



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

NINA ROSA TORRES DE DEUS E MELLO

**UTILIZAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA NA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS MICROBIANAS INDUSTRIAIS**

RECIFE

2015

NINA ROSA TORRES DE DEUS E MELLO

**UTILIZAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA NA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS MICROBIANAS INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto Maior

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mello, Nina Rosa Torres de Deus e

Utilização da palma forrageira na produção de enzimas microbianas industriais/
Nina Rosa Torres de Deus e Mello. – Recife: O Autor, 2015.

64 f.: il.

Orientador: Ana Maria Souto Maior, Gláucia Manoella de Souza Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial,
2015.

Inclui referências e apêndices

1. Enzimas 2. Enzimas – Aplicações industriais 3. Biotecnologia – Indústria I. Maior, Ana Maria Souto (orient.) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-020

NINA ROSA TORRES DE DEUS E MELLO

**UTILIZAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA NA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS MICROBIANAS INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 28/05/2015

**COMISSÃO EXAMINADORA
TITULARES**

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto-Maior
Departamento de Antibióticos /UFPE

Prof^a. Dr^a Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha
Departamento de Engenharia Química /UFPE

Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Departamento de Antibióticos /UFPE

SUPLENTE

Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo
Departamento de Antibióticos /UFPE

Prof^a. Dr^a. Eulalia Camelo Pessoa Azevedo Ximenes
Departamento de Antibióticos /UFPE

Recife, 28 de Maio de 2015.

*Aos meus pais Alice e André. Aos meus familiares,
especialmente minha tia Angela,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, pelas bênçãos concebidas a mim.

Aos meus amados pais, **Alice e André**, pela confiança, amor e apoio. Ao incentivo dado para conclusão de mais uma etapa da minha vida. A quem deverei sempre minha educação.

A toda a **minha família** que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me compreendendo nas reuniões familiares em que estive ausente, por estar realizando experimentos e abdicando dos meus finais de semana.

A minha querida tia e madrinha, **Angela**, por ter me ajudado nessa caminhada. Pelas dúvidas tiradas, ensinamentos ou até mesmo pelo simples ouvir dos meus problemas. A quem tenho total admiração pela garra e gosto pelos estudos.

Ao meu namorado, **Lucas**, pelo amor, paciência e companheirismo. Pelos finais de semanas abdicados junto a mim, acompanhando-me nas idas ao Laboratório para realização dos experimentos.

A minha orientadora e professora, **Ana Maria Souto Maior**, pelas orientações, confiança e apoio durante todos os anos de desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigado.

A professora **Gláucia Manoella de Souza Lima**, pela co-orientação e colaboração para cumprimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, **Cynthia, Iranildo, Juliette, Marcinha, Monike, Thiago e Vanessinha**, pela ajuda prestada durante as fermentações, aos conhecimentos compartilhados. Principalmente, pela amizade construída e por fazer dos dias “árduos” de trabalho, bons momentos de descontração. Desejo a vocês muito sucesso.

Aos laboratórios do **Departamento de Antibióticos** pela infra-estrutura fornecida para que eu conseguisse realizar todas as análises dos meus experimentos.

A minha turma do mestrado em Biotecnologia Industrial, **Carla, Gabi, Helloise, Hortência, Laís, Raphael, Sabrina, Samara, Suellen** que se uniu para conseguirmos chegar ao fim, pelas ajudas prestadas, conselhos e boas risadas. Pela troca de conhecimento, que sem ele não chegaríamos a lugar algum. Que essa amizade nunca se perca pelo caminho da vida.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

A palma forrageira é uma cactácea cultivada no semiárido nordestino, capaz de se desenvolver mesmo em solos deficientes em nutrientes e água. Por ser rica em carboidratos, tem um grande potencial para utilização em processos biotecnológicos para produção de diversos bioprodutos. O objetivo deste trabalho foi investigar a utilização da palma forrageira como substrato para a produção de enzimas microbianas de interesse industrial, em particular, para a aplicação na hidrólise de biomassas em biorrefinarias. Cladódios de *Opuntia ficus-indica*, vulgarmente conhecida como palma gigante, foram fornecidos pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e utilizados em todos os experimentos. Inicialmente, foi realizado um “screening” de microorganismos do gênero *Bacillus*, pertencentes à Coleção de Microrganismo do Departamento de Antibióticos. O “screening” foi feito com 10 linhagens, em placas de Petri, em meio sólido contendo pó de palma seca como fonte de carbono. Entre as 7 linhagens capazes de crescer no meio sólido, a linhagem com colônia de maior diâmetro foi selecionada para investigação sobre a produção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas em fermentação submersa. As fermentações submersas foram realizadas com a linhagem selecionada, *Bacillus* sp. UFPEDA 472, e outros 3 micro-organismos: *Trichoderma reesei* RUT C-30, *Aspergillus awamori* e *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414, já reconhecidos como bons produtores de enzimas. A produção de atividades enzimáticas foi investigada em frascos agitados em mesa agitadora (New Brunswick Scientific, C25KC) e em biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo110), utilizando-se o pó e a fração pectica da palma, respectivamente. As condições de aeração e agitação do reator foram: 1 vvm e 500 rpm, respectivamente; a temperatura e o pH foram controlados, respectivamente, em: 30°C e 5,0, para os fungos filamentosos, 30°C e 7,0, para *Bacillus* sp., e 37°C e 6,0 para *S. rochei*. Atividades enzimáticas FPase, CMCase, xilanase e pectinase foram determinadas durante as fermentações utilizando-se como substratos: papel de filtro Whatman nº1, carboximetilcelulose 4%, xilana 1% e pectina cítrica 1%, respectivamente. As concentrações de açúcares e ácido galacturônico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, Série 1100). A palma e a sua fração pectica foram capazes de induzir a produção de todas as atividades enzimáticas investigadas em *T. reesei*, principalmente xilanase (7,75 UI/mL), mas baixas atividades celulolíticas foram observadas para os outros microorganismos. Por outro lado, maiores atividades pectinolíticas foram observadas para *S. rochei* e *A. awamori* (2,24 UI/mL e 1,84 UI/mL, respectivamente). Os resultados levaram à conclusão de que a biomassa de cladódios da palma forrageira gigante e a sua fração pectica são substratos potenciais para produção de enzimas – em particular, por *Trichoderma reesei* RUT C30 – capazes de atuar na hidrólise de biomassas lignocelulósicas em biorrefinarias.

Palavras-chave: *Opuntia ficus-indica*. Celulases. Hemicelulases. Pectinases. Biorrefinarias.

ABSTRACT

The prickly pear is a cactus cultivated in the semi-arid northeast region of Brazil, able to grow even in soil poor in nutrients and water. Being rich in carbohydrates, it has great potential for use in biotechnological processes for production of various bioproducts. The aim of this study was to investigate the use of prickly pear as a substrate for the production of microbial enzymes of industrial interest, in particular for application in biomass hydrolysis in biorefineries. Cladodes of *Opuntia ficus-indica*, commonly known as giant palm in Brazil, were provided by the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) and used in all experiments. Initially, a screening was carried out with microorganisms of the genus *Bacillus* from the Microbial Collection of the Department of Antibiotics. The screening was performed with 10 strains in Petri dishes on solid medium containing cactus dry powder as a carbon source. Among the 7 strains capable of growing on the solid medium, the strain with the larger colony diameter was selected for investigation on the production of cellulolytic, pectinolytic and hemicellulolytic enzymes in submerged fermentation. The submerged fermentations were carried out with the selected strain, *Bacillus* sp. UFPEDA 472, and other three microorganisms: *Trichoderma reesei* RUT C-30, *Aspergillus awamori* and *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414, already recognized as good producers of enzymes. The production of enzyme activities was investigated in Erlenmeyer flasks in rotatory shaker (New Brunswick Scientific, C25KC) and instrumented bench bioreactor (New Brunswick Scientific, Bioflo110), using the powder and pectin fraction from the cactus, respectively. The conditions of aeration and agitation of the reactor were: 1 vvm and 500 rpm, respectively; the temperature and pH were controlled respectively at: 30 ° C and 5.0 for filamentous fungi, 30 ° C and 7.0 for *Bacillus* sp., and 37 ° C and 6.0 for *S. rochei*. FPase, CMCase, xylanase and pectinase enzymatic activities were determined during the fermentations using Whatman n°1 filter paper, carboxymethylcellulose 4%, xylan 1% and citrus pectin 1%, as substrates, respectively. The concentrations of sugars and galacturonic acid were determined by high-performance liquid chromatography (Agilent Technologies, 1100 Series). The cactus and its pectic fraction were able to induce the production of all enzyme activities investigated in *T. reesei*, mostly xylanase (7,75 UI/mL), but lower cellulolytic activities were observed for the other microorganisms. On the other hand, higher pectinolytic activities were observed for *S. rochei* and *A. awamori* (2,24 UI/mL and 1,84 UI/mL, respectively). It was concluded that the cladodes biomass of giant cactus and its pectin fraction are potential substrates for the production of enzymes - in particular by *Trichoderma reesei* RUT C30 - able to act in the hydrolysis of lignocellulosic biomass in biorefineries.

Keywords: *Opuntia ficus-indica*. Cellulases. Hemicellulases. Pectinases. Biorefineries

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Ação das celulasas na degradação da celulose. Adaptado de LYND, 2002.....	22
Figura 3.2	Enzimas xilanolíticas atuando na degradação da xilana	24
Figura 3.3	Ação da pectina esterase na degradação da pectina, hidrolisando os grupos metil ésteres liberando metanol. Fonte: SANTI, 2005.....	25
Figura 3.4	Ação das exo-poligalacturonases tipo 1 sobre o ácido poligalacturônico, liberando monômeros de ácido galacturônico pela hidrólise da pectina não esterificada.....	26
Figura 3.5	Ação da exo-pectina liase gerando uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 (em vermelho).....	27
Figura 4.1	Moinho de facas (Fritsch, Pulverisette 14).....	29
Figura 4.2	Centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen, Rotina 420R).....	30
Figura 4.3	Mesa agitadora (New Brunswick Scientific, C25KC).....	33
Figura 4.4	Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110).....	33
Figura 5.1	Colônias de <i>Bacillus</i> em meio de cultura a base de palma gigante, incubadas a 30°C por 24 horas. Numerações de acordo com o armazenamento da Coleção de Microrganismo do Departamento de Antibióticos da UFPE. Fonte: próprio autor.....	37
Figura 5.2	Perfil de produção de enzimas por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	39
Figura 5.3	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	40
Figura 5.4	Perfil de produção de enzimas por <i>Aspergillus awamori</i> em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	41
Figura 5.5	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Aspergillus awamori</i> em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	41
Figura 5.6	Perfil de produção de enzimas por <i>Bacillus</i> sp. em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	42

Figura 5.7	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Bacillus</i> sp.em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	42
Figura 5.8	Perfil de produção de enzimas por <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	43
Figura 5.9	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	43
Figura5.10	Perfil de produção de enzimas por <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	44
Figura 5.11	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	44
Figura 5.12	Perfil de produção de enzimas por <i>Aspergillus awamori</i> em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	45
Figura 5.13	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Aspergillus awamori</i> em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	46
Figura 5.14.	Perfil de produção de enzimas por <i>Bacillus</i> sp.em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	47
Figura 5.15	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Bacillus</i> sp. em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	47
Figura 5.16	Perfil de produção de enzimas por <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414 em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	48
Figura 5.17	Variação do consumo do substrato durante o cultivo de <i>Streptomyces rochei</i> CA-17 em meio contendo a fração péctica da palma forrageira (<i>Opuntia fícus-indica</i>).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Composição do meio AN.....	31
Tabela 4.2	Composição do meio ISP-4.....	31
Tabela 4.3	Composição do meio BDA.....	31
Tabela 4.4	Composição do meio para fermentação.....	32
Tabela 5.1	Diâmetro médio das colôniasde <i>Bacillus</i> spp. em meio de cultura a base de palma forrageira.....	38
Tabela 5.2	Atividades máximas obtidas de cultivos em frascos agitados.....	49
Tabela 5.3	Atividades máximas obtidas de cultivos em biorreator de bancada.....	49
Tabela A.1	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30.....	57
Tabela A.2	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Aspergillus awamori</i>	57
Tabela A.3	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 472.....	57
Tabela A.4	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414.....	58
Tabela B.1	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30.....	59
Tabela B.2	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Aspergillus awamori</i>	59
Tabela B.3	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 472.....	59
Tabela B.4	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414.....	60
Tabela C.1	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30.....	61
Tabela C.2	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Aspergillus awamori</i>	61
Tabela C.3	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 472.....	61

Tabela C.4	Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414.....	62
Tabela D.1	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30.....	63
Tabela D.2	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Aspergillus awamori</i>	63
Tabela D.3	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 472.....	63
Tabela D.4	Concentrações de substratos durante o cultivo por <i>Streptomyces rochei</i> UFPEDA 3414.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABF	α -L- arabinofuranosidase
AN	Ágar Nutritivo
AXE	Acetilxilanesterase
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BXL	β -xilosidase
CBH	Celobiohidrolase
CBH I	Celobiohidrolase tipo I
CBH II	Celobiohidrolase tipo II
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EC	Enzime Comission
Endo-PG	Endo- poligalacturonase
Endo-PMG	Endo-polimetilgalacturonase
Eng	Endoglucanase
Exg	Exoglucanase
Exo-PG	Exo- poligalacturonase
Exo-PMG	Exo-polimetilgalacturonase
GH	Glucano-hidrolase
ISP-4	International Streptomyces Project Medium 4
PG	Poligalacturonase
PGL	Poligalacturonato liase
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGL	Polimetilgalacturonato liase
RG I	Ramnogalacturonana I
RG II	Galacturonana substituídas
UI	Unidade Internacional
XLN	Endoxilanase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 Biomassa Vegetal.....	17
3.1.1 Palma forrageira.....	18
3.2 Enzimas de Interesse Industrial.....	20
3.2.1 Enzimas celulolíticas.....	21
3.2.2 Enzima xilanase.....	23
3.2.3 Enzimas pectinolíticas.....	24
3.3 Micro-organismos Produtores de Enzimas.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Matéria-Prima.....	29
4.1.1 Pó da palmaforrageira	29
4.1.2 Fração péctica da palma forrageira.....	29
4.2 Micro-organismos.....	30
4.3 Meios de Cultivo.....	30
4.3.1 Meios de manutenção dos micro-organismos.....	30
4.3.2 Meios de produção de enzimas.....	32
4.4 Procedimento Experimental.....	32
4.4.1 “Screnning” das linhagens de <i>Bacillus</i>	32
4.4.2 Produção de enzimas por fermentação submersa.....	32
4.4.2.1 Preparação de inóculos.....	33
4.4.2.2 Fermentação submersa.....	34
4.5 Métodos Analíticos.....	34
4.5.1 Determinação das atividades enzimáticas.....	34
4.5.1.1 Atividades celulolíticas.....	35
4.5.1.2 Atividade xilanolítica.....	36
4.5.1.3 Atividade pectinolítica.....	36
4.5.2 Determinação da concentração dos substratos.....	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 “Screening” das Linhagens.....	37
5.2 Produção de Enzimas.....	38
5.2.1 Fermentação em frascos agitados.....	39
5.2.1.1 Produção de enzimas por <i>Trichoderma reesei</i>	39
5.2.1.2 Produção de enzimas por <i>Aspergillus awamori</i>	40
5.2.1.3 Produção de enzimas por <i>Bacillus</i> sp.....	41
5.2.1.4 Produção de enzimas por <i>Streptomyces rochei</i>	42
5.2.2 Fermentação em biorreator de bancada.....	44
5.2.2.1 Produção de enzimas por <i>Trichoderma reesei</i>	44
5.2.2.2 Produção de enzimas por <i>Aspergillus awamori</i>	45
5.2.2.3 Produção de enzimas por <i>Bacillus</i> sp.....	46
5.2.2.4 Produção de enzimas por <i>Streptomyces rochei</i>	47
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS.....	51
Apêndice A – Tabelas com resultados da produção de enzimas em frascos agitados.....	57
Apêndice B – Tabelas com resultados das concentrações de substratos em frascos agitados.....	59
Apêndice C – Tabelas com resultados da produção de enzimas em biorreator de bancada.....	61
Apêndice D – Tabelas com resultados das concentrações de substratos em biorreator de bancada.....	63

