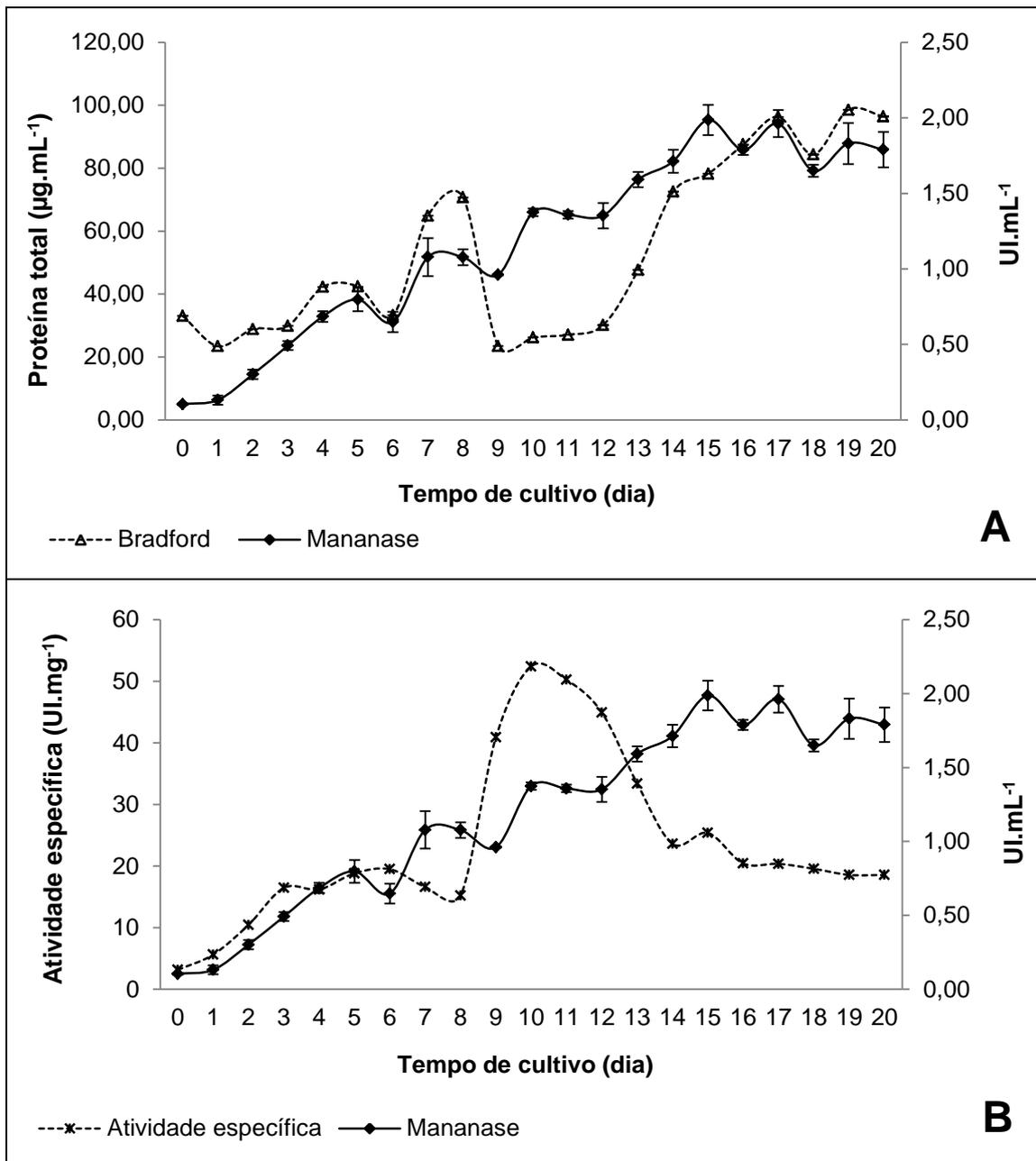


Figura 10. Comparação da curva de indução da atividade de mananase de *A. foetidus* em meio líquido contendo casca do grão da soja 1% ao longo de 20 dias com (A) a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), e (B) a atividade específica expressa em UI.mg⁻¹.

5.4. Ultrafiltração

No processo de ultrafiltração utilizou-se membrana de retenção de 10 kDa e foram obtidas duas frações: concentrado e ultrafiltrado. Essa etapa é importante para separar moléculas com massa molecular maior que 10 kDa, que ficaram retidas na fração concentrada, de moléculas com massa molecular menor que 10 kDa que passaram para a fração ultrafiltrada.

Concentrar proteínas por ultrafiltração tem várias vantagens, como promover a concentração de compostos a baixa temperatura e pressão, possibilitar a retirada de sais e outras moléculas pequenas e manter constante o pH do meio (Harris & Angal, 1994; Kilikian & Pessoa, 2001). No trabalho de Ferreira & Filho (2004), a atividade de uma β -mananase de *Trichoderma harzianum* foi detectada exclusivamente no concentrado.

Além da atividade de mananase foram encontradas na fração concentrada atividades de xilanase e pectinase (tabela 3).

Tabela 3. Atividade enzimática de mananase, xilanase e pectinase no concentrado e no ultrafiltrado expressa em UI.mL⁻¹.

Atividade enzimática	Concentrado	Ultrafiltrado
Mananase	6,392 ± 0,089	0,004 ± 0,000
Xilanase	5,577 ± 0,267	0,025 ± 0,022
Pectinase	5,686 ± 0,270	0,213 ± 0,054

5.5. Cromatografia de exclusão molecular

Estudos têm demonstrado que apenas uma etapa de purificação não é o suficiente para purificar mananases a partir do EB (Ademark *et al.*, 1998; Ferreira & Filho, 2004). Portanto, o primeiro passo foi aplicar a fração concentrada em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100, resultando no perfil apresentado na figura 11.

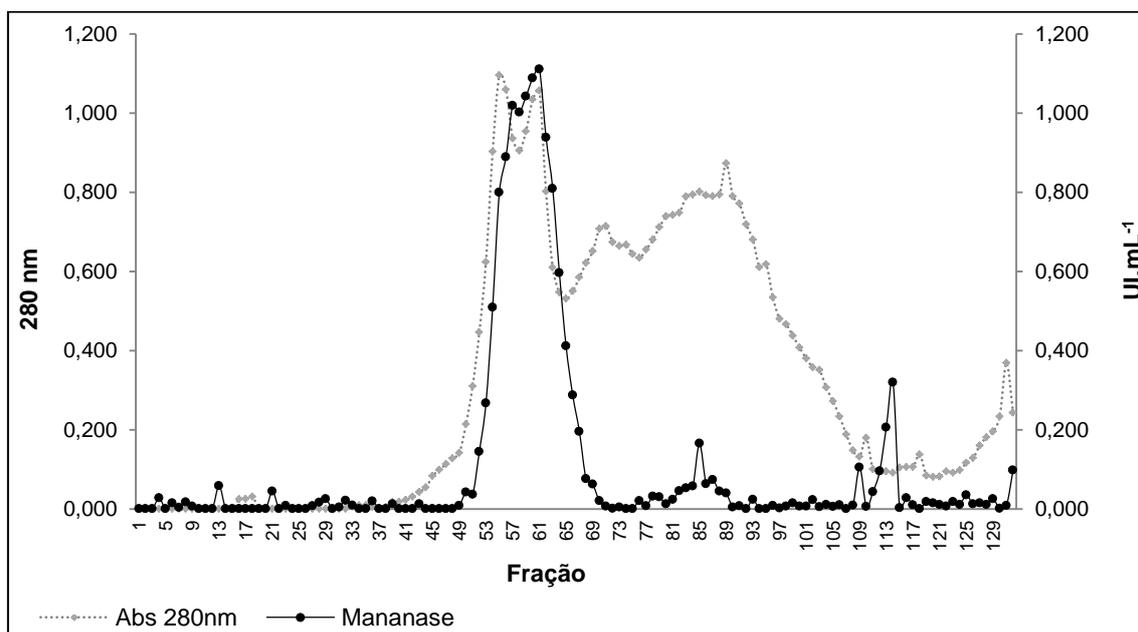


Figura 11. Perfil cromatográfico do concentrado em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100.

De acordo com a figura 11, pode-se observar atividade de mananase da fração 53 até a fração 65, ocorrendo uma considerável diminuição da atividade quando comparada com a amostra concentrada.

Após a cromatografia, todas as frações coletadas (figura 11) que apresentaram atividade de mananase (53-65) foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes e zimografia (figura 12), a fim de identificar as bandas proteicas correspondentes à atividade de mananase.

5.6. SDS-PAGE e Zimograma

Na figura 12, observa-se os perfis eletroforéticos de amostras de mananases provenientes da cromatografia de Sephacryl S-100. A diversidade de proteínas que coeluíram na cromatografia pode ser observada no gel de eletroforese, que apresenta várias bandas em cada fração. O zimograma revelou atividades de mananase nas frações 57, 58, 59, 62 e 65. Porém na fração 58 observa-se duas bandas correspondentes à atividade de mananase, com maior destaque em relação às outras frações. As duas bandas observadas apresentam tamanhos próximos entre 30 e 45 kDa. O que também é apresentado no trabalho de Weingartner (2010), que identificou uma mananase próxima à 45 kDa, produzida por *A. niger*, em casca de soja porém em condições semi-sólidas.

A fração 58 foi testada quanto a atividade de mananase em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 a 60°C, apresentando atividade de 1,002 UI.mL⁻¹, sendo denominada, man 58, daqui por diante.

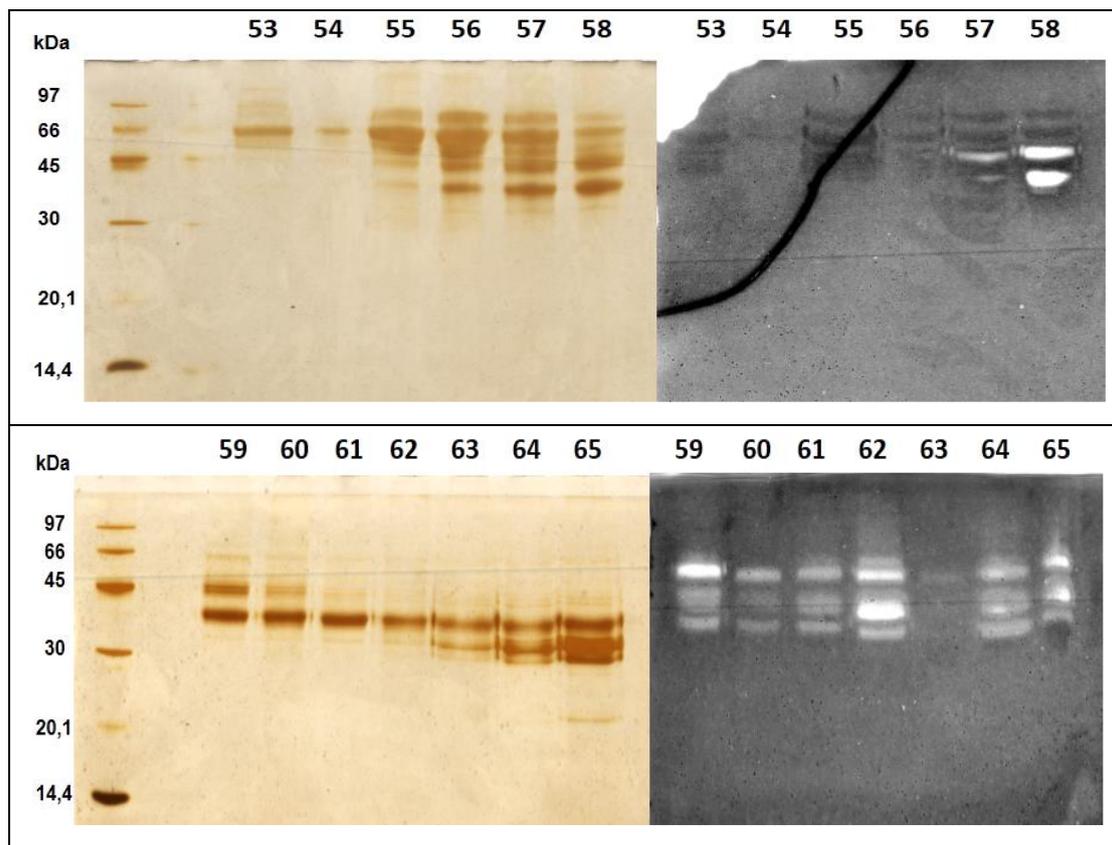


Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações coletadas na cromatografia em coluna de filtração em gel do tipo Sephacryl S-100 coradas com nitrato de prata (esquerda). MM – marcador de massa molecular contendo as proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Zimograma revelado por solução de vermelho Congo 0,1% (direita).

5.7. Espalhamento de luz dinâmico (ELD)

Man 58 foi avaliado por espalhamento de luz dinâmico (ELD). Utilizando o programa Zetasizer, é possível estimar o grau de purificação da amostra, o tamanho da enzima, sua massa em kDa, a porcentagem de intensidade de luz desviada pela enzima e a porcentagem de sua massa em relação à amostra.

De acordo com o fabricante (Malvern, UK), o gráfico de intensidade por tamanho (à esquerda) indica a intensidade relativa da luz espalhada pelas populações de partículas de diferentes tamanhos e o gráfico de volume por tamanho (à direita) correlaciona a intensidade relativa das partículas, medidas previamente, com seu volume (toma como base proteínas globulares e utiliza a teoria de Mie) e fornece um tamanho relativo da partícula (nm) e sua massa, ou seja, indica principalmente populações de partículas de diferentes tamanhos.

A análise de man 58 (figura 13) apresentou três picos: o de menor massa monodisperso e com baixo IPD (18,8%), o de massa mediana polidisperso com IPD (21,7%) e o de maior massa polidisperso com IPD mediano (25,9%), mostrando populações com partículas de diferentes tamanhos. No gráfico de intensidade por tamanho (esquerda) o pico principal apresentou massa molecular estimada de $53,1 \pm 12.2$ kDa, tamanho de 6.503 ± 1.446 nm, e 99,9% de massa presente (direita) indicando ser um pico polidisperso com população heterogênea. Através desse método pode-se confirmar a presença de outras partículas na amostra semi-purificada man 58, o que dificultou o processo de purificação da mesma.