1 INTRODUÇÃO

A utilização de energia fóssil, nos mais diversos segmentos da economia mundial, não atende aos critérios de desenvolvimento sustentável, fazendo-se necessária a utilização de matérias-primas renováveis como alternativa, tanto para produção de energia como de produtos, revelando-se, assim, um grande desafio para a economia industrial, pela demanda de tecnologias específicas. Para alcançar essa finalidade, surgiu o conceito de biorrefinarias, que consistem em instalações que integram processos capazes de converter biomassas em combustíveis, produtos químicos e energia, tendo como objetivo, uma economia sustentável, otimizando o uso de recursos e minimizando os efluentes, para o aproveitamento de todo o potencial econômico da biomassa (FERNANDO *et al.*, 2006; OCTAVE e THOMAS, 2009).

Dentre os vegetais disponíveis no semiárido nordestino, a palma forrageira possui um grande potencial de aproveitamento, devido as suas características anatômicas e morfofisiológicas. É capaz de ser cultivada mesmo em solos deficientes em nutrientes e água, e é uma biomassa rica em carboidratos, apresentando assim um potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como enzimas e etanol, dentre outros (CHIACCIO *et al.*, 2006).

Uma gama de micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, tem a capacidade de hidrolisar polissacarídeos presentes em biomassas, como celulose, hemicelulose e pectina. O grupo de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas é responsável por uma grande parte do mercado mundial de enzimas, tendo os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* como principais produtores (BHAT, 2000). Entre as bactérias que produzem celulase encontram-se *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum* (RABELO, 2007) e *Bacillus subtilis* (AKHTAR *et al.*, 2001). As actinobactérias também vêm sendo exploradas pela produção de enzimas com aplicação na indústria alimentícia; dentre as bactérias pertencentes a este filo destacam-se o gênero *Streptomyces*, que produz enzimas tais como: celulasas, amilases, pectinases e xilanases (LO *et al.*, 2002; CHIANI *et al.*, 2010).

As celulasas possuem uma ampla faixa de aplicações e teve seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiramente na indústria de alimentação animal e, juntamente com as hemicelulasas e pectinases, na indústria de alimentos, em processos de fermentação, dentre outros. Subsequentemente, essas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e lavadeira (BHAT, 2000). Dentro do grupo das hemicelulasas, as xilanases microbianas (1,4-β-D-xilana xilanohidrolases) são os catalisadores preferidos pela indústria para a hidrólise da xilana devido à sua alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa

geração de resíduos (MICHELIN *et al.*, 2008). Já as pectinases permitem melhor clarificação e melhoram o rendimento da extração de sucos de frutas (KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005). Atualmente, além dessas aplicações, o foco voltou-se para produção de etanol através de enzimas produzidas a partir da conversão de biomassa, que passou a ser uma alternativa para as indústrias (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Essa variedade de enzimas e de ramos de aplicações para elas, somada às necessidades da utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente, demonstra o potencial para aplicação de enzimas microbianas na produção industrial (MUSSATO *et al.*, 2007). Juntamente à importância de novas e constantes pesquisas no campo de produção de enzimas, une-se a necessidade do uso de matérias primas renováveis, expandindo a aplicabilidade da palma forrageira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a viabilidade de agregação de valor à palma forrageira através da utilização de frações de sua biomassa para a produção de enzimas industriais.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um “screening” de linhagens de *Bacillus* da Coleção de Micro-organismos da UFPE (UFPEDA) capazes de utilizar a biomassa da palma forrageira como substrato.
- Investigar a produção extracelular de enzimas celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas em fermentações realizadas em mesa agitadora, utilizando a palma em pó como fonte de carbono, pela linhagem de *Bacillus* selecionada e por linhagens de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus awamori* e *Streptomyces rochei*, já reconhecidas como boas produtoras de enzimas.
- Investigar a produção extracelular de enzimas celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas em fermentações realizadas em biorreator de bancada, utilizando a fração pética da palma como fonte de carbono, pela linhagem de *Bacillus* selecionada e por linhagens de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus awamori* e *Streptomyces rochei*, já reconhecidas como boas produtoras de enzimas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biomassa Vegetal

A produção total de biomassa no planeta é de aproximadamente 100 bilhões de toneladas por ano de matéria orgânica seca e 50 milhões de toneladas de biomassa aquática, mas, desse total, apenas 1,25% é utilizada como matéria-prima industrial. A biomassa vegetal, em sua maioria, é formada de materiais lignocelulósicos, que constituem os resíduos das indústrias de papel e celulose, usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana), resíduos florestais (madeira, bambu, gramas) e resíduos agrícolas (palhas de cereais, de milho, de trigo). As principais vantagens apresentadas é que representam um dos recursos biológicos mais abundantes e baratos do planeta (NAIK *et al.*, 2010).

A biomassa, presente na parede celular secundária de plantas, é constituída, principalmente, de microfibrilas de celulose, cobertas por uma matriz formada de hemiceluloses e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma “rede” resistente à agressão de microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2004; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Normalmente, essa composição da biomassa pode variar de acordo com a espécie vegetal, porém a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, mas esse percentual pode ser diferente, podendo conter amido, pectina e outros carboidratos, a depender de fatores como a espécie do vegetal, as condições de crescimento, a parte da planta escolhida e a idade da colheita (LADEIRA, 2013).

Em vista de serem os vegetais responsáveis por essa produção anual, no mundo, de cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose, esse polissacarídeo pode ser considerado como o maior reservatório de carbono (FESTUCCI-BUSSELLI; OTONI; JOSHI, 2007). A constituição da celulose se dá a partir de resíduos de glicose que se juntam por ligações glicosídicas β -1,4, surgindo daí microfibrilas. Essas microfibrilas se aglutinam por pontes de hidrogênio e forças de *van der Waals* e, assim, tornam possível a formação das estruturas cristalinas da celulose (SOMERVILLE; BAUER *et al.*, 2004).

O segundo biopolímero mais abundante na biosfera é a hemicelulose, um complexo polimérico conformado por vários heteropolissacarídeos, cujo esqueleto possui unidades de xilose (xilanas), manose (mananas) ou glicose (glicomananas), além de cadeias laterais de arabinose, galactose, ácido acético e ácido glucurônico (POLIZELI *et al.*, 2005).

Um heteropolissacarídeo que apresenta esqueleto com várias unidades de xilopirranose as quais se tornam unidas por ligações glicosídicas β -1,4 é a xilana. Essas ligações podem

apresentar grupos paralelos de glicopiranosil, 4-O-metil-D-glicuronopiranosil, α -L-arabinofuranosil, acetil, feruol e *p*-cumaril. Esses diferentes grupos apresentam substituição também diferenciada em grau, originando tipos diversos de xilana, presentes na parede celular secundária, como a arabinoxilana, glucoronoxilana e glucoarabinoxilana. Essas variações de xilanas podem aparecer em ligação covalente ou não covalente com a celulose, a lignina além de outros polímeros importantes, contribuindo para que a parede celular vegetal se mantenha firme e estável (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

As substâncias pécticas, que tem como função contribuir para dar firmeza e estrutura aos tecidos, são polissacarídeos presentes na lamela média das células vegetais, e constituem um polímero de resíduos de ácidos D-galacturônicos, que se unem por ligações glicosídicas α 1 $\rightarrow$ 4. Elas também são denominadas de ácidos poligalacturônicos, grupo heterogêneo de polissacarídeos, contendo açúcares ácidos (como ácido galacturônico) e açúcares neutros (como arabinose, raminose e galactose). As pectinas são os polissacarídeos com maior grau de solubilidade, presentes na parede celular dos vegetais e se caracterizam por seu alto peso molecular, carga negativa e acidez, com estrutura primária relativamente simples (TAIZ; ZEIGER, 2004; PAIVA *et al.*, 2009).

De acordo com a modificação da cadeia central, as substâncias pécticas são classificadas da seguinte forma: protopectina, insolúvel em água e precursoras das substâncias pécticas, e quando submetida a hidrólise gera pectina ou ácidos pécticos; ácido péctico, o polímero solúvel de ácido galacturônico que possui quantidade insignificante de grupos metoxila; ácido pectínico, o ácido poligalacturônico que contém uma quantidade significativa de grupos metoxila esterificados (> 0 e < 75%); e pectina, que contem pelo menos 75 % dos grupos carboxilas do ácido galacturônico esterificados com metanol (KASHYAP *et al.*, 2001).

3.1.1 Palma forrageira

A palma forrageira é uma cactácea de origem mexicana, rústica, pertencente à divisão: *Embryophyta*; subdivisão: *Angiospermea*; classe: *Dicotyledoneae*; subclasse: *Archiclamideae*; ordem: *Opuntiales* e família: *Cactáceas* (SILVA; SANTOS, 2006).

A família das Cactáceas possui cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, das quais 300 são do gênero *Opuntia*. No Nordeste do Brasil, são cultivadas duas espécies, conhecidas como *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, vulgarmente chamada de palma gigante ou azeda e palma redonda, e como *Nopalea cochenilifera* (L.) Salm Dyck, conhecida popularmente como palma

miúda, doce ou língua de vaca (FARIAS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SILVA; SANTOS, 2006).

A composição química da palma forrageira pode variar de acordo com a espécie, a idade, a época do ano e os tratos culturais, mas essa forrageira pode ser considerada um alimento rico em carboidratos, principalmente pelos carboidratos não fibrosos (WANDERLEY *et al.*, 2002). Estudos propõem que os carboidratos de rápida degradação (os açúcares e os ácidos orgânicos) e os de mediana degradação (amido) constituem 42 e 19%, respectivamente, do total de carboidratos encontrados na palma forrageira (BATISTA *et al.*, 2003).

As cactáceas são caracterizadas como produtoras de polissacarídeos pécnicos, dos quais três deles já foram isolados de paredes primárias de plantas e tiveram sua estrutura analisadas. Os polissacarídeos encontrados foram: homogalacturonana, ramnogalacturonana-I (RG-I) e galacturonanas substituídas (RG-II) (ALBERSHEIM *et al.*, 2011). Na ramnogalacturonana-I, a sequência de homogalacturonana é mesclada com resíduos β -L-ramnopiranosil, com formação de cadeias laterais de açúcares neutros. O RG-II, por sua vez, apresenta maior complexidade estrutural entre os polissacarídeos já analisados.

A *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill é uma espécie que apresenta diversa utilização, sendo, provavelmente, dentre os gêneros dessa família, o que teve melhores resultados nos processos de distribuição, dispersão e multiplicação. O sucesso ecológico e evolutivo pode ser conferido devido à intensa associação dessa espécie com diversos animais durante o ato reprodutivo (REYES-AGUERO *et al.*, 2006).

Esse plantio está disposto em cerca de 550.000 ha de área cultivada no Brasil, incluindo Alagoas e Pernambuco, estados com a maior área de cultivo no Nordeste do país (ARAÚJO *et al.*, 2005). A sua finalidade forrageira, começou no início do século XX, sendo uma alternativa de cultivo, visto ser uma cultura com mecanismo fisiológico com alto poder de absorção, aproveitamento e controle da perda de água, tornando-a uma das plantas mais adaptadas às condições ecológicas das zonas áridas e semi-áridas do mundo, adaptando-se com relativa facilidade ao semi-árido do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Por manter seu valor nutritivo, mesmo durante o período de seca ou de estiagem, revelam-se como uma alternativa para pecuaristas de regiões áridas, devido ao fato de que suas porções comestíveis, ou seja, o cladódio e os frutos serem ricos em água (HERNANDEZ, 2004; PEIXOTO, 2006; NOBEL, 2007). Sua importância para a economia se explica pelo fato de conseguir, ainda que sob temperaturas altas, transformar a escassa umidade em matéria viva e é essa sua capacidade que a distingue de outros vegetais.

A palma, entre os vegetais da região, vem sendo muito utilizada como uma grande opção como alimento de alta importância nas regiões semiáridas, nas atividades da pecuária, buscando acabar com a desnutrição dos animais durante secas prolongadas, mesmo em solos rasos, arenosos ou pedregosos, de pouca matéria orgânica. (CHIACCIO *et al.*, 2006). Também é utilizada em aplicações medicinais, elaboração e composição de cosméticos e medicamentos, paisagismo, alimentação humana, cercas vivas, conservação e recuperação de solos (LEITE, 2006).

A exploração industrial a custo baixo é possível devido à ecofisiologia da palma, a qual não requer desflorestamentos, podendo ser cultivada em áreas degradadas e tidas como inúteis. Esse aspecto retira da cultura da palma qualquer possibilidade de competição com outras culturas como a de soja, milho e trigo, de alto interesse econômico. Essas experiências levantaram o interesse pela produção de biogás e etanol, a partir da palma, no semiárido nordestino (MENEZES *et al.*, 2011). A empresa *Elqui Global Energy*, desenvolveu uma usina de produção de energia a partir da palma. Kuloyo (2012) observou a possibilidade de obter-se etanol com a utilização da palma, a partir da hidrólise enzimática.

Apesar dessa perspectiva, esses autores reconhecem que, para se tornar real a produção de biocombustíveis com a utilização dessa biomassa, ainda é preciso aprofundar pesquisas que criem alternativas biotecnológicas para isso.