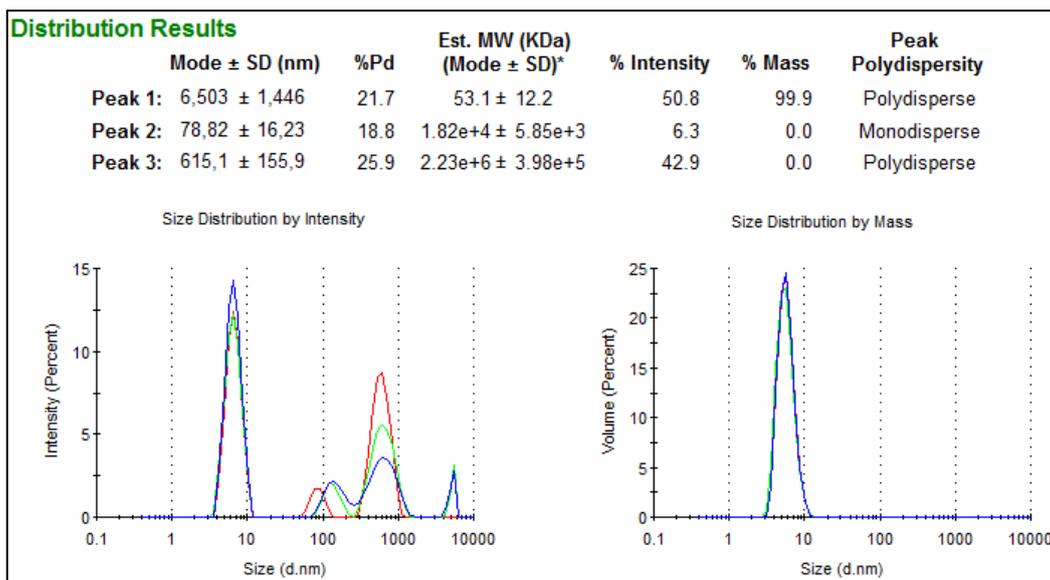


Figura 13. Gráfico do espalhamento de luz dinâmico (ELD) de man 58.

6. Caracterização enzimática

6.1. Efeito da temperatura na atividade de mananase do concentrado e de man 58.

A determinação do efeito da temperatura é de grande importância, pois é um dos parâmetros estabelecidos para aplicação industrial de enzimas. Na figura 14, pode-se observar que tanto a atividade enzimática do concentrado ($5,837 \text{ UI.mL}^{-1}$) como da fração semi-purificada man 58 ($1,080 \text{ UI.mL}^{-1}$) foram maiores a 60°C , o que também pode ser observado no trabalho de Weingartner (2010) que teve sua maior atividade enzimática de mananase a 60°C em *A. niger*, também crescido em casca de soja, porém em condições semi-sólidas. Em Kote *et al.* (2009), uma endo- β -1,4-mannanase de *A. flavus gr* foi mais ativa a 60°C .

De acordo com a literatura, enzimas que são ativas e estáveis em temperaturas elevadas apresentam características de interesse industrial, pois as mesmas poderiam, por exemplo, aumentar a velocidade da reação, diminuindo o tempo de reação no reator (Kubicek, 2013).

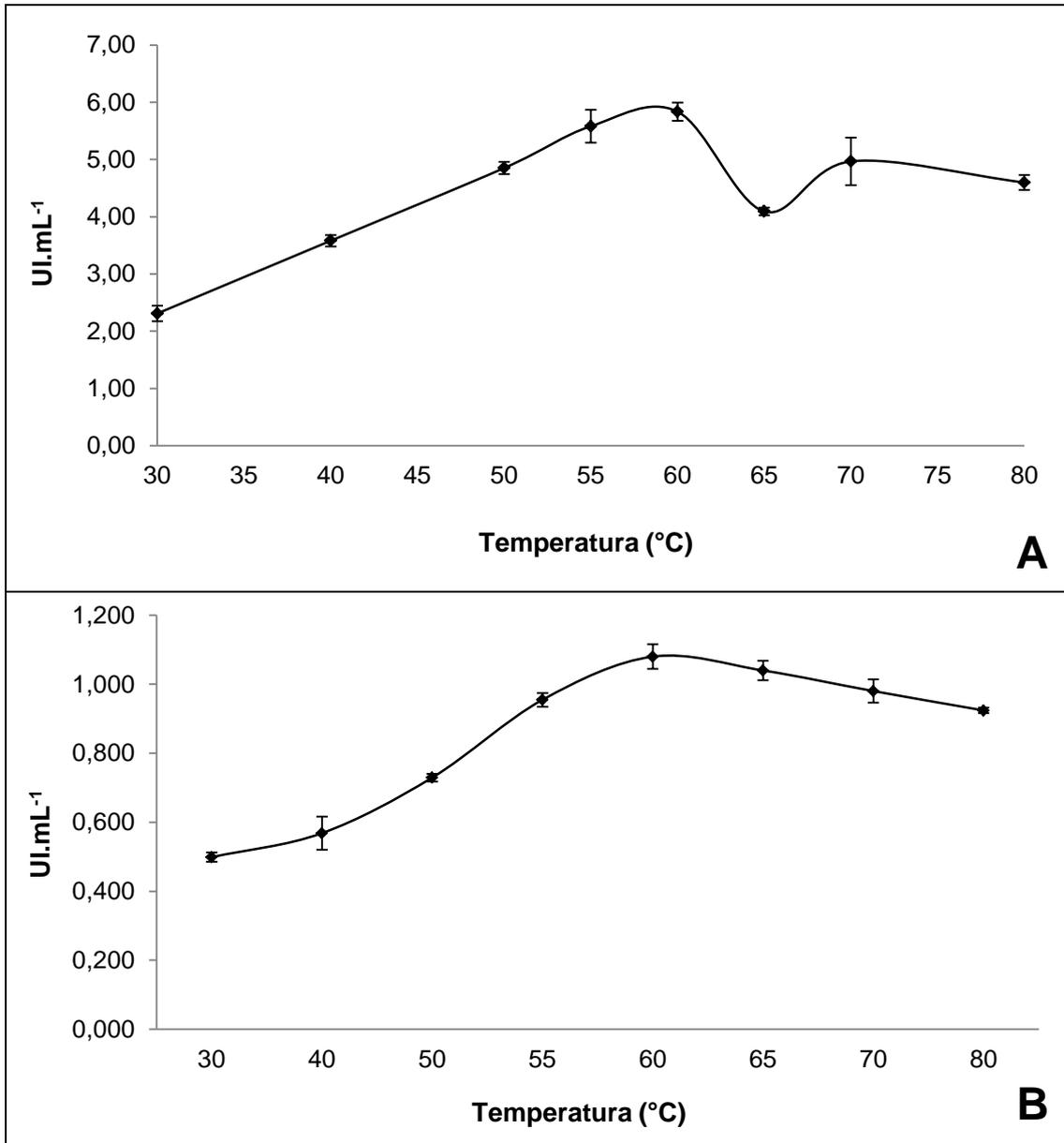


Figura 14. Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase do (A) concentrado e (B) man 58.

6.2. Efeito do pH na atividade de mananase do concentrado e de man 58

A figura 15 apresenta o gráfico do efeito de diferentes pHs sobre a atividade de mananase no concentrado e em man 58. Pode-se observar em (A) que a atividade manteve-se mais estável entre os pHs 3,5 e 4,0, havendo um contínuo decréscimo a partir do pH 4,5 até o pH 9,0. O concentrado mostrou maior atividade de mananase ($5,961 \text{ UI.mL}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0. Em man 58 (B), a maior atividade de mananase foi em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 ($0,902 \text{ UI.mL}^{-1}$), porém em menor valor em decorrência da amostra ter sido diluída quando aplicada na coluna cromatográfica Sephacryl S-100.

Tanto para o concentrado (A), como para man 58 (B), os resultados do efeito do pH são comparáveis aos obtidos por Weingartner (2010) onde a maior atividade de mananase de *A. niger* crescido em casca de soja porém em condições semi-sólidas foi observada em pH 4,0 a 60°C e Puchart *et al.* (2004) que purificaram e caracterizaram duas endo- β -1,4-mannanase de *A. fumigatus* IMI 385708, sendo que uma se mostrou mais ativa em pH 4,0 a 60°C. Lisboa *et al.* (2006) mostrou que uma endo- β -mananase isolada do endosperma de sementes de *Sesbania virgata* foi mais ativa entre os pHs 3,5 e 4,5. Blibech *et al.* (2010) mostrou que a atividade de β -mannanase de *Penicillium occitanis* Pol6 foi mais ativa em pH 4,0.

De acordo com a literatura, as mananases fúngicas apresentam maior atividade na faixa de pH ácida (Kote *et al.*, 2009; Blibech *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012), enquanto mananases de origem bacteriana apresentam maior atividade na faixa de pH neutra (Lorentz, 2005; Dhawan & Kaur, 2007).

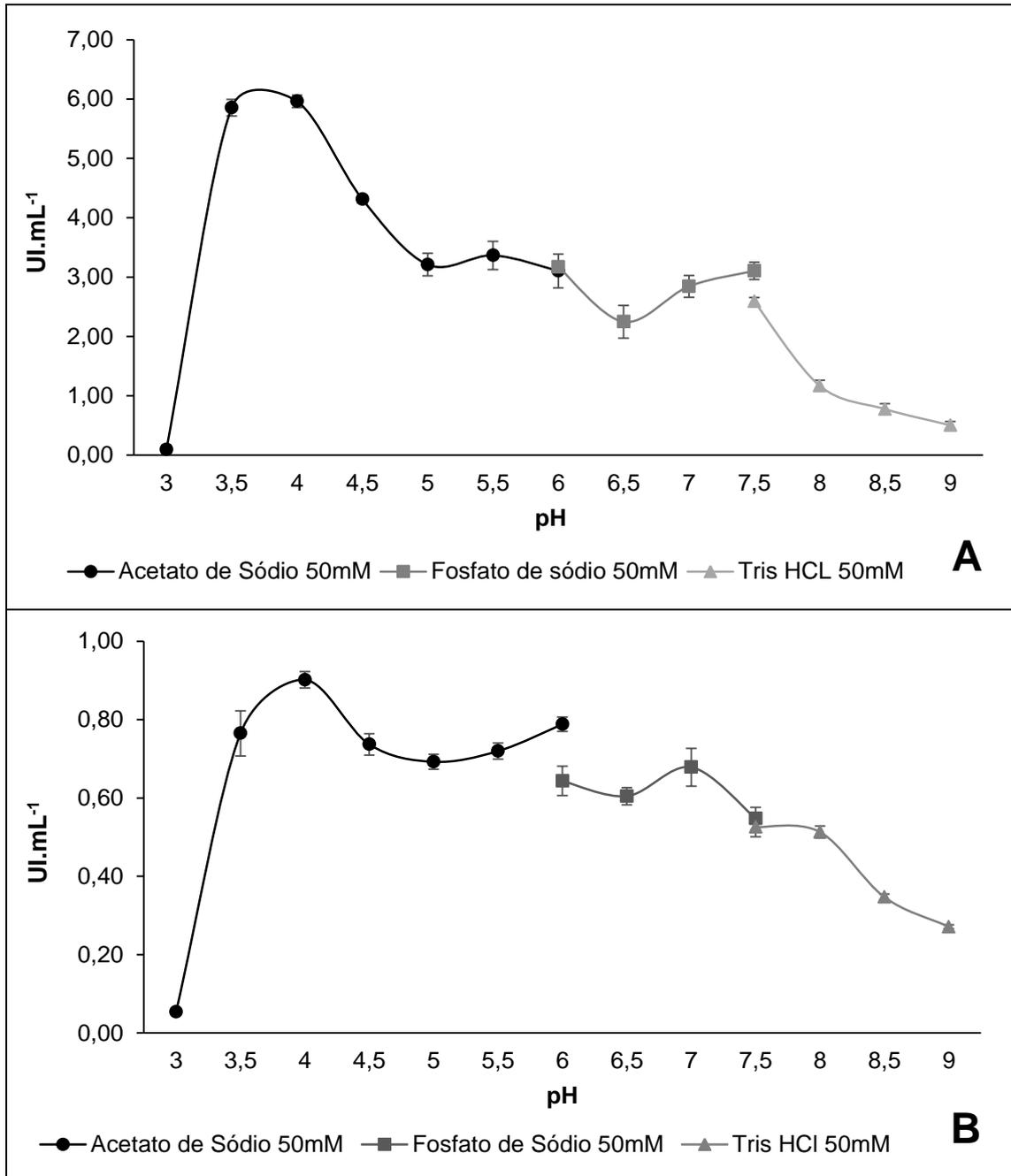


Figura 15. Efeito do pH sobre a atividade de mananase no (A) concentrado e (B) man 58.

6.3. Avaliação da termoestabilidade da atividade de mananase no concentrado e man 58.

Durante o período de 18 dias de incubação, quando incubado nas temperaturas de 40°C e 50°C, a atividade de mananase presente no concentrado (figura 16-A) manteve-se estável até o 14º dia, perdendo atividade nos dias posteriores. A 60°C, a enzima demonstrou maior atividade no 2º dia de incubação (6,448 UI.mL⁻¹) e perdeu 50% de atividade no 12º dia.

O fungo *A. foetidus*, utilizado nesse estudo, produziu mananases que apresentam estabilidade térmica de 10 dias no concentrado (figura 16-A) e de 11 dias em man 58 (figura 17-A) quando ambas foram incubadas a 60°C. De acordo com Kote *et al.*, (2009), uma endo-β-1,4 mananase produzida por *A. flavus* gr. demonstrou estabilidade térmica mantendo 50% de atividade durante 6 horas a 60°C. Quando ambos, concentrado (figura 16-B) e man 58 (figura 17-B) foram incubados a 70°C, perderam 50% de atividade a partir de 10 horas de incubação. Posteriormente, as amostras concentrado e man 58 foram incubadas a 80°C, por 3 horas. O concentrado (figura 16-B) e man 58 (figura 17-B) perderam cerca de 80 e 90% de suas atividades de mananase, respectivamente. De acordo com Siqueira (2010), enzimas termoestáveis são capazes de manter sua atividade a elevadas temperaturas (geralmente maiores que 45°C), o que favorece a solubilização e redução da viscosidade dos substratos e produtos, aumentando a taxa de reação. Outra característica importante é a maior resistência à ação de proteases. Além disso, processos biotecnológicos em temperaturas elevadas têm menor risco de contaminação microbiana (Gomes *et al.*, 2007; Siqueira, 2010)