3.2 Enzimas de Interesse Industrial

Denominam-se enzimas as proteínas que conseguem catalisar reações nos sistemas biológicos, de forma que uma reação química se processa mais rapidamente em função da diminuição da energia livre de ativação, sem que os processos termodinâmicos da reação sofram qualquer tipo de interferência. As enzimas têm extrema especificidade e poder catalisador, sobrepondo-se à atuação de catalisadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX, 2011).

As enzimas resultantes dos processos fermentativos são aplicadas há séculos. Essa utilização prática de enzimas tanto se dá pela forma direta como pela forma indireta. A forma direta se realiza pelo uso de preparações enzimáticas brutas, sejam de origem animal sejam de origem vegetal. Quanto à forma indireta, a ação enzimática utilizada decorre do crescimento microbiano. As enzimas obtidas a partir da produção de origem microbiana são, hoje em dia, foco de interesse da indústria biotecnológica, daí resultando a maior quantidade de pesquisas que buscam controlar esse tipo de produção enzimática (BORTOLAZZO, 2011).

O interesse industrial na produção de enzimas se concentra nas celulasas e amilases, enzimas do grupo das carbo-hidrolases, as quais correspondem a 23% de todas as enzimas circulantes no meio industrial. Essa superioridade apresentada pelas celulasas se explica por serem elas aplicadas na indústria de ração animal, em processo de extração de óleos vegetais e de maceração de frutas, na produção de alimentos e na fabricação de cerveja e vinho. Sua maior aplicabilidade tem sido na produção de ração animal, perfazendo 21% de todas as enzimas usadas nesse setor e o mercado mundial tem dado provas de que o consumo das celulasas deve aumentar, ampliando seu campo de ação na produção de enzimas industriais e também de enzimas especiais (SANTOS *et al.*, 2011).

3.2.1 Enzimas celulolíticas

As celulasas constituem, geralmente, um conjunto de várias enzimas que têm participação na degradação da celulose. Na hidrólise, encontram-se três grandes grupos de celulasas: endoglucanases (EnG); exoglucanases ou celobiohidrolase (CBH) e β -glucosidase (Figura 3.1) (SUN; CHENG, 2002).

A endoglucanase (EnG) é a enzima constituinte do complexo celulolítico que tem como papel principal a iniciação da hidrólise. A parte interna da estrutura amorfa da fibra celulósica é o alvo dessa enzima, a qual hidrolisa randomicamente, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, por conseguinte, novos terminais, sendo um redutor (região da glicose que apresenta uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (região da hidroxila heterosídica da molécula presente na extremidade que participa da ligação com outra glicose adjacente) (LYND *et al.*, 2002).

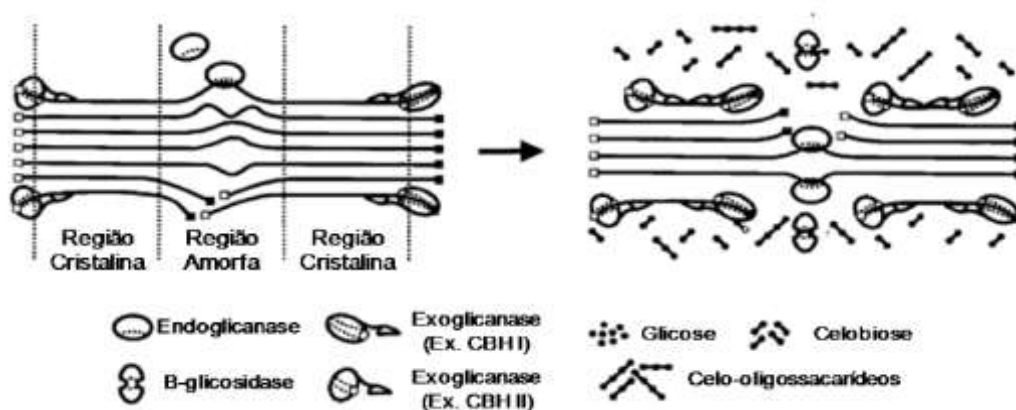
As endoglucanases são responsáveis pelo processo de hidrólise tanto da celulose amorfa como das celulosas solúveis, que são modificadas quimicamente, como, por exemplo, a carboximetilcelulose (CMC). Neste processo as enzimas atuam com maior facilidade sobre as áreas cuja organização estrutural possui cadeias sem forte envolvimento interativo com hidrogênio intermolecular, o que torna mais acessíveis as mais internas ligações glicosídicas das cadeias de celulose, diferentemente do que ocorre nas regiões cristalinas (CASTRO; JUNIOR, 2010).

As enzimas presentes no grupo das exoglucanases (ExG) são as celobio-hidrolase (CBH) e as glucano-hidrolase (GH). A GH possui pouco relato na literatura sobre sua ação, mas tem papel importante na eficiente degradação da celulose, pois tem a capacidade de liberar glicose diretamente do polissacarídeo (LYND *et al.*, 2002).

A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pelo fenômeno denominado amorfogênese, não compreendido por completo, mas sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, que provoca a desestratificação das fibras. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases. Esse grupo de enzimas pode dividir-se em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), as quais hidrolisam terminais redutores, e as enzimas do tipo II (CBH II), que, por sua vez, hidrolisam terminais não redutores. A celobiose, produto da hidrólise, geralmente acaba inibindo a ação da própria enzima (ZHANG; LYND, 2006).

A enzima β -glicosidase, ou β -glicosídeo glico-hidrolase, tem como função a hidrólise da celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. E assim como a CBH, também sofre inibição por seu produto de hidrólise (LYND; ZHANG, 2002).

Figura 3.1 - Ação das celulases na degradação da celulose



Fonte: Adaptado de LYND, 2002

Enzimas de alto valor para a economia, as celulases são bastante comercializadas e se destacam em várias indústrias, como na têxtil, na fabricação de papel, na produção de ração animal e na fermentação para produção de álcool (OGEL *et al.*, 2001). Essas enzimas são resultados da fermentação por fungos e bactérias de diversos tipos, sendo o fungo *Trichoderma reesei* o de maior utilização pela indústria, na fabricação de celulases, apesar de sua produtividade quanto à β -glicosidase não ser significativa, acarretando concentrações elevadas de oligômeros. Em razão disso, passa a ser necessária a utilização de extratos enzimáticos obtidos a partir de outros micro-organismos, como do gênero *Aspergillus* para uma degradação mais eficiente da celulose (SAAD, 2010).

3.2.2 Enzima xilanase

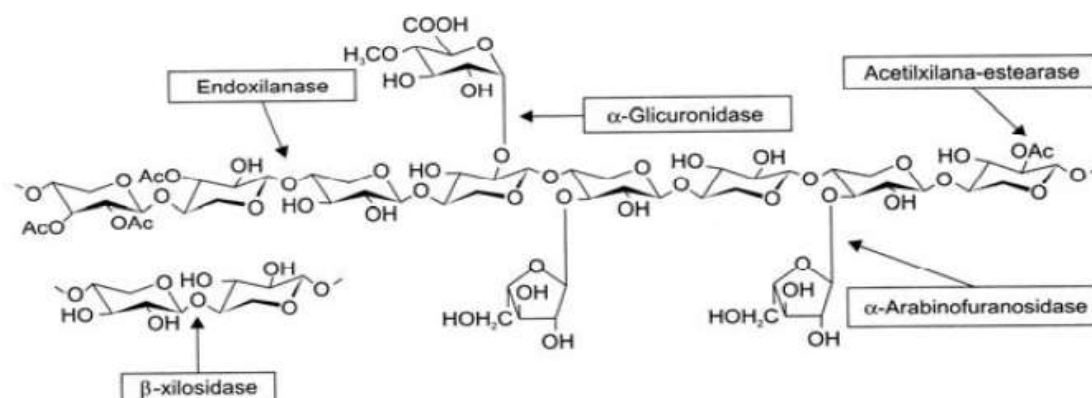
As xilanases têm como papel a hidrólise da xilana, o principal polissacarídeo constituinte das hemiceluloses (ARANTES; SADDLER, 2010). A função das xilanases no complexo enzimático tem importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal, já que este grupo de polissacarídeos ramificados tem o poder de se ligar fortemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, mantendo ligações cruzadas, as quais dificultam a ação das celulasas durante o processo de sacarificação (YANG Y.Z; YANG, S.Q.; YAN, Q.J., 2006).

Entre as enzimas xilanases, encontram-se β -1,4-endoxilanases (XLN), com ação sobre a principal cadeia de xilana, e β -xilosidases (BXL), com ação hidrolítica sobre os xilo-oligossacarídeos, transformando-os em xilose (Figura 3.2). Ainda são compreendidas entre as xilanases a α -L-arabinofuranosidase (ABF), α -glucuronidase, a acetilxilanesterase (AXE), o ácido ferúlico esterase e o ácido *p*-cumárico esterase encontrados como enzimas acessórias, cuja atuação hidrolítica é exercida sobre cadeias laterais diversas da xilana (SAHA, 2003).

Principais produtoras de oligômeros de β -D-xilopiranosil na hidrólise, as β -1,4-endoxilanases (XLN) também geram mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil. No entanto a ação da endoxilanases pode sofrer inibição pelo acúmulo de oligômeros de β -D-xilopiranosil. Para possibilitar a continuidade do processo de degradação, torna-se necessário a ação catalítica das β -D-xilosidases (BXL), pois estas, por meio da clivagem de xilobiose e das extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos curtos, produzem unidades de β -D-xilopiranosil, tornando, assim, possível remover a causa dessa inibição e gerando, consequentemente, maior eficiência na hidrólise da xilana. (KNOB; TERRESAN; CARMONA, 2010).

As cadeias laterais da xilana são de L-arabinose, ácido acetil-glucurônico, 4-O-metilglucurônico, *p*-cumárico e ferúlico, capazes de interromper, sem substituições, a estrutura helicoidal da xilana. Quanto maior for a esterificação e a substituição, menor será a digestibilidade da hemicelulose. A remoção dos grupos O-acetil das posições 2 e/ou 3 dos resíduos de β -D-xilopiranosil da acetil xilana é concretizada pela acetil xilana esterase (AXE). Já as arabinofuranosidases (ABFs) conseguem remover os resíduos de L-arabinose, enquanto as glucuronidases hidrolisam ligações α -1,2 entre os resíduos de ácido glucurônico e β -D-xilopiranosil, que se encontram na glucuronoxilana. Ferúlico e cumárico esterases são responsáveis pela clivagem de ligações éster, envolvendo a arabinose ácido ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente (POLIZEL et al., 2005).

Figura 3.2 - Enzimas xilanolíticas atuando na degradação da xilana



Fonte: CARVALHO, 2013

No caso de substratos mais complexos, há uma maior quantidade de arabinoxilanas, dificilmente degradáveis pela ação das endoxilanases (XLN), como, por exemplo, nos resíduos de natureza agrícola e industrial. Nesses casos, faz-se necessário associar α -arabinofuranosidas (ABFs), a fim de intensificar a sacarificação da arabinoxilana pré-tratada. Esse mesmo sinergismo entre xilanases é percebido quando da adição de acetilxilana esterases (AXE), resultando na liberação tanto de ácido acético quanto de xilana acetilada em menor grau, o que torna mais acessível o ataque das XLN (POLIZELI *et al.*, 2005).

Consideradas multienzimas por apresentarem diferentes formas, as xilanases se apresentam em diferentes espécies fúngicas. Esse fenômeno de multiplicidade pode ser provocado pelo fato de múltiplas xilanases serem produzidas por diferentes alelos de um mesmo gene ou outros fenômenos, como processamento diferencial do mRNA, modificações pós-secrecionais, como digestão proteolítica, e modificações pós-traducionais, como glicosilação e auto-agregação. (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; POLIZELI *et al.*, 2005).

3.2.3 Enzimas pectinolíticas

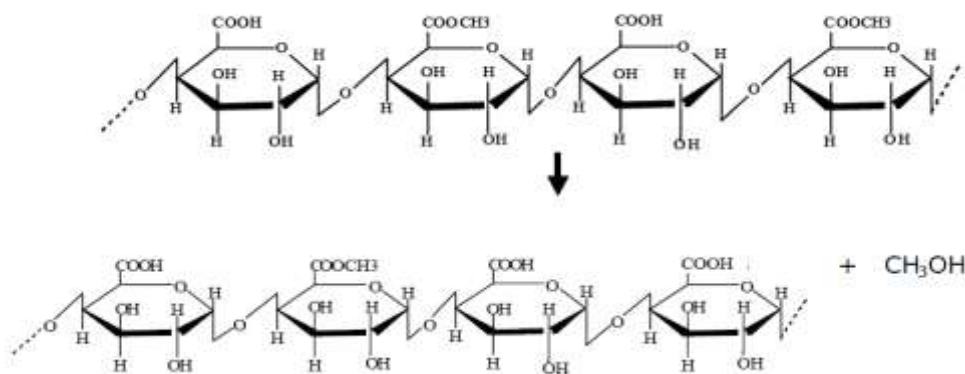
As enzimas pectinolíticas ou pectinases constituem um tipo de enzima degradadoras de substâncias pécicas, por meio da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 ao longo da cadeia carbônica (UENOJO, 2007). Sua utilização comercial se deu por volta de 1930, quando foram utilizadas na preparação de vinhos e sucos de frutas. A utilização mais eficiente dessas enzimas só foi desenvolvida após a década de 1960, devido aos avanços no

conhecimento sobre a natureza química de tecidos vegetais (BHAT, 2000; KASHYAP *et al.*, 2000).

Existem essencialmente três tipos de pectinases, classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), seguindo as recomendações da IUPAC-IUB (GUMMADI, 2003; JAYANI, 2005) são elas: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante), tem função de remoção dos grupos metil éster, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado); as despolimerizantes, que são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; e, as protopectinases que atua na solubilização da protopectina formando pectina (SAKAI *et al.*, 1993; GUMMADI; PANDA, 2003; SHEN *et al.*, 1999).

A enzima pectina esterase é responsável pela hidrólise dos grupos metil éster, provocando a liberação de metanol, o que converte a pectina em pectato (UENOJO, 2007). Sua ação é mais eficiente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (Figura 3.3) (KASHYAP *et al.*, 2001). Sua utilização se dá em quase todas as preparações enzimáticas comerciais, com o objetivo de proporcionar maior proteção e melhor textura de frutas e vegetais processados. Além dessa aplicabilidade, essa enzima é bastante utilizada na extração e clarificação de sucos de frutas.