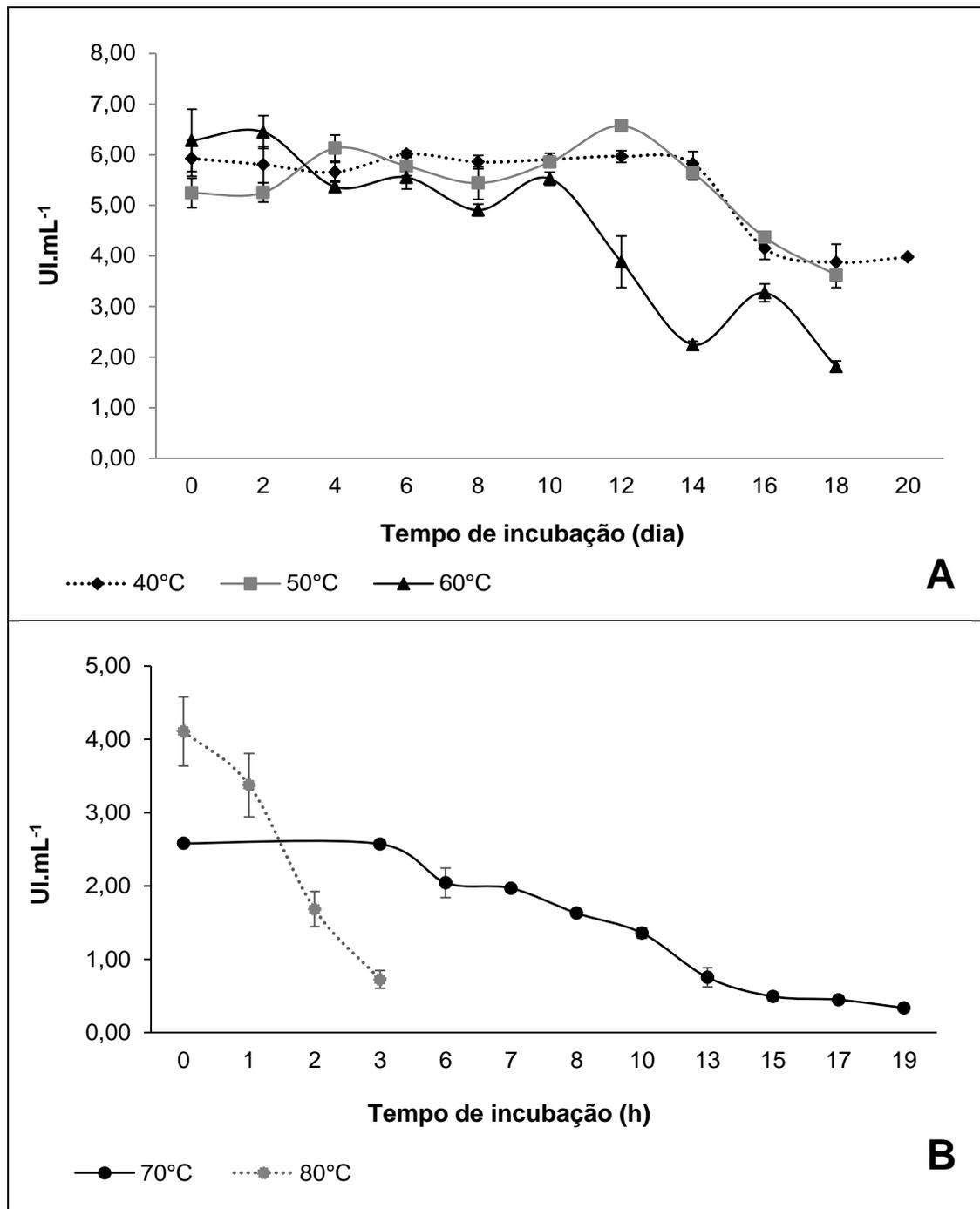


Figura 16. Termoestabilidade de mananase do concentrado nas temperaturas de (A) 40°C, 50°C e 60°C durante 18 dias e (B) 70°C e 80°C durante 19 horas.

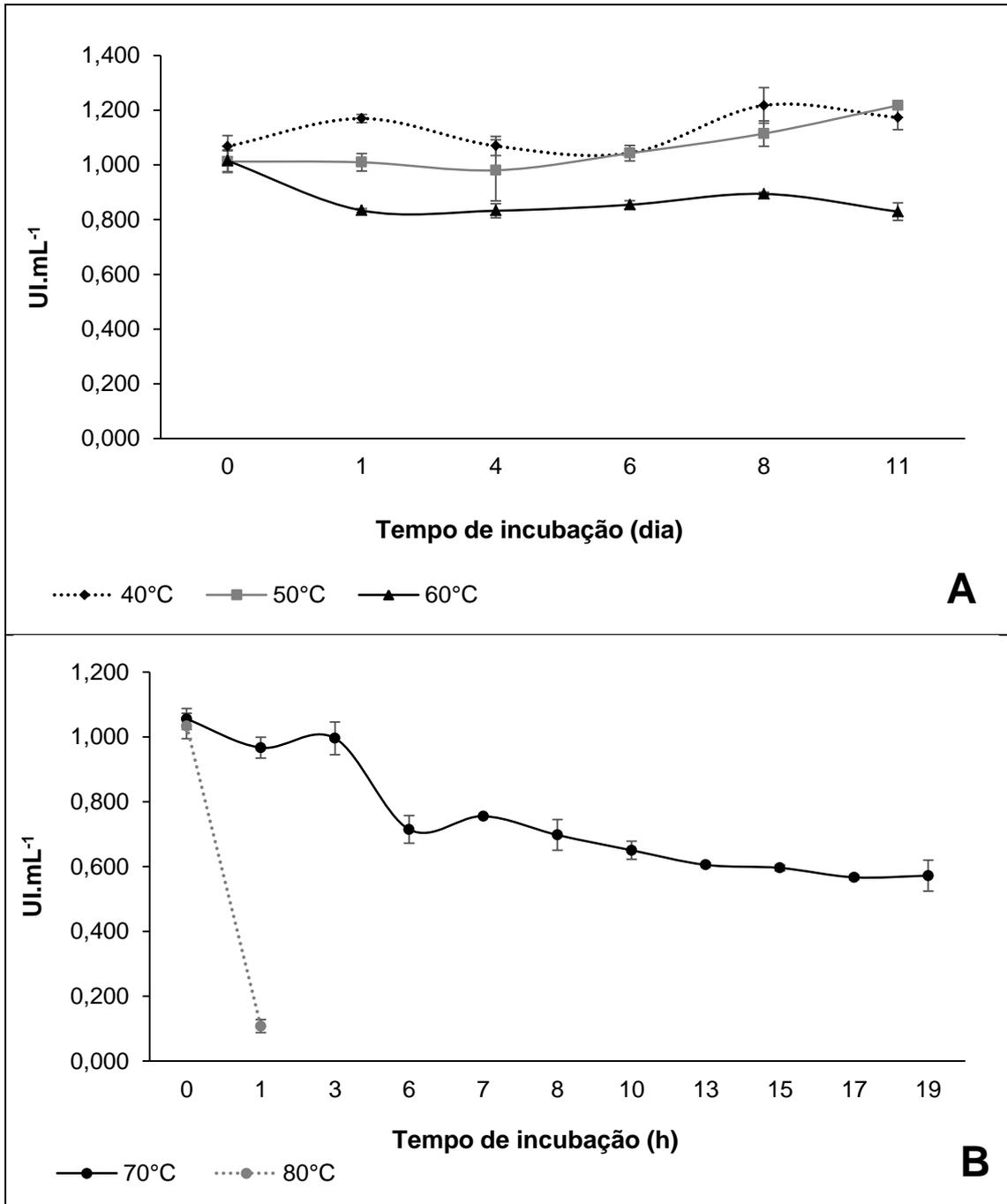


Figura 17. Termoestabilidade de man 58 nas temperaturas de (A) 40°C, 50°C e 60°C durante 11 dias e (B) 70°C e 80°C durante 19 horas.

6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de man 58 a 60°C foram analisados de acordo com a constante de Michaelis-Menten (KM), utilizando diferentes concentrações de manana em intervalos de 0,33 a 26,6 mg/mL. Os valores obtidos de KM e Vmax foram: 3,29 mg/mL⁻¹ e 1,76 UI.mL⁻¹, respectivamente, como pode ser observado na figura 17. O trabalho de Xu *et al.*, (2002), exibiu valor de KM 3.95 mg/m⁻¹ I para uma endo-β-1,4-mananase de *Mytilus edulis*. Também em Puchart *et al.*, (2004), Man I e Man II apresentaram KM 3,07 mg/m⁻¹ I e 3,12 mg/m⁻¹ I respectivamente, dados próximos ao encontrado no presente trabalho. Ainda na figura 18, observa-se que na concentração máxima de manana (26,6mg/mL⁻¹), a atividade alcançou 1,597 UI.mL⁻¹. Concentrações maiores de substrato a fim de dar continuidade a curva não puderam ser realizadas, pois a manana (galactomanana - Locust bean) é de natureza viscosa e de difícil diluição. De acordo com a literatura, β-mananases de diferentes organismos apresentam diferentes valores KM e Vmax (Franco *et al.*, 2004).

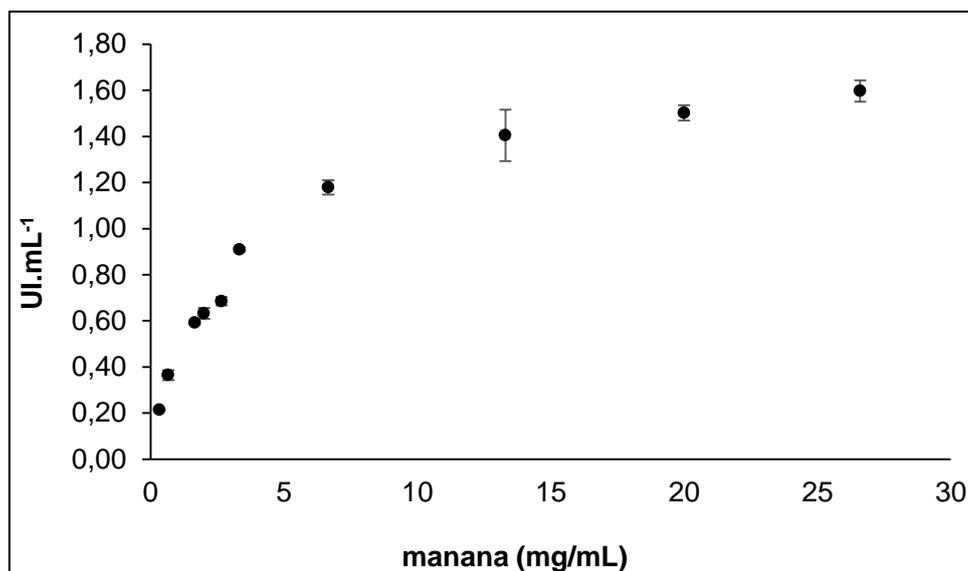


Figura 18. Efeito da concentração de manana na atividade de man 58, utilizando o software Enzifitter (Leatherbarrow, 1999).

6.5. Influência de íons metálicos na atividade de mananase de man 58

De acordo com Duarte (2013), o efeito modulador positivo ou negativo de compostos químicos constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização de possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação das enzimas. Neste contexto, o efeito de íons metálicos e EDTA foram avaliados sobre a atividade de man 58 (tabela 4).

Tabela 4. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de man 58.

Man 58		
Atividade relativa %		
	1mM	10mM
Controle	100,00 ± 0,057	100,00 ± 0,075
MgSO ₄	80,24 ± 0,039	91,90 ± 0,017
AgNO ₃	79,21 ± 0,038	117,63 ± 0,021
FeSO ₄	105,66 ± 0,034	121,99 ± 0,046
CoCl ₂	92,68 ± 0,086	110,86 ± 0,022
FeCl ₃	79,21 ± 0,036	62,42 ± 0,030
CuSO ₄	81,50 ± 0,098	65,00 ± 0,028
CaCl ₂	101,50 ± 0,024	87,53 ± 0,023
MgCl ₂	86,06 ± 0,029	84,50 ± 0,035
ZnCl ₂	95,90 ± 0,030	87,25 ± 0,057
ZnSO ₄	94,09 ± 0,043	89,76 ± 0,047
CuCl ₂	90,39 ± 0,089	64,29 ± 0,068
KCl	81,65 ± 0,133	94,12 ± 0,047
NaCl	106,93 ± 0,077	92,52 ± 0,010
EDTA	73,30 ± 0,028	89,05 ± 0,023

De acordo com a tabela 4, pode-se observar que AgNO₃ e CoCl₂ (na concentração de 1mM) e MgSO₄, FeCl₃, CuSO₄, MgCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄, CuCl₂, KCl, e EDTA (nas concentrações de 1 e 10 mM), tiveram efeitos inibitórios

sobre man 58 quando comparados com o controle. No trabalho de Tamaru *et al.*, (1995), AgNO_3 e EDTA também apresentaram efeito inibitório sobre uma β -1,4-mannanase da cepa MA-138 de *Vibrio* sp. Observa-se também na tabela 4 que CaCl_2 e NaCl apresentaram efeito de ativação sobre man 58 (na concentração de 1mM). O que também pode ser novamente comparado com o trabalho de de Tamaru *et al.*, (1995), que demonstrou ativação da enzima na presença de CaCl_2 e NaCl (na concentração de 1mM). Em Bilbech *et al.*, (2010), uma β -Mannanase de *P. occitanis* Pol6 também foi ativada na presença de CaCl_2 . Somente FeSO_4 apresentou aumento da atividade em ambas as concentrações (1 e 10 mM).

6.6. Efeito de compostos fenólicos

De acordo com Gamble *et al.*, (2000) e Tejirian & Xu (2011), os compostos fenólicos atuam como uma barreira para os microrganismos que estão em contato direto com a planta. Na parede celular vegetal, bem como na biomassa lignocelulósica, a maior parte dos compostos fenólicos é encontrada na lignina, um complexo fenólico heterogêneo, que está ligado à celulose e à hemicelulose. Quando essa biomassa lignocelulósica passa por um processo físico ou químico de pré-tratamento, ocorrem modificações estruturais na lignina, conduzindo à geração e exposição de radicais fenólicos e à formação de compostos fenólicos oligoméricos simples. Como consequência, esses compostos fenólicos apresentam um efeito inibitório na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica realizada por fungos e bactérias (Duarte *et al.*, 2012).

Todos os seis compostos fenólicos testados apresentaram pouco efeito inibitório em man 58 (tabela 5). O ácido cinâmico, responsável pela maior inibição, diminuiu 7% da atividade quando comparado ao controle. Em contrapartida o ácido ferúlico aumentou 51% da atividade de man 58.