Figura 3.3 - Ação da pectina esterase na degradação da pectina, hidrolisando os grupos metil ésteres liberando metanol



Fonte: SANTI, 2005

Apesar da pectina esterase ter um efeito mínimo sobre a viscosidades das soluções, elas colaboram com a ação de outras pectinases, pelo fato de transformar pectina de alta metoxilação em pectina de baixa metoxilação, o que vai permitir a ação de hidrólise pela poligalacturonase. Essas enzimas produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores tem essa função importante de dar andamento a degradação completa da pectina estando presentes em praticamente todos os preparados comerciais e podem ser responsáveis

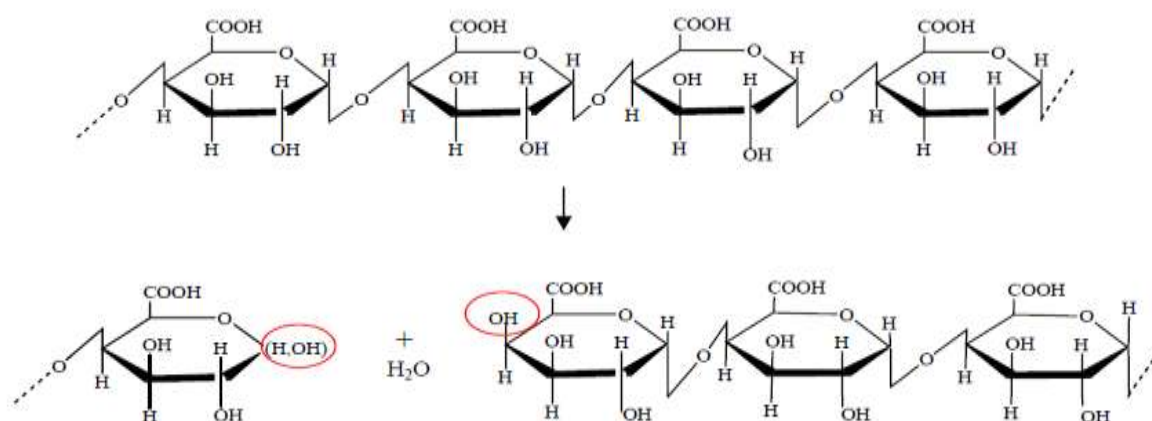
pelas mudanças das substâncias pécicas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (SOUZA, 2008).

De acordo com Kashyap *et al.* (2001), pectinases despolimerizantes são classificadas segundo o modo pelo qual a ligação é rompida (hidrolases ou liases); a posição de ataque no substrato (endopectinase ou exopectinase) e o tipo de substrato hidrolisado (ácido pécico ou pectina).

As enzimas incluídas no grupo das pectinases despolimerizantes, entre as hidrolases, há as polimetilgalacturonases (PMG) e as poligalacturonases (PG). A polimetilgalacturonase (PMG) é responsável pela ação hidrolítica de polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos, por meio de clivagem de ligações α -1,4, podendo sua atuação se dar de forma endo- (hidrólise randômica) ou exo-PMG (hidrólise sequencial) (KASHYAP, 2001).

Por sua vez, as poligalacturonases (PG), consideradas as maiores enzimas com função hidrolítica, hidrolisam α -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico (Figura 3.4). Tanto apresentam mecanismo de ação endo-PG quanto mecanismo exo-PG no ácido pécico. Entre as exo-poligalacturonases (exo-PG), o produto final pode ser de dois tipos diferentes: monômeros de ácido galacturônico (exo-PG1) e dímeros (exo-PG2) (MARTINS, 2006).

Figura 3.4 Ação das exo-poligalacturonases sobre o ácido poligalacturônico, liberando monômeros de ácido galacturônico pela hidrólise da pectina não esterificada

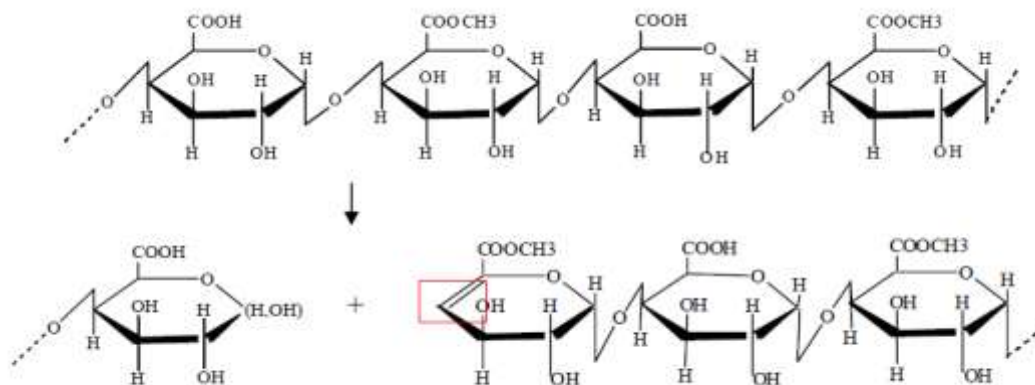


Fonte: SANTI, 2005

As enzimas classificadas como liases ou transeliminases são responsáveis por romper ligações glicosídicas, dando origem a galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado. Entre elas se incluem as pectinas liases (polimetilgalacturonato liase, PMGL) e as pectatos liases (poligalacturonato liase, PGL) (UENOJO, 2007). A enzima pectina liase catalisa por β - eliminação entre dois

resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados, como também quebra as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5, podendo ser de modo endo- ou exo (Figura 3.5) (MARTINS, 2006). Já a pectato liase catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécico de modo endo- ou exo- por transeliminação, requerendo Ca^{2+} para atividade (KASHYAP, 2001).

Figura 3.5 Ação da exo-pectina liase gerando uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 (em vermelho)



Fonte: SANTI, 2005

3.3 Micro-organismos Produtores de Enzimas

Os fungos filamentosos têm um papel muito importante para indústria biotecnológica, pois são grandes produtores de enzimas, que degradam uma vasta variedade de biomassa vegetal. Os fungos *Aspergillus* e *Trichoderma* são os gêneros mais utilizados para a produção de enzimas devido à ampla gama de enzimas hidrolíticas de polissacarídeos que secretam (STRICKER; MACH *et al.*, 2008).

O interesse por preparados fúngicos de enzimas extracelulares se deu após a década de 1960, com a descoberta de serem eles responsáveis pela ação hidrolítica de roupas e equipamentos de militares durante a Segunda Guerra. Buscou-se aproveitar esses micro-organismos para converter resíduos celulósicos em produtos alimentícios e energéticos. Essa iniciativa partiu de estudiosos do Laboratório de Pesquisas em Natick, Massachussets, que anunciou, em 1979, haverem sido isoladas cepas mutantes de *Trichoderma reesei*, cujo poder hidrolítico superava em muito o da cepa nativa (BORTOLLAZO, 2011). As enzimas que compõem a maquinaria do complexo celulolítico dessa espécie são: duas celobiohidrolases, cinco endoglicanases e duas β -glicosidases. Além da produção de diversas hemicelulases, as xilanases, mananases e galactosidases são também secretadas por esse fungo (NIDETZKY *et al.*, 1994).

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* tem suas enzimas aplicadas nas indústrias farmacêutica, têxtil, de papel e de biocombustíveis (BHAT, 2000; POLIZELI; RIZZATTI *et al.*, 2005; BEG, 2001). A espécie fúngica *Aspergillus awamori* tem seu foco industrial visando mais à produção de amilases, amiloglucosidases e proteases, sendo considerado seguro, por não ser tóxico nem patogênico (CUI *et al.*, 1998a).

As xilanases microbianas (1,4- β -D-xilana xilanohidrolases) se destacam entre as hemicelulases, sendo mais bem aceitos catalisadores pela indústria para a hidrólise da xilana, por causa de sua baixa perda de substrato, baixa geração de resíduos e alta especificidade (MICHELIN *et al.*, 2008). Duas espécies do gênero *Aspergillus*, *A. oryzae* e *A. terreus*, em estudos realizados por Milanezi (2011), demonstraram maior expressividade na atividade xilanolítica que outras espécies de gêneros, como *Penicillium citrinum*, *Fusarium verticillioides*, *Paecilomyces lilacinum* (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Diversas bactérias vêm se destacando produzindo enzimas tais como celulases, amilases, pectinases, xilanases, como as do gênero *Bacillus* e a actinobactéria do gênero *Streptomyces* (LO *et al.*, 2002; CHIARI *et al.*, 2010). As actinobactérias tem um potencial produtor de enzimas com capacidade de hidrolisar proteína, amido, celulose, pectina em diferentes habitats (MINOTTO *et al.*, 2014). Rawashdeh *et al.* (2005) avaliaram a capacidade de produtividade enzimática de diversos isolados de *Streptomyces*, sp., notando-se a produção de celulase, pectinase e quantidades relevantes de xilanase.

Estudos recentes utilizando o gênero *Streptomyces* vem mostrando uma alta capacidade de produção de enzimas pécticas. Carvalho (2014) analisou a produção de pectinases pela espécie *Streptomyces rochei*, a qual obteve resultados na produção de pectina liase, pectina esterase e poligalacturonase, sendo uma espécie pouquíssima estudada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Cladódios de palma forrageira da espécie *Opuntia ficus-indica*, vulgarmente conhecida como palma gigante, foram fornecidos pelo Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA. Os cladódios da palma foram disponibilizados tanto *in natura* como em forma de matéria seca, e foram processados como descrito nos itens 4.1.1 e 4.1.2, a seguir.

4.1.1 Pó da palma forrageira

A biomassa seca foi submetida à moagem em moinho de facas (Fritsch, Pulverisette 14) (Figura 4.1) e peneirada em peneira de 80 mesh. A parte não retida na peneira foi guardada em temperatura ambiente até o uso.

Figura 4.1 -Moinho de facas (Fritsch, Pulverisette 14)



4.1.2 Fração pécica da palma forrageira

O material *in natura* foi lavado, cortado em pedaços pequenos e, então, transferido para liquidificador contendo água destilada (80 °C) em uma proporção de 1:1 (m/m). O material triturado foi vertido em tanque agitado, onde ficou mantido em temperatura de 60°C, sob agitação de 500 rpm, por 60 minutos, afim de extrair a pectina da biomassa. O material resultante foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen, Rotina 420R) (Figura 4.2), a 4°C, por 15 minutos, em uma rotação de 8000 rpm. O sobrenadante

(fração pécica) foi novamente centrifugado, para separação das partes sólidas remanescentes, e acondicionado sob refrigeração até o uso.

Figura 4.2- Centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen, Rotina 420R)



4.2 Micro-organismos

Para a realização do “screening” de linhagens de bactérias do gênero *Bacillus*, foram utilizadas 10 linhagens provenientes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA).

Para a avaliação da produção de enzimas, foram utilizados os micro-organismos: *Bacillus* sp., selecionado no “screening”; *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414, cedido pela Coleção UFPEDA; e *Trichoderma reesei* RUT C-30 e *Aspergillus awamori*, cedidos pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.3 Meios de Cultivo

4.3.1 Meios de manutenção dos micro-organismos

As linhagens de *Bacillus* foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo meio ágar nutriente (AN) (Tabela 4.1), durante 2 dias, e a actinobactéria, *Streptomyces rochei*, em placas de Petri contendo meio ISP-4 (Tabela 4.2), por 7 dias, ambos incubados a 30°C em estufa. Após o crescimento, as culturas foram mantidas sob refrigeração.

Tabela 4.1 - Composição do meio AN

Componentes*	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	3
NaCl	5
Ágar	15

* pH ajustado para 6,8.

Tabela 4.2- Composição do meio ISP-4

Componentes*	Concentração (g/L)
Amido solúvel	20
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	2
NaCl	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
CaCO ₃	4
Agar	16

*Solução traços sais (2mL/L): FeSO₄.7H₂O 0,1 (g/mL); MnCl₂.4H₂O 0,1 (g/L); ZnSO₄.7.H₂O 0,1 (g/L).

Para o crescimento e obtenção de esporos dos fungos filamentosos *Trichoderma* e *Aspergillus*, foram feitos cultivos em placas de Petricontendo meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) (Tabela 4.3) por cinco dias em estufa a 30°C, os quais, após crescimento, foram mantidos sob refrigeração.

Tabela 4.3- Composição do meio BDA

Componentes*	Concentração (g/L)
Batata	200
Glicose	20
Ágar	15

* pH ajustado para 6,8.

4.3.2 Meios de produção de enzimas

As fermentações para produção de enzimas foram realizadas com a biomassa em pó, como fonte de carbono, e sais minerais (Tabela 4.4) e com a fração péctica líquida, como fonte de carbono, adicionada de sais nas mesmas concentrações da Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Composição do meio de fermentação

Componentes	Concentração (g/L)
Fonte de carbono	10*
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄ .	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,005
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,005
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,005

* Quando a fração péctica (líquida) foi utilizada, os sais foram diluídos diretamente nela.

4.4 Procedimento Experimental

4.4.1 “Screnning” das linhagens

As 10 linhagens de *Bacillus*, reativadas a partir das culturas em estoque da Coleção UFPEDA, foram inoculadas em placas de Petri com meio contendo o pó da palma forrageira e sais minerais (Tabela 4.4), em duplicatas, e cultivadas em estufa a 30 °C, durante 24 horas, para verificação do crescimento das colônias e determinação das médias dos seus diâmetros.

4.4.2 Produção de enzimas por fermentação submersa

Para a produção de enzimas, foram realizadas fermentações tanto em frascos Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo a biomassa em pó da palma gigante, incubados em mesa agitadora (New Brunswick Scientific, C25KC) (Figura 4.3), como em

biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) (Figura 4.4), com volume nominal de 1 L, contendo a fração péctica da palma forrageira.

Figura 4.3- Mesa agitadora (New Brunswick Scientific, C25KC)



Figura 4.4- Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110)



4.4.2.1 Preparação de inóculos

Para realização dos inóculos dos fungos filamentosos, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori*, foram feitos tapetes, com o auxílio de alça de Drigalsky em placas de Petri contendo meio BDA. Após 5 dias de crescimento em estufa a 30°C, foram colocados 2,5 mL de água destilada estéril nas placas para a suspensão de esporos. A suspensão de esporos foi, então, transferida para frascos Erlenmeyers contendo o meio descrito na Tabela 4.3, sem a adição do ágar, obedecendo a razão de 10% (v/v), os quais ficaram incubados em mesa agitadora rotativa (New Brunswick Scientific, modelo C25KC), a 30°C e agitação de 250 rpm, por período de 24 horas.

Para a preparação dos inóculos da actinobactéria, foi feito tapete, com o auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio ISP-4. Após crescimento por 7 dias em estufa a 30°C, foram removidos 2 blocos, com furador de 6 mm de diâmetro, e transferidos para frascos Erlenmeyers com o meio específico de crescimento descrito na Tabela 4.2, sem adição de ágar, e então, incubados em mesa agitadora a 30°C por 48 horas, sob agitação de 250 rpm.

O inóculo da bactéria do gênero *Bacillus* foi realizado transferindo-se duas alçadas do tubo de ensaio, onde se mantinha preservado, para frasco Erlenmeyer contendo o meio descrito na Tabela 4.1, sem adição de ágar, posteriormente foram incubados em mesa agitadora a 30°C e agitação 250 rpm por 12 horas.