Embora os efeitos inibitórios ou desativadores de compostos fenólicos de celulasas e hemicelulasas tenham sido bem documentados na literatura, pouco ainda é conhecido sobre a natureza das interações e seus mecanismos inibitórios (Boukari *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011).

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, man 58 mostrou ser resistente à inibição pelos compostos fenólicos estudados, apresentando potencial para futuras aplicações industriais.

Tabela 5. Efeito de compostos fenólicos na atividade de man 58.

Man 58	
Atividade relativa (%)	
Controle	100,00 ± 0,024
Ácido ferúlico	151,06 ± 0,008
Ácido cinâmico	93,37 ± 0,010
Ácido p-cumárico	103,24 ± 0,006
Ácido 4-hidroxi-benzóico	107,89 ± 0,026
Ácido tânico	98,16 ± 0,014
Vanilina	98,02 ± 0,038

6.7. Efeito de licor de auto-hidrólise

A tabela 6 mostra o efeito do Licor-30' e do Licor-50' (ver item 4.9.7), que correspondem aos licores de auto-hidrólise na atividade de man 58. Pode-se observar que o efeito do licor inibiu a atividade de man 58 em ambas as amostras, sendo maior na amostra do Licor-50', com perda de 64% de atividade em relação ao controle.

De acordo com Michelin *et al.*, (2012), o licor de auto-hidrólise contém em sua mistura, xilooligossacarídeos, arabinooligosacarídeos, glucooligos-

sacarídeos, grupos acetiloligossacarídeos, monossacarídeos (xilose, arabinose e glicose), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), o principal produto da decomposição de pentoses e hexoses. Há relatos na literatura, que furfural e HMF são inibidores do metabolismo microbiano (Felipe *et al.*, 1993; Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996). Dessa forma, a eficiência da atividade enzimática em contato com o licor de auto-hidrólise vai depender também da tolerância dos efeitos inibitórios causados por vários compostos tóxicos presentes nestes licores.

Tabela 6. Efeito do licor de auto-hidrólise na atividade de man 58.

Man 58		
Atividade relativa (%)		
	Licor - 30'	Licor - 50'
Controle	100% ± 0,017	100% ± 0,048
Efeito licor	75% ± 0,005	30,6% ± 0,008

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Por meio dos experimentos realizados foi possível constatar que o fungo *A. foetidus* demonstrou ser produtor de holocelulases, apresentando elevadas atividades de mananase, xilanase e pectinase quando crescido em casca do grão da soja.

Tanto o concentrado como man 58 foram mais ativos em tampão acetato de sódio 50mM pH 4,0 a 60°C, bem como foram termoestáveis a 60°C. Essa característica é importante, pois enzimas termoestáveis são capazes de manter sua atividade a elevadas temperaturas, podendo ser utilizada em vários processos industriais.

Man 58 mostrou resistência à inibição pelos compostos fenólicos estudados. Os ácidos ferúlico, p-cumárico e 4-hidroxi-benzóico ativaram man 58. Essas características são importantes, pois esses compostos são formados durante o pré-tratamento da biomassa. Sendo então, necessário dar continuidade ao estudo para uma melhor compreensão do mecanismo que leva à resistência destas enzimas aos compostos.

A avaliação por espalhamento de luz dinâmico (ELD) confirmou a presença de outras partículas na amostra semi-purificada man 58.

Outro ponto positivo é que a indústria necessita de um coquetel de enzimas que atuem sinergicamente para uma eficiente hidrólise da biomassa lignocelulósica, como caldos enzimáticos impuros ou parcialmente purificados, que são utilizados como catalisadores em conversões químicas industriais. E tanto o concentrado como man 58 apresentam características promissoras.

Seria interessante dar continuidade ao processo de purificação e caracterização para um melhor conhecimento das enzimas presentes na fração man 58.

E por fim, analisar a aplicação do seu desempenho enzimático em processos industriais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S.; OERTEL, A. C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Cerne**, v.5, n.1, p. 052-060, 1999.

ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPAA, V.; DRAKENBERG, T.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase. **Journal of biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 199-210, 1998.

ANDREAUS, J.; FILHO, E. X. F.; BON, E. P. S. Biotechnology of Holocellulose - Degrading Enzymes. In: HOU, C.T.; SHAW, J.-F. (Org.). **Biocatalysis and Bioenergy**. John Wiley & Sons, Inc. ed., 2008. p. 197-229.

APROSOJA. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br>> Acesso em: 15 fev. 2013.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. Nova York: John Wiley & Sons, 1988.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMA, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 2-19, 2012.

BLIBECH, M.; GHORBEL, R. E.; CHAARI, F.; DAMMAK, I.; BHIRI, F.; NEIFAR, M.; CHAABOUNI, S. E. Improved mannanase production from *Penicillium occitanis* by Fed-batch fermentation using Acacia seeds. **ISRN Microbiol**, v. 2011, p. 1-5, 2011.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, n.2, p. 93-99, 1987.

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 130-138, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675-4683, 2011.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJEE, A.; DAS, T. K. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: An implication of bioremediation of lead from liquid media. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 134-142, 2013.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHAUHAN, P. S.; PURI, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 5, p. 1817-1830, 2012.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p.241-312, 1975.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.35, p.341-376, 1978.

DHAWAN, S.; KAUR, J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Crit Rev Biotechnol**, v. 27, n. 4, p. 197-216, 2007.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.; GÓMEZ-MENDOZA, D.; SIQUEIRA, F. G. D.; BATISTA, L.; AMARAL, L.; RICART, C.; FILHO, E. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

DUARTE, G. **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica**. 2013. 220 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=112&cod_pai=33>. Acesso em: 10/01/2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2004. Disponível em: < <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=282>>

Acesso em: 01/11/2013.

FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; ROSA, S. A. M. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, p. 103-114, 1993.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. EDUCS, 2010. p. 215-242.

FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 23-29, 2004.

FILHO, E. X. F.; PULS, H.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 171-180, 1993.

FILHO, E. X. F. Hemicellulases and biotechnology. In: PANDALAI, S. G. (Ed.). **Recent research developments in microbiology**. Trivandrum, 1998. p.165-176.

FRANCO, P. F.; FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v.40, p.255-259, 2004.

GAMBLE, G.R.; SNOOK, M.E.; HENRIKSSON, G; AKIN, D. E. Phenolic constituents in the bast tissue and inhibition of cellulose and pectinase. **Biotechnol**, v. 22, p. 741–746, 2000.

GARMUS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V.; RIGO, M.; CÓRDOVA, K. R. V. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de casca de batata (*Solanum tuberosum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, p. 56-65, 2009.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas Termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. **Química Nova**, v. 30, n.1, p.136-145, 2007.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375-84, 2005.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. Protein purification methods: a practical approach. 5. ed. Oxford: IRL Press, 1994.

HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

IMCOPA. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/empresa/index/aba/5>>. Acesso em: 15/02/2013.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger*. **Research Journal of Biological Sciences**, v.2, n.1, p. 13-16, 2007.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in applied microbiology**, v. 47, p. 221-268, 2000.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 687-697, 2009.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 493-522.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 408-415, 2011.

KOTE, N. V.; PATIL, A. G. G.; MULIMANI, V. H. Optimization of the Production of Thermostable endo- β -1,4 Mannanases from a Newly Isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 213-223, 2009.