Os inóculos foram transferidos para os meios de fermentação obedecendo a razão de 10% (v/v).

4.4.2.2 Fermentação submersa

Para as fermentações em frascos agitados, foi utilizado o pó da palma e sais minerais, nas concentrações de acordo com a Tabela 4.4, como fonte de carbono, e a mesa agitadora foi mantida sob agitação de 250 rpm, em temperaturas específicas para cada micro-organismo: 30°C, para os fungos filamentosos e para *Bacillus* sp., e 37°C para *S. rochei*.

Para as fermentações em biorreator, a fonte de carbono foi a fração pécica da palma. As condições de aeração e agitação do reator foram 1 vvm e 500 rpm, respectivamente; a temperatura e o pH foram controlados, respectivamente, em: 30°C e 5,0, para os fungos filamentosos; 30°C e 7,0, para *Bacillus* sp.; e 37°C e 6,0, para *S. rochei*. O controle do pH foi realizado por meio da adição automática de solução de ácido sulfúrico 3 M e hidróxido de sódio 3 M, e, para o controle da espuma, utilizou-se o antiespumante polipropilenoglicol P 2000 (Fluka).

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Determinação das Atividades Enzimáticas

A determinação das atividades enzimáticas foi realizada com o extrato enzimático obtido pela centrifugação das amostras a 4°C, 8000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen, Rotina 420R) e filtragem a vácuo em membrana de 0,22 µm.

4.5.1.1 Atividades celulolíticas

Os ensaios enzimáticos foram determinados de acordo com metodologia padrão descritos pela IUPAC (GHOSE, 1987). A atividade foi expressa em Unidade Internacional (U), quantidade de enzima capaz de forma 1 μ mol de glicose por minuto.

Atividade FPase

Em tubos de ensaio pequenos, foram colocadas em espiral fitas de papel de filtro Whatman nº1, medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg), como substrato, e 1 mL do tampão citrato de sódio 50 mM com pH 4,8 (Tabela 4.5). Essa mistura foi posta em banho termostatizado a 50°C por 60 minutos juntamente com 0,5 mL do sobrenadante (extrato enzimático). Para zerar o espectrofotômetro foi feito um branco, que continha todas as soluções menos o sobrenadante. Para a quantificação de açúcares redutores antes da reação do extrato enzimático com o substrato foram feitos tubos controle, que continham 0,5 mL do tampão citrato de sódio 50mM juntamente com o extrato enzimático. A determinação de açúcares redutores totais foi realizada transferindo 0,5 mL das soluções para tubos contendo 0,5 mL do reagente DNS (Tabela 4.6), os tubos foram fervidos por 5 minutos e resfriados em banho de gelo para parar a reação, e então foram completados os volumes para 7,5 mL com água destilada para a realização a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett Packard 8453) a 540 nm.

Atividade CMCase

Foram colocados em tubos de ensaio 0,25 mL da solução de carboximetilcelulose (CMC) 4% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, como substrato, e 0,25 mL tampão citrato de sódio 50 mM com pH 4,8. No meio reacional foi adicionado 0,25 do sobrenadante e submetido ao banho termostatizado a 50°C, durante 10 minutos. Também foram utilizados os controles, contendo 0,25 mL do tampão e 0,25 mL da amostra, e o branco só contendo 0,25 mL da solução de CMC. Nos tubos foram colocados 0,5 mL do reagente DNS para a determinação dos açúcares redutores, fervidos por 5 minutos, resfriados em banho de gelo, e após completar os volumes para 7,5 mL com água destilada, seguiu-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

4.5.1.2 Atividade xilanolítica

Para a realização da atividade da xilanase, foi utilizado, como substrato, 1mL da solução de xilana a 1% em tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) (Tabela 4.7), nos tubos foram adicionados também 0,5 mL do sobrenadante, sendo a mistura incubada a 50°C por 5 minutos. Nos controles foram adicionados 0,5 mL do tampão e 0,5 mL do extrato enzimático, e no branco continha apenas 0,5 mL da solução de xilana 1%. Para a determinação dos açúcares redutores, também foram transferidos 0,5 mL das soluções para tubos contendo 0,5 mL de DNS, os quais foram submetidos à fervura por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada a 540 nm após completarem-se os volumes com água destilada para 7,5 mL. A atividade foi expressa em Unidade Internacional (U), quantidade de enzima capaz de forma 1 μ mol de xilose por minuto.

4.5.1.3 Atividade pectinolítica

A atividade pectinolítica foi realizada com 1mL de pectina cítrica 1% em tampão acetato de sódio (pH 4,8) em tubos de ensaio juntamente com 0,25 mL do sobrenadante. Em tubos de ensaio controles foram colocados 1mL do tampão acetato mais o sobrenadante, e no tubo onde continha o branco, a pectina cítrica. Os tubos foram mantidos em banho termostatizado a 45°C por 30 min. Para parar a reação foram adicionados 1,25 mL de reagente DNS, e levados a fervura durante 5 min, logo após foram submetidos ao banho de gelo. Nas soluções foram adicionados 5 mL de água destilada e então a leitura foi medida a 540 nm (BALADHANDAYUTHAM e THANGAVELU, 2011).

4.5.2 Determinação da Concentração dos Substratos

A determinação das concentrações de açúcares e ácido galacturônico, foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, Série 1100), detectada por índice de refração. Para o processo de separação foi utilizado uma coluna HPX87H (BIO-RAD), com 60°C de temperatura; H₂SO₄ a 50 mM foi usado, como fase móvel, com um fluxo de 0,6 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana microporosa de 0,22 μ m antes da realização da corrida. Para a quantificação utilizou-se o método do padrão externo, através de curvas padrão dos compostos.

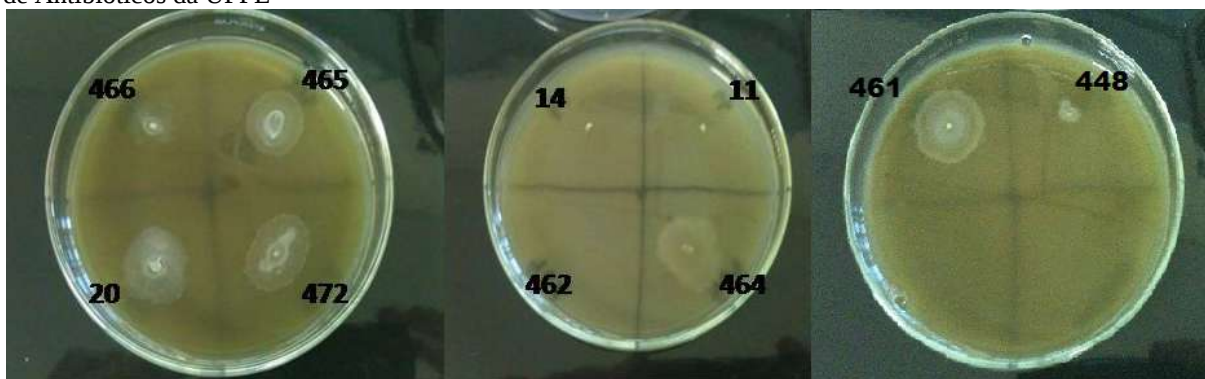
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Screening das linhagens

A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* para produção de enzimas tem sido extensivamente estudada, por serem produtoras, entre outras, de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, degradantes de estruturas da biomassa vegetal. Muitos trabalhos já foram realizados com esse gênero de bactérias para produção de CMCase, como *Bacillus subtilis* (KIM *et al.*, 2009) e *Bacillus* sp. 313 SI (GOYAL, 2014). Também, em trabalho realizado por Andrade (2011), foram obtidas altas atividades de poligalacturonases com linhagens do gênero *Bacillus* sp.

Para a seleção da bactéria do gênero *Bacillus* – a ser utilizada na investigação sobre a produção de enzimas – foi realizado um “screening” com 10 linhagens da Coleção UFPEDA, observando-se a ocorrência de crescimento em meio à base da palma gigante, como ilustrado na Figura 5.1.

Figura 5.1 - Crescimento de *Bacillus* em meio de cultura a base de palma gigante, incubados em estufa a 30°C por 24 horas. Numerações de acordo com o armazenamento da Coleção de Micro-organismo do Departamento de Antibióticos da UFPE



As linhagens UFPEDA 20, UFPEDA 461, UFPEDA 464, UFPEDA 465 e UFPEDA 472 foram as que apresentaram colônias com maiores diâmetros de crescimento, o que indica que são produtoras de enzimas capazes de degradar polissacarídeos da biomassa da palma. Para as linhagens UFPEDA 11, UFPEDA 14 e UFPEDA 462 não foram observados nenhum crescimento.

Entre as linhagens capazes de utilizar a palma como substrato, a única linhagem identificada em nível de espécie é a UFPEDA 20, identificada como *Bacillus methylotrophicus*. Bactérias metilotróficas têm como característica crescer utilizando compostos C1, tais como metanol e metilamina, como também sobre uma variedade de

compostos C2, C3 e C4 (LIDSTROM, 2006). Nessa espécie, são positivas as atividades de catalase, oxidase, pectinase e protease, mas as atividades de celulase e as atividades arginina dihi-drolase, urease e β -galactosidase não se fazem presentes (MADHAIYAN *et al*, 2010).

As médias dos diâmetros das colônias de *Bacillus* spp. estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 -Diâmetro médio das colôniasde *Bacillus* spp. cultivado sem meio de cultura a base de palma forrageira

Linhagem	Identificação	Diâmetro médio (cm)
<i>Bacillus cereus</i>	UFPEDA 11	0
<i>Bacillus mycoides</i>	UFPEDA 14	0
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	UFPEDA 20	3,0 $\pm$ 0,9
<i>Bacillus pumilus</i>	UFPEDA 448	0,9 $\pm$ 0,3
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA 461	2,4 $\pm$ 0,9
<i>Bacillus megaterium</i>	UFPEDA 462	0
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA 464	2,25 $\pm$ 0,1
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA 465	2,0 $\pm$ 0,35
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA 466	1,95 $\pm$ 0,1
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA 472	3,2 $\pm$ 1,3

Bacillus sp. UFPEDA 472, a linhagem com maior diâmetro de colônia, foi selecionada para estudos sobre a produção de enzimas, juntamente com os fungos e actinobactéria.

5.2 Produção de Enzimas

A palma forrageira, por apresentar em sua estrutura vários polissacarídeos – celulose, hemicelulose e pectina – foi utilizada como fonte de carbono para a produção de enzimas em fermentação submersa, visando à indução da produção de atividades celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas.

Além de *Bacillus* sp. UFPEDA 472, selecionado na primeira etapa do trabalho, também foi investigada a produção de enzimas por *Trichoderma reesei* RUT C-30, *Aspergillus awamori* e *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414, que são micro-organismos já reconhecidos como produtores de enzimas hidrolíticas.

A produção de atividades FPase, CMCase, xilanase e pectinase em frascos agitados, utilizando-se pó de palma, e em biorreator de bancada, utilizando-se a fração pécica da palma, estão descritas nos itens 5.2.1 e 5.2.2, respectivamente.

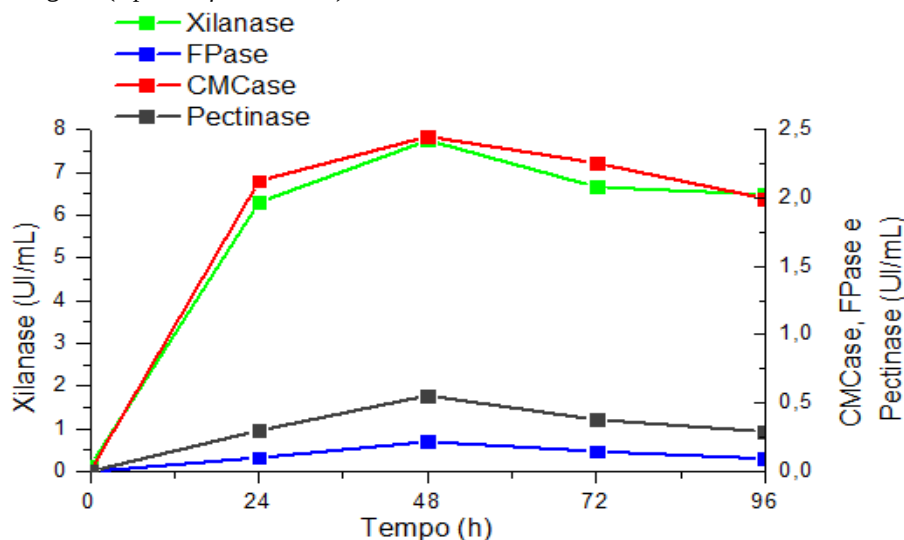
5.2.1 Fermentação em frascos agitados

5.2.1.1 Produção de enzimas por *Trichoderma reesei*

A utilização do pó da palma como fonte de carbono foi capaz de induzir a produção de todas as atividades por *Trichoderma reesei* RUT C-30, como está apresentado na Figura 5.2.

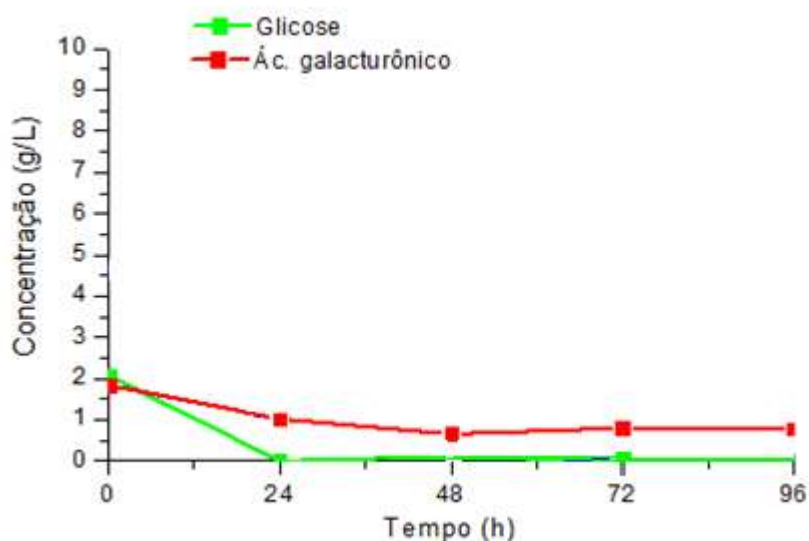
O fungo filamentoso *T. reesei* RUT C-30, dentre os outros micro-organismos estudados, apresentou a maior atividade xilanolítica, alcançando valor máximo de 7,75 UI/mL. As atividades CMCase, FPase e pectinase foram 2,45 UI/mL, 0,21 UI/mL e 0,55 UI/mL, respectivamente.