KUBICEK, C. P. **Fungi and lignocellulosic biomass**. John Wiley & Sons, Inc., 2013.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. **Enzfitter Manual, a Non-Linear Curve Fitting Program for Windows**. London: Biosoft, 1999.

LI, S.; XU, S.; LIU, S.; YANG, C.; LU, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Process Technol**, v. 85, n. 8-10, p. 1201-1211, 2004.

LIMA, D. U. **Interação molecular entre celulose e hemiceluloses e suas implicações biológicas e tecnológicas**. 2002. (Doutorado). Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8217-8223, 2010.

LISBOA, C. G. S.; TONINI, P. P.; TINÉ, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 18, n. 2, p. 269-280, 2006.

LORENTZ, R.H. **Seleção de isolados de *Paenibacillus spp* com atividade enzimática e antimicrobiana**. 2005. 103 (Mestrado). Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

MACHADO, F. S.; JUNIOR, R. G.; TEIXEIRA, A. M.; CAMPOS, M. M.; PEREIRA, L. G. R. A polpa citrica e a casca de soja na formulação de dietas para vacas de leite. **Simpósio Nacional sobre Nutrição de Gado de Leite**, p. 115-127, 2012.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. 2012. 88 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

MCCLEARY, B. V. β -D-Mannanase. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 596-610, 1988.

MCCLEARY, B.V. Comparison of Endolytic Hydrolases That Depolymerize 1,4- β -D-Mannan, 1,5- α -L-Arabinan, and 1,4- β -D-Galactan. **Acs Symposium Series**, v. 460, p. 437-449, 1991.

MEDEIROS, S.R. Casca de soja na ração. **Revista Cultivar Bovinos**, v. 10, p. 14-17, 2004.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in energy and combustion science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SØRENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 337-344, 2009.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M. L.T. M.; RUZENE, D.S.; & Daniel P. SILVA ; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; TEIXEIRA, J. A. Xylanase and β -Xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus*: New Perspectives for the Application of Wheat Straw Autohydrolysis Liquor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 336-347, 2012.

MIELENZ, J.R.; BARDSLEY, J.S.; WYMAN, C.E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532-3539, 2009.

MILANEZI, N.V.G. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4- β -xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial**. 2010. 94 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **BRASIL PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO 2011/2012 a 2021/2022**. . Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projeco es do Agronegocio Brasil 2011-20012 a 2021-2022 \(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projeco es do Agronegocio Brasil 2011-20012 a 2021-2022 (2)(1).pdf)>. Acesso em: 15/02/2013.

MOHAMAD, S. N.; RAMANAN, R. N.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Improved mannan-degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 147-152, 2011.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165-78, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FILHO, E. X. F. Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 6, p.73-96.

MOREIRA, L. R. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. 2013. 297 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

NETO, J. B. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**: Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001. v.3, p. 377-390.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward and industrial metabolism. **Biochemie**, v. 91, p.659-664, 2009.

ODETALLAH, N. H.; FERKET, P. R.; GRIMES, J. L.; MCNAUGHTON, J. L. Effect of mannan-endo-1,4-beta-mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. **Poultry science**, v. 81, n. 9, p. 1322-1331, 2002.

OLANIYI, O. O.; AROTUPIN, D. J. Fermentation Products of β -Mannanase Producing Bacteria Inhibit Selected Poultry Borne Pathogens. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 4, p. 612-622, 2013.

OLIVEIRA, A.S. Casca de soja na alimentação de ruminantes. Disponível em: <<http://www.serrana.com.br/NutricaoAnimal/BoletimTecnico/PDF/Fevereiro2006.pdf>> Acesso em: 06/12/2013.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312–331, 1996.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p.173-186, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHERA, F.; CHANZYB, H.; TARAVELB, F. R.; VUONGB, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 2, p. 107-112, 2001.

POLIZELI, M. L.; , RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-91, 2005.

PUCHART, V.; VRSĀNSKA', M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; ÖGEL, Z. B.; BIELYA, P. Purification and characterization of two forms of endo-h-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, p. 239-250, 2004.

RESTLE, J.; FATURI, C.; FILHO, D. C. A.; BRONDANI, I. L.; SILVA, J. H. S.; KUSS, F.; SANTOS, C. V. M.; FERREIRA, J. J. Substituição do Grão de Sorgo por Casca de Soja na Dieta de Novilhos Terminados em Confinamento. **R. Bras. Zootec.**, v. 6, p. 1009-1015, 2004.

RETORE, M. ; SILVA, L.P.; TOLEDO, G.S.P.; ARAÚJO, I.G. Efeito da fibra de co-produtos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1232-1240, 2010.

ROJAS, M.J. **Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja**. 2012. 95 (Mestrado). Departamento de Engenharia Bioquímica. Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

SAMSON, R. A.; HONG, S-B.; FRISVAD, J.C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, v. 44, n. s1, p.133-148, 2006.

SANTOS, I. D. **Holocelulose e Extrativos na Densidade Básica e Contração da Madeira e nos Rendimentos e Densidade do Carvão Vegetal**. 2008. 57 (Mestrado). Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasil.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263-89, 2010.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 426-35, 2002.

SHAH, A. R.; SHAH, R. K.; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresource technology**, v. 97, n. 16, p. 2047-53, 2006.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHARMA, P.; SINGH, L. Application of response surface analysis for biodegradation of azo reactive textile dye using *Aspergillus foetidus*. **Journal of basic microbiology**, v. 52, n. 3, p. 314-23, 2012.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SIQUEIRA, F. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases**. 2010. 276 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Bentham Science Publishers**, v. 7, n. 1, p. 55-60, 2010.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: An overview. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295–317, 2005.

STRULLU-DERRIEN, C.; STRULLU, D-G. Mycorrhization of fossil and living plants. **Comptes Rendus Palevol**, v. 6, n. 6-7, p. 483-494, 2007.

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

SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. Principles and Applications of Soil Microbiology. *Edited by*. New Jersey: [s.n.], 1998. p. 550.

TAMARU, Y.; ARAKI, T.; AMAGOI, H.; MORI, H.; MORISHITA, T. Purification and characterization of an extracellular β -1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio sp.* strain MA-138. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n. 12, p. 4454-4458, 1995.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enz Microb Technol**, v. 48, p.239–247, 2011.

TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase. **Journal of biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 199-210, 1998.

UENOJO, M.; PASTORE, M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

ULHOA, C.J.; SILVA, R, N. Biotecnologia Farmacêutica e seus desafios. In: **Revista UFG**, n. 1, ano IX, 2007.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VAN ZYL, W. H.; ROSEA, S. H.; TROLLOPEB, K.; GÖRGENSB, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203-1213, 2010.

VIIKARI, L.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; RA"TTTO", M.; BAILEY, M.; SIIKA-AHO, M.; LINKO, M. Hemicellulases for industrial applications. In: SADDLER, J.N. (Ed.), **Biotechnology in Agriculture**, No. 9. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. C.A.B. International, Wallingford., 1993. p. 131-182.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p.335–350, 1994.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

WEINGARTNER, V. **Produção, Purificação e Identificação de Mananase, Obtida por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Cascas de Soja e *Aspergillus niger***. 2010. 161 (Doutorado). Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Brasil

XU, B.; SELLOS, D.; JANSON, J. C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene. **Eur. J. Biochem**, n. 269, p. 1753-1760, 2002.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.