Figura 5.2 - Perfil de produção de enzimas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)



A variação do consumo de substrato utilizado pelo *T. reesei* está apresentado na Figura 5.3. Como se pode observar, o fungo utilizou a glicose como fonte de carbono. O pequeno consumo do ácido galacturônico presente no meio no período de 48 horas, condiz com a pequena atividade pectinolítica no mesmo tempo de cultivo.

Figura 5.3- Variação do consumo de substrato durante o cultivo de *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)



SILVA (2012) realizou fermentações utilizando a mesma biomassa da palma, nas mesmas concentrações, e encontrou valores parecidos, corroborando com os encontrados no presente trabalho. Atividade xilanolítica de 6,21 UI/mL e CMCase de 3,3 UI/mL em 46 horas, e FPase de 0,29 UI/mL em 50 horas de cultivo.

A atividade xilanolítica encontrada confirma que a presença de celulose é capaz de induzir a produção de xilanase, e que essa indução é atribuída ao fato de que o regulador da transcrição que codifica as enzimas celulasas, ACEII que é um regulador positivo, também afeta a regulação da produção de xilanase (ARO *et al.*, 2001; RITTER *et al.*, 2013).

5.2.1.2 Produção de enzimas por *Aspergillus awamori*

O perfil de produção de enzimas e a variação do consumo de substrato por *Aspergillus awamori* apresentam-se nas Figuras 5.4 e 5.5, respectivamente.

As atividades máximas obtidas das atividades foram: xilanase 5,85 UI/mL, CMCase 0,96 UI/mL, FPase 0,1 UI/mL e pectinase 1,54 UI/mL.

Figura 5.4 - Perfil de produção de enzimas por *Aspergillus awamori* em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)

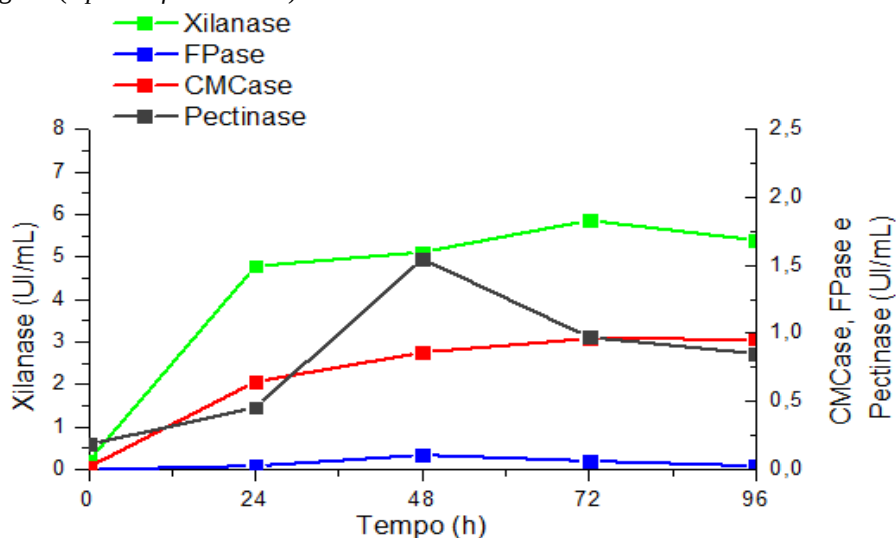
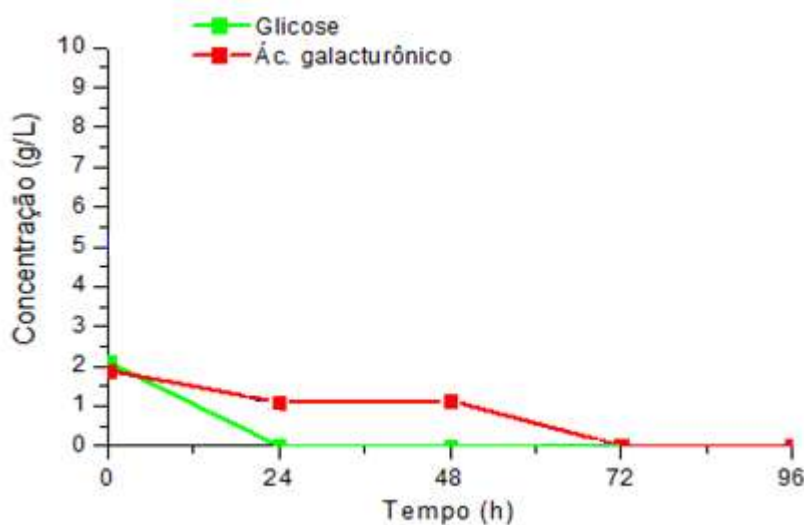


Figura 5.5- Variação do consumo do substrato durante o cultivo de *Aspergillus awamori* em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)



5.2.1.3 Produção de enzimas por *Bacillus* sp.

O perfil de produção de enzimas da bactéria da espécie *Bacillus* sp. UFPEDA 472, durante o cultivo, está apresentado na Figura 5.6.

As atividades xilanase e CMCase foram as que apresentaram maior valor, com 3,9 e 0,46 UI/mL, respectivamente. Os valores das atividades FPase (0,04 UI/mL) e pectinase (0,31 UI/mL) foram menores que nas outras fermentações. A variação do consumo dos substratos observados na Figura 5.7, mostra a assimilação da glicose, como principal fonte de carbono

para produção de energia, mas não do ácido galacturônico, sendo este micro-organismo pouco indutor de enzimas pectinolíticas.

Figura 5.6- Perfil de produção de enzimas por *Bacillus* sp. em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

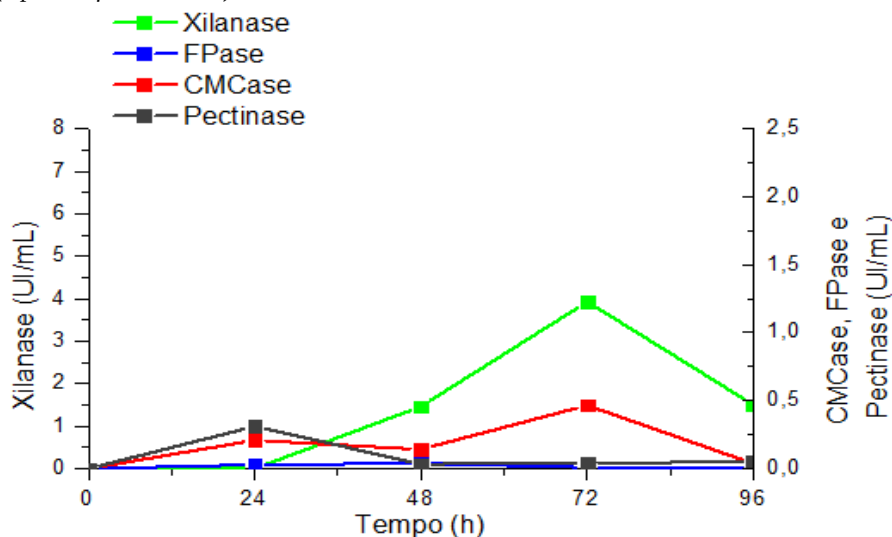
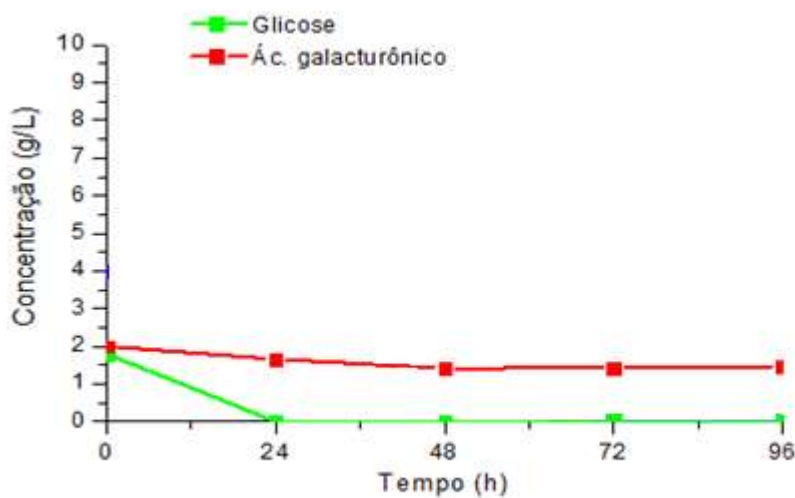


Figura 5.7 - Variação do consumo do substrato durante o cultivo de *Bacillus* sp. em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)



5.2.1.4 Produção de enzimas por *Streptomyces rochei*.

No cultivo com a actinobactéria da espécie *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414 a atividade pectinolítica apresentou valor bem maior que nos outros cultivos, com 2,09 UI/mL, demonstrando uma melhor capacidade de indução dessa enzima (Figura 5.8). A atividade

xilanase foi de 1,53, as celulolíticas, CMCase e FPase, foram de 0,27 e 0,016 UI/mL, respectivamente.

A variação do consumo de substrato esta apresentado na Figura 5.9, demonstrando o consumo da glicose como era de se esperar, primeiramente a ser consumido e por ultimo o ácido galacturônico.

Figura 5.8- Perfil de produção de enzimas por *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

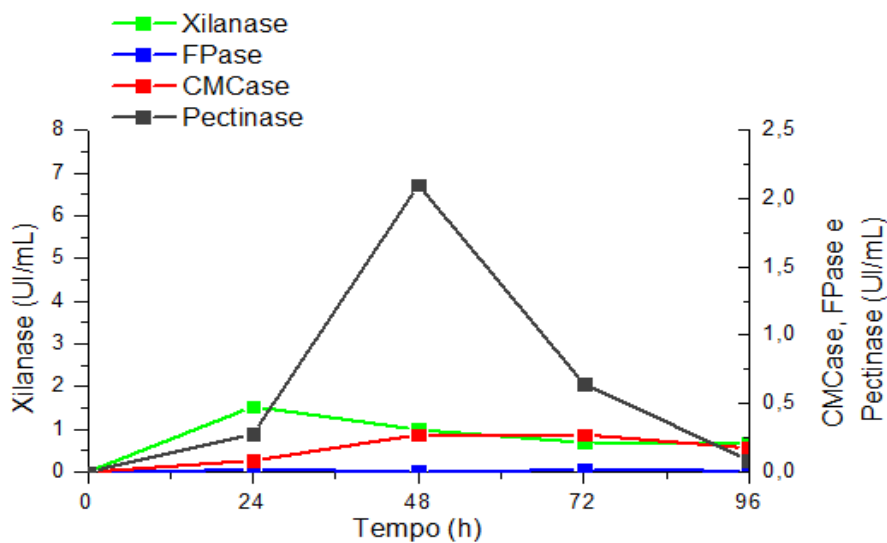
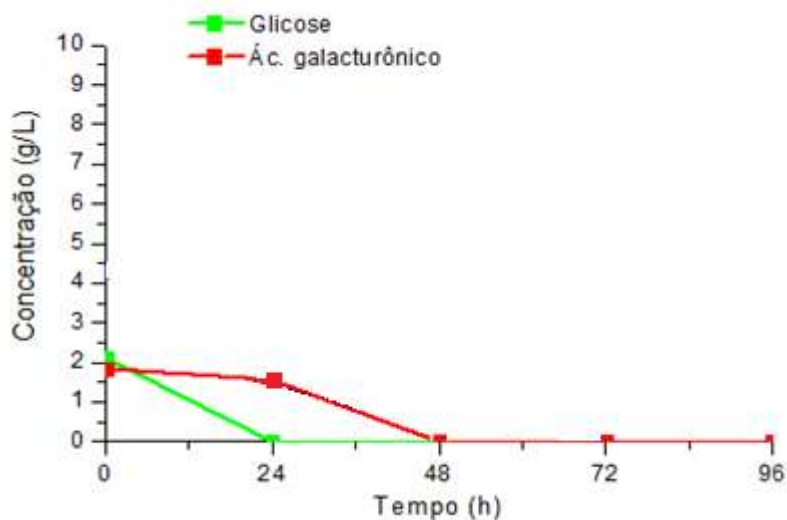


Figura 5.9 - A variação do consumo do substrato durante o cultivo de *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414 em meio contendo a biomassa em pó da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)



5.2.2 Fermentação em biorreator de bancada

5.2.2.1 Produção de enzimas por *Trichoderma reesei*.

O perfil de produção de enzimas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 está apresentado na Figura 5.10.

Os valores máximos das atividades celulolíticas, FPase e CMCase foram de 0,02 UI/mL e 0,25 UI/mL, respectivamente. A atividade xilanolítica atingiu valor máximo de 4,94 UI/mL e a pectinolítica de 0,57 UI/mL. A baixa atividade pectinolítica obtida mostra o pequeno consumo de substrato apresentado na Figura 5.11, semelhante ao quando utilizada a biomassa em pó da palma.

Figura 5.10 - Perfil de produção de enzimas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meio contendo a fração pectica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

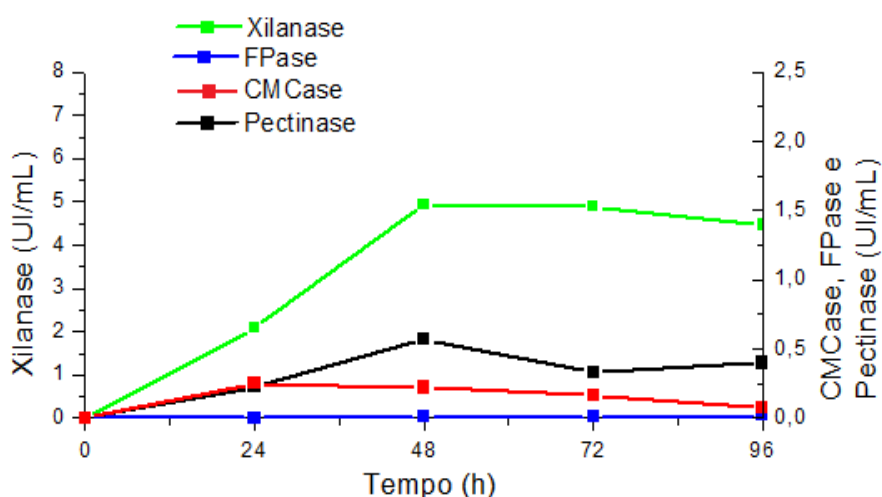
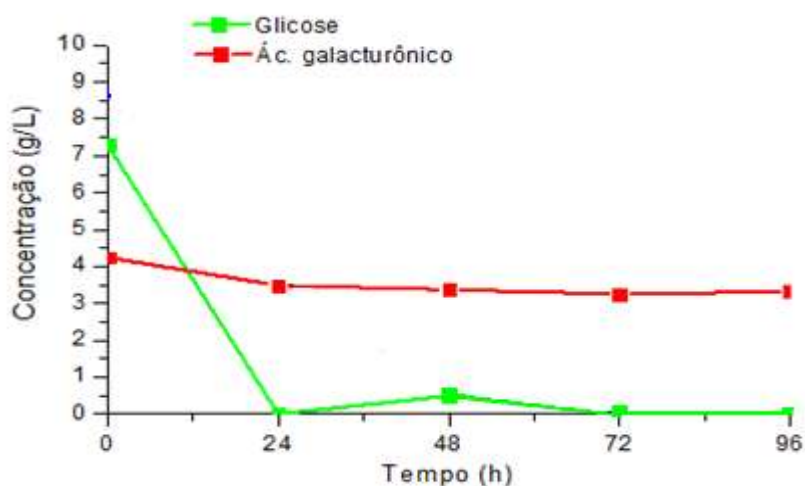


Figura 5.11 - Variação do consumo do substrato durante o cultivo de *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meio contendo a fração pectica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)



Pesquisas realizadas em biorreator por SILVA (2012) investigaram a produção de enzimas celulolíticas, utilizando o *T. reesei* RUT C-30, em diversas fontes de carbono (celulose microcristalina, xilana comercial e pectina comercial), em condições de cultivo semelhantes. No experimento realizado com a celulose, obtiveram-se também produções baixas de FPase (0,036 UI/mL) e de CMCase (0,27 UI/mL), uma menor indução na produção de xilanase (2,31 UI/mL) do que no presente trabalho. Já com a xilana comercial, os valores obtidos para FPase e CMCase foram de 0,13 UI/mL e 4,0 UI/mL, respectivamente, apresentando um alto valor de atividade de xilanase (11,83 UI/mL), como se esperava. Utilizando-se a pectina comercial como substrato, a atividade foi ainda menor para FPase (0,01 UI/mL), e a atividade de xilanase foi de 2,83 UI/mL e a de CMCase foi de 1,25 UI/mL.

5.2.2.2 Produção de enzimas por *Aspergillus awamori*

A produção de enzimas e a variação do consumo de substrato por *Aspergillus awamori* estão representados nas Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente.

Todas as atividades enzimáticas também foram induzidas, nesse caso. As atividades celulolíticas, FPase e CMCase, atingiram valores máximos de 0,03 UI/mL e 0,38 UI/mL, respectivamente. O valor máximo de xilanase foi de 3,72 UI/mL e a atividade pectinolítica atingiu valor de 1,84 UI/mL. Em comparação com o *T. reesei* RUT-30, a produção de atividade pectinase apresentou valor superior.

Figura 5.12- Perfil de produção de enzimas por *Aspergillus awamori* em meio contendo a fração pécica da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)

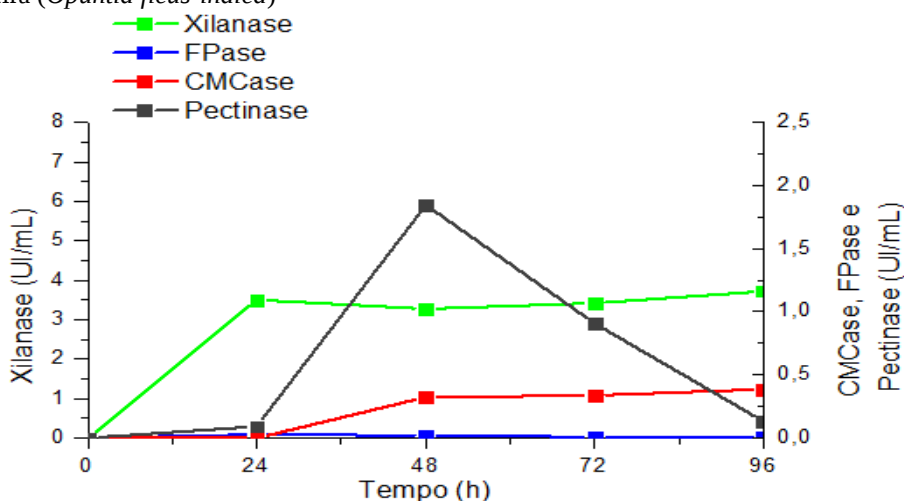
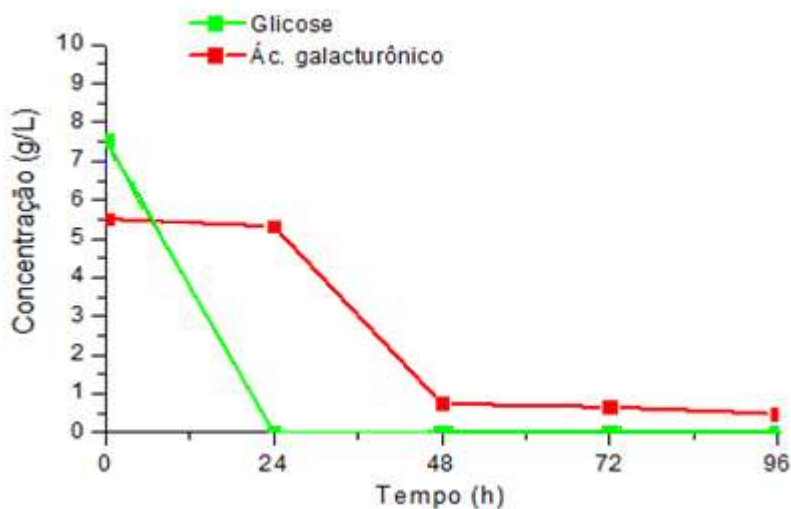


Figura 5.13 - Consumo do substrato durante o cultivo de *Aspergillus awamori* em meio contendo a fração p  tica da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*)



Em estudos realizados por Mojsov (2010) com a espécie *Aspergillus n  ger* foram testados meios contendo as seguintes fontes de carbono: glicose, frutose, lactose, galactose, pectina de ma   e polpa de ma  , para verifica  o da indu  o de enzimas pectinolíticas. Os resultados mostraram que a síntese dessas enzimas era induzida por substâncias pécticas e inibida na presença de glicose e frutose. No presente trabalho analisando a Figura 5.13 destacou-se que a produ  o de enzimas pectinolíticas só foi induzida após o consumo total da glicose presente no meio.

5.2.2.3 Produ  o de enzimas por *Bacillus* sp.

O perfil de produ  o de enzimas por *Bacillus* sp. está representado na figura 5.14 e a varia  o do consumo de substrato na Figura 5.15.

A produ  o de enzimas FPase, CMCase, xilanase e pectinase alcançaram atividades de 0,03 UI/mL, 0,37 UI/mL, 3,11 UI/mL e 0,51 UI/mL, respectivamente. O comportamento do consumo dos substratos foi semelhante com o encontrado quando utilizada a biomassa em p   como substrato, afirmando assim, a pequena indu  o de enzimas pectinolíticas por esta espécie estudada.

Figura 5.14 - Perfil de produção de enzimas por *Bacillus* sp. em meio contendo a fração pécica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

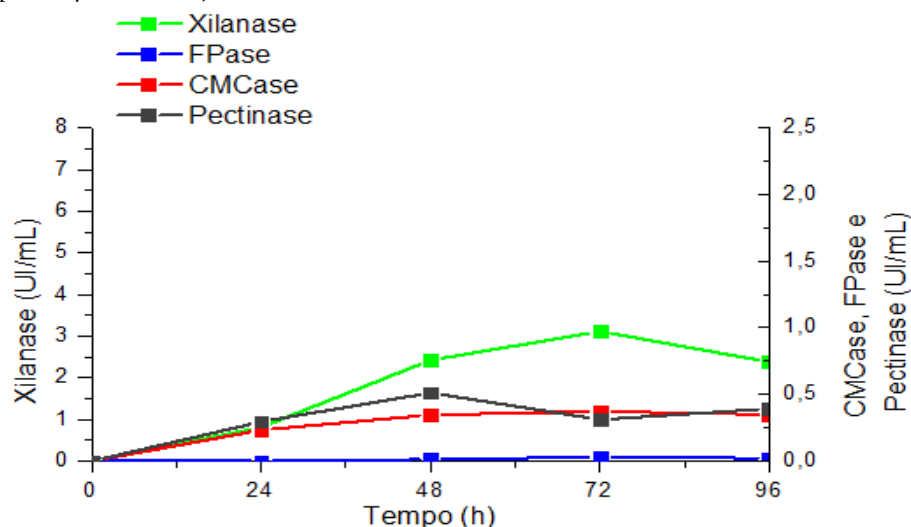
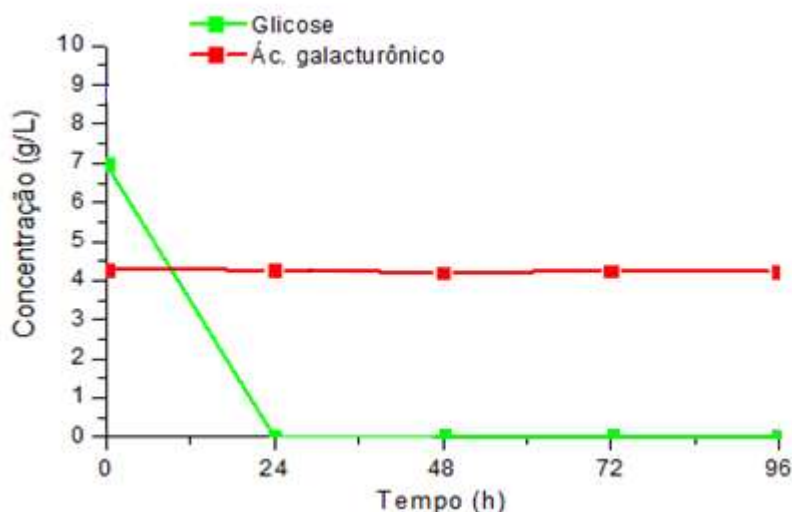


Figura 5.15 - Consumo do substrato durante o cultivo de *Bacillus* sp. em meio contendo a fração pécica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)



5.2.2.4 Produção de enzimas por *Streptomyces rochei*

Na figura 5.16, está apresentado o perfil de produção de enzimas por *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414.

Dentre os micro-organismos estudados, o *S. rochei* apresentou maior atividade de pectinase (2,24 UI/mL). As atividades máximas de FPase, CMCase e xilanase foram 0,01 UI/mL, 0,25 UI/mL e 1,29 UI/mL, respectivamente. A variação do consumo do substrato, apresentado na Figura 5.17, mostra a utilização tanto da glicose como também do ácido galacturônico, produto final da degradação da pectina.

Figura 5.16- Perfil de produção de enzimas por *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414 em meio contendo a fração pécica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

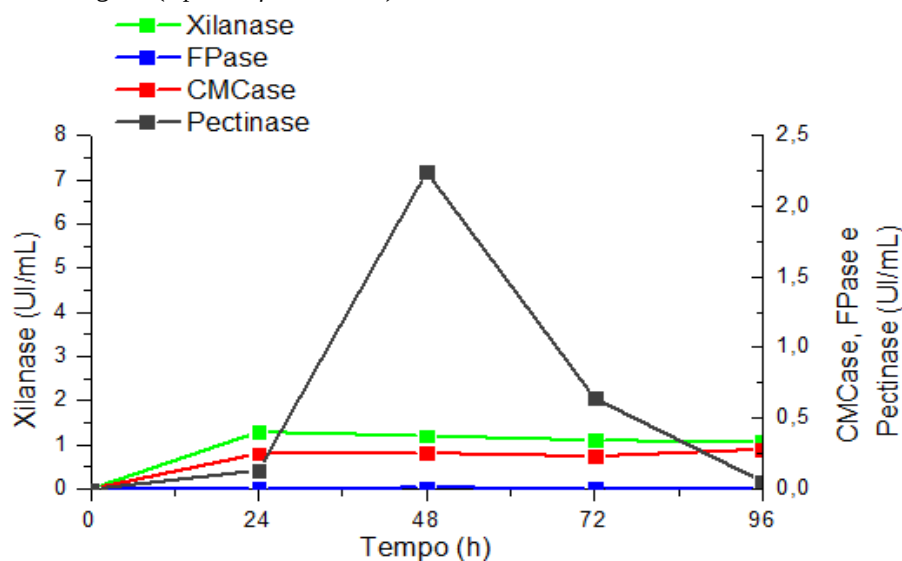
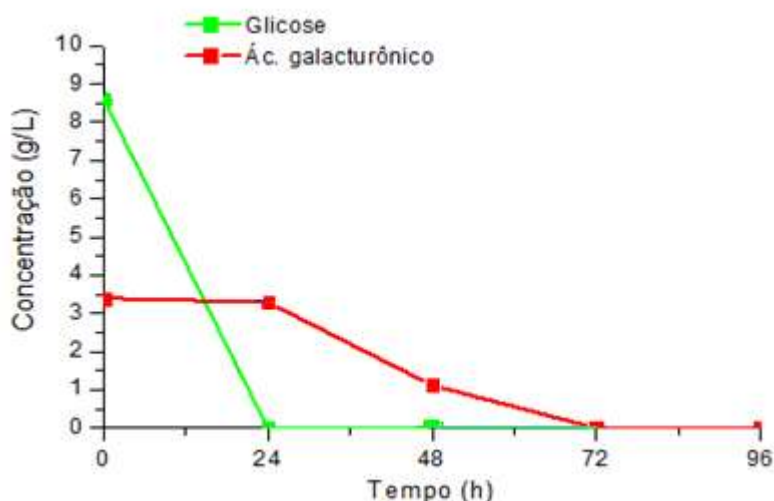


Figura 5.17- A variação do consumo do substrato durante o cultivo de *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414 em meio contendo a fração pécica da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)



Na literatura não são encontrados trabalhos utilizando frações da palma forrageira como substrato para produção de enzimas em fermentação submersa, no entanto a produção de enzimas utilizando a palma forrageira é normalmente investigada em fermentação semi-sólida.

O presente trabalho, utilizando a fração pécica da palma gigante, mostra a capacidade de indução da produção de enzimas importantes na hidrólise de biomassas, tanto por fungos como por bactérias. As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam as atividades máximas obtidas com os diversos microrganismos.

Tabela 5.2- Atividades máximas obtidas de cultivos em frascos agitados

Micro-organismo	Atividade enzimática (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
<i>Trichoderma reesei</i>	7,75	2,45	0,21	0,55
<i>Aspergillus awamori</i>	5,85	0,96	0,1	1,54
<i>Streptomyces rochei</i>	1,53	0,27	0,01	2,09
<i>Bacillus</i> sp.	3,9	0,46	0,04	0,31

Tabela 5.3- Atividades máximas obtidas de cultivos em biorreator de bancada

Micro-organismo	Atividade enzimática (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
<i>Trichoderma reesei</i>	4,94	0,25	0,02	0,57
<i>Aspergillus awamori</i>	3,72	0,38	0,03	1,84
<i>Streptomyces rochei</i>	1,29	0,25	0,01	2,24
<i>Bacillus</i> sp.	3,1	0,37	0,03	0,51

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho pôde confirmar a capacidade de indução da produção de diferentes enzimas utilizando-se como fonte de carbono tanto a biomassa total como a fração péctica de cladódios da palma forrageira *Opuntia fícus-indica*. A biomassa total da palma gigante proporcionou aos microrganismos maior indução de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, principalmente por *Trichoderma reesei* RUT C30. Por outro lado, com a fração péctica, *Streptomyces rochei* e *Aspergillus awamori* apresentaram valores maiores nas atividades pectinolíticas. Conclui-se, portanto, que a biomassa da palma forrageira e sua fração péctica são potenciais substratos para a produção de enzimas capazes de atuar na hidrólise de biomassas lignocelulósicas em biorrefinarias, fazendo-se necessária a realização de trabalhos futuros para ajuste de condições de produção e verificação da eficácia dessas enzimas na hidrólise de biomassas.

7 REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; ROBERTS, K.; SEDEROFF, R.; STAEHELIN, A. Biochemistry of the cell wall molecules. In: **Plant cell walls: from chemistry to biology**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; p. 67-118, 2011.
- AKHTAR, M. S.; SALEEM, M.; AKHTAR, M. W. Saccharification of Lignocellulosic Materials by the Cellulases of *Bacillus subtilis*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 3, n. 2, 2001.
- ANDRADE, M.V.V.; DELATORRE, A.B. LADEIRA, S.A.; ANDRADE, V.V.V.; MARTINS, M.L.L. Produção de poligalacturonase usando *bacillus sp* por fermentação submersa. **Perspectivas online**, v. 5, n. 17, 2011.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. In: **Biotechnology for biofuels**. Springer, 2010.
- ARAÚJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; NETO, A. P.; ALSINA, O. L. S.; SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.3, p.379-384, 2005.
- ARO, N.; SALOHEIMO, A.; ILMÉN, M.; PENTTILÄ, M. ACE II, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 24309-24314, 2001.
- BALADHANDAYUTHAM, S.; THANGAVELU, V. Optimization and Kinetics of Solid-state Fermentative Production of Pectinase by *Aspergillus awamori*. **International Journal of Technology and Research**, v.3, p. 1758-1764, 2011.
- BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. Dissertação de Mestrado, Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, p 90. 2010.
- BATISTA, A.M.V.; CARVALHO, R.C.; ROCHA, R.R.F., A palma forrageira na alimentação de ruminantes no semiárido brasileiro. In: **Anais II simpósio brasileiro de produção de ruminantes UESB-Ba**, 2013.
- BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- CARVALHO, K.F. Monografia: **Avaliação da produção de pectinases por *streptomyces rochei* ca17 utilizando resíduos agroindustriais**. UFPE, 2014
- CARVALHO T.; ABREU, G. F.; PACHECO, C. S. V.; FERREIRA A. N.; ROCHA, T.J.O.; FRANCO, M. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido da palma doce (*nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. **REA – Revista de estudos ambientais**, v.14, n.3, p.48-57, 2012.

CASTRO, A. M.; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.

CHIANI, M. A.; AKBARZADEH, A.; FARHANGI, M.; MAZINARI, Z.; SAFFARI, K.; EMADZADEH, M. R. Optimization of culture medium to increase the production of desferrioxamine B in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, p. 546-550, 2010.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. 29:3-23. 2005.

CUI, Y. Q.; OKKERSE, W. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. CH. A. M. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, n., p.216-229, 1998.

FARIAS, I.; SANTOS, D. C. dos; DUBEUX JR, J. C. B. Estabelecimento e manejo da palma forrageira. In: **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 81-103. 2005.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: current status challenges and future direction. **Energy Fuel**, p. 1727-1737, 2006.

FESTUCCI-BUSSELLI; OTONI; JOSHI. Structure and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.19, p.1 - 13, 2007.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure and applied chemistry**, v.59, p.257-268, 1987

GOYAL V. MITTAL A., BHUWAL A. K., SINGH G., YADAV A., AGGARWAL N. K. Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus sp.* 313SI under Stationary and Shaking Conditions. **Hindawi Publishing Corporation Biotechnology Research International**, 2014.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T.; Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v.38, p. 987–996, 2003.

HERNANDEZ, M.; JESUS, V. J. Evaluation of three different protocols of protein extraction for arabidopsis thaliana leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. **Jornal of Proteomics**, v. 71, p. 461-472, 2008.

JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R. Microbial Pectinolytical Enzymes: a Review. **Process Biochemistry**. v.40, p.2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a Review. **Bioresource Technology**, v.77, p.215-227, 2001.

KIN, B.K. ET AL. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* A- 53 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6-7, p. 411-416, 2009.

KNOB, A.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Volume 26, p 389-407, 2010.

KULOYO. **Ethanol production by yeast fermentation of an *Opuntia ficus-indica* biomass hydrolysate.** Dissertação de Mestrado, University of the Free State, Africa do sul, 2012.

LADEIRA, R. I. DE SOUZA. **Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase de *Cylindrocladium pteridis*.** 2013. 81 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

LEITE, M.L.V. **Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica* e *Nopalea cochenilifera*.)** Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias – CCA, Grupo de Pesquisa Lavoura Xerófila – GPLX, Areia, PB, 2006.

LIDSTROM, M. E. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In **The Prokaryotes**, vol. 2, p. 618–634, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZIL, W. H.; PRETORIOUS, I. S. Microbial cellulase utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n.3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, p.467-475, 2002.

LO, C. W.; N. S. LAI.; CHEACH, N. K. I.; WONG, C. C.; Actinomycetes isolated from soil samples from the crocker range Sabah. **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation**, p. 1-7, 2002

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.; TONG-MIN SA. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60, 2490–2495, 2010.

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através fermentação submersa e fermentação em estado sólido.** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 108 f. 2006.

MENEZES, R.S.C.; DUTRA, E.D.; SANTOS, T.N. Potencial de produção de biocombustíveis a partir da biomassa de palma. In: **Congresso brasileiro de palma e outras Cactáceas**, Garanhuns, 2011.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F. & TEIXEIRA, J.A. 2008. **A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate.** In: Ferreira, E.C. & Mota, M. (eds.) Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR. Braga, Portugal, p.9, 2008.

MILANEZI, N. V. G.; MENDOZA, D. P. G.; SIQUEIRA, F. G.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O. & FILHO, E. X. F. Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, 2011.

MINOTTO, E.; MILAGRE, L. P.; OLIVEIRA, M. T.; TEREZINHA, S. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, p.16-23, 2014.

MOJSOV, K. The effects of different carbon sources on biosynthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Technologies & Innovations**, v. 3. p. 23-29, 2010.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v.41, n. 242, p.28-33, 2007.

NAIK, S. N.; GOUD, V.V.; ROUT, P. K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v. 14, p. 578-597, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 5ed., cap. 6, Porto Alegre, editora Artmed, 2011.

NIDETZKY, B. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Biochemical Journal**., v. 298, p. 705-10, 1994.

NOBEL, P.S. Recent ecophysiological findings for *Opuntia ficus-indica*. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, 1997.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: toward an industrial metabolism. **Biochimie**.v. 91, p. 659–664, 2009.

OGEL, J.M.; BRODERSEN, D. E.; JR, W. M. C.; TARRY, M. J. ; CARTER, A. P. ; RAMAKRISHNAN, V. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. **Science**, v.4, p.897-902, 2001

OLIVEIRA, S. C.; FILHO, F. N. C.; RANGEL, A. H. N.; LOPES, K. B. P. A palma forrageira: alternativa para o semi-árido. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA) Revisão de Literatura Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)** v.6, n.3, p. 49 – 58, 2011 .

PAIVA, E. P., LIMA, M. S., PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.4, p. 196-211, 2009.

PEIXOTO, M.J.A; MARIA, S.S.C Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, em diferentes substratos, após micropropagação *in vitro*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, n. 1, p. 17-20, 2006.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**l., v. 67p. 577-591, 2005.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

RAWASHDEH, I. SAADOUN, and A. MAHASNEH. “Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain lb 24D) and its potential to utilize tomato pomace”. **African Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 251-255, 2005.

REYES-AGUERO J.A. Reproductive biology of *Opuntia*: a review. **Journal of Arid Environments**, v.64. p. 549-585, 2006.

RITTER, C.E.T.; CAMASSOLA, M.; ZAMPIERI, D.; SILVEIRA, M.M. AND DILLON, A.J.P. Cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged media containing cellulose amended with sorbitol. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2013.

SAAD, M.B.W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado em Ciências, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, p.138, 2010.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p 279-29, 2003.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.; Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in applied microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 5270-5295, 2008.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindústrias.** 2005. 90f. Dissertação de Mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; ROCHA, T. J. H.; FONSECA, S. F., FRAN, M. Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATE, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, n.7, p. 541-549, 2010

SHEN, Z.; MANNING, G.; REESE, J. C.; REECK, G. R.; Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 209–214, 1999.

SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. v.7, n.10, 2006.

SILVA, M.J. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Antibióticos. 2012.

SIQUEIRA, F. G. & FILHO, E. X. F. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**. v. 7, p. 54-60. 2010

SOMERVILLE, BAUER. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**. v. 306, p. 2206-2211, 2004

SOUZA, R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semisólida utilizando resíduo do maracujá como substrato.** 97 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2008.

SUN,Y.; CHENG,J.Hydrolysis of ligneocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresourcer Technology**, Essex, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Review in Biotechnology**, v. 22, p. 33-46, 2002

STRICKER, A.; MACH, R.; DE GRAAFF, L. Regulation of transcription of cellulases – and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 211-20, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, p. 340-347, 2004.

UENOJO,M.;PASTORE G. M.Pectinases: aplicações industriais e perspectivas.**Química Nova**,v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

YANG Y.Z; YANG, S.Q.; YAN, Q.J. High level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophilus* J18 on wheat straw in solid-state fermentation.**Bioresourcer Technology**, v.97, n.15, p. 1794-1800, 2006

WANDERLEY, W.L.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, D.K.B. et al. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica*, Misp) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.)) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.273-281, 2002.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R.Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems.**Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p.797-824, 2006.

APÊNDICE A –Tabelas dos resultados da produção de enzimas em frascos agitados.

Tabela A.1 –Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,12±0,50	0,00±0,22	0,00±0,00	0,00±0,02
24	6,29±0,15	2,12±0,14	0,10±0,00	0,30±0,02
48	7,75±0,74	2,45±0,83	0,21±0,01	0,55±0,14
72	6,65±0,08	2,25±0,67	0,14±0,06	0,37±0,08
96	6,48±0,03	1,99±0,41	0,09±0,03	0,29±0,08

Tabela A.2 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Aspergillus awamori*.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,20 ± 0,07	0,01± 0,00	0,00 ± 0,01	0,18 ± 0,10
24	4,78 ± 0,46	0,64 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,45 ± 0,06
48	5,11 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,10 ± 0,01	1,54 ± 0,03
72	5,85 ± 0,07	0,96± 0,02	0,06 ± 0,00	0,97 ± 0,01
96	5,39 ± 0,04	0,95± 0,01	0,02 ± 0,01	0,85 ± 0,01

Tabela A.3 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Bacillus* sp. UFPEDA 472.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,31 ± 0,05
48	1,46 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01
72	3,93 ± 0,02	0,46 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00
96	1,50 ± 0,16	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01

Tabela A.4 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	1,53 ± 0,08	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,27 ± 0,00
48	0,99 ± 0,15	0,27 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,09 ± 0,01
72	0,68 ± 0,07	0,27 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,64 ± 0,06
96	0,66 ± 0,05	0,17 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,02

APÊNDICE B – Tabelas dos resultados das concentrações de substratos em frascos agitados.

Tabela B.1 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	2,07	1,84
24	0,00	1,02
48	0,11	0,64
72	0,00	0,79
96	0,00	0,78

Tabela B.2 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Aspergillus awamori*.

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	2,10	1,89
24	0,00	1,10
48	0,00	1,13
72	0,00	0,00
96	0,00	0,00

Tabela B.3 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Bacillus* sp. UFPEDA 472

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	1,80	2,00
24	0,00	1,65
48	0,00	1,41
72	0,00	1,42
96	0,00	1,46

Tabela B.4 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Streptomyces rochei* UFPEDA 3414.

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	2,11	1,84
24	0,00	1,55
48	0,00	0,00
72	0,00	0,00
96	0,00	0,00

APÊNDICE C – Tabelas dos resultados da produção de enzimas em biorreator de bancada.

Tabela C.1 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	2,09 ± 0,28	0,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,12
48	4,94 ± 0,76	0,22 ± 0,08	0,01 ± 0,00	0,57 ± 0,01
72	4,90 ± 0,12	0,17 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,01
96	4,47 ± 0,12	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,40 ± 0,06

Tabela C.2 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Aspergillus awamori*.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	3,49 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,00
48	3,27 ± 0,11	0,32 ± 0,02	0,02 ± 0,00	1,84 ± 0,00
72	3,41 ± 0,09	0,33 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,01
96	3,72 ± 0,17	0,38 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,00

Tabela C.3 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Bacillus* sp. UFPEDA 472.

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00± 0,00
24	1,36±0,43	0,23±0,05	0,00±0,00	0,29± 0,06
48	2,42±0,09	0,34±0,10	0,01±0,00	0,51± 0,04
72	3,11±0,16	0,37±0,02	0,02±0,00	0,31± 0,04
96	2,37±0,09	0,34±0,05	0,02±0,00	0,39± 0,02

Tabela C.4 – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões do cultivo com *Streptomyces rochei* CA-17

Tempo de cultivo (h)	Atividades enzimáticas (UI/mL)			
	Xilanase	CMCase	FPase	Pectinase
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	1,29 ± 0,37	0,25 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,00
48	1,20 ± 0,26	0,25 ± 0,04	0,01 ± 0,00	2,24 ± 0,07
72	1,10 ± 0,30	0,23 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,64 ± 0,01
96	1,06 ± 0,40	0,28 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00

APÊNDICE D – Tabelas dos resultados das concentrações de substratos em biorreator de bancada.

Tabela D.1 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	7,29	4,24
24	0,00	3,48
48	0,00	3,37
72	0,00	3,24
96	0,00	3,32

Tabela D.2 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Aspergillus awamori*.

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	7,54	5,50
24	0,00	5,42
48	0,00	0,74
72	0,00	0,65
96	0,00	0,48

Tabela D.3 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Bacillus* sp. UFPEDA 472

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	6,97	4,28
24	0,00	4,26
48	0,00	4,19
72	0,00	4,24
96	0,00	4,23

Tabela D.4 – Concentrações de substratos durante o cultivo por *Streptomyces rochei* CA-17

Tempo de cultivo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Ácido galacturônico
0	8,61	3,39
24	0,00	3,29
48	0,00	1,12
72	0,00	0,00
96	0,00	0,00