

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA REGINA KAPP

**Investigação da produção de enzimas celulolíticas em fungos filamentosos
para aplicação na biodegradação de bagaço de cana-de-açúcar**

ARARAQUARA-SP

2016

BÁRBARA REGINA KAPP

**Investigação da produção de enzimas celulolíticas em fungos filamentosos
para aplicação na biodegradação de bagaço de cana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

ARARAQUARA – SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K672i Kapp, Bárbara Regina
Investigação da produção de enzimas celulolíticas em fungos filamentosos para aplicação na biodegradação de bagaço de cana / Bárbara Regina Kapp. – Araraquara, 2016
153 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

1. Fungos filamentosos. 2. Enzimas celulolíticas. 3. *Aspergillus terreus*. 4. Bagaço de cana. 5. Bioconversão. 6. Cellulolytic enzymes. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

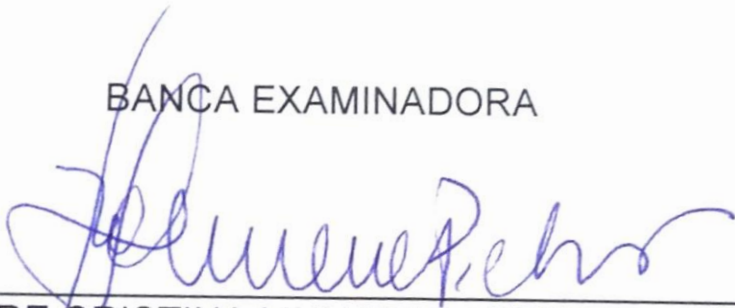
BARBARA REGINA KAPP

Investigação da produção de enzimas celulolíticas em fungos filamentosos para aplicação na biodegradação de bagaço de cana

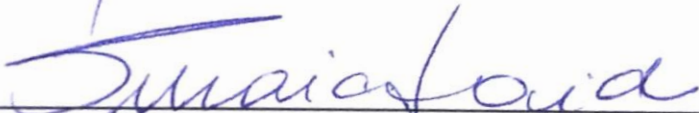
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 01 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO



SURAIA SAID



FERNANDO MASARIN

"Quando você decide parar ou começar alguma coisa, seja como for, você tem que seguir em frente. Tudo que precisa é de atitude e determinação"

Yuuko Ichihara

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Carlos e Maria Isabel pelo apoio, carinho e aconselhamentos. Por sempre acreditarem no meu futuro.

Aos demais familiares, irmãos, cunhadas e sobrinhos por todo apoio e momentos de alegrias.

À minha orientadora Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pela oportunidade, ensinamentos, conselhos e dedicação para este trabalho.

Ao James Ribeiro, por todo o apoio nesta nova etapa da minha vida, por conselhos e por estar comigo em todos os momentos.

A toda equipe do laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da UNESP, que sem dúvidas este trabalho não seria concluído.

Ao Professor Doutor Marcel Otávio Cerri por todo auxílio e conselhos.

Ao Professor Doutor Fernando Masarin e o aluno Fernando Paz por toda ajuda na reta final do trabalho.

A todos os meus amigos que fizeram parte da minha jornada: Vanessa, Renata Ribeiro, Alice, Rafael, Cindy, Isabella, Renata Kurokawa, Ivy e Heloisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin e ao Fernando Paz por toda a ajuda e ensinamentos na reta final.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão da Literatura	18
2.1. Enzimas Celulolíticas	18
2.2. Fungos Filamentosos	21
2.3. Biodegradação de Bagaço de Cana	23
3. Objetivos	28
3.1. Objetivos Específicos	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Materiais	29
4.2. Equipamentos	30
4.3. Métodos	31
4.3.1. Microrganismo e Manutenção	31
4.3.2. Meios de Cultura	32
4.3.2.1. Meio de cultura para a metodologia de coloração por Vermelho congo	32
4.3.2.2. Meios de cultura para produção de celulase por fungos filamentosos	32
4.3.3. Produção Enzimática em Agitador Orbital	33
4.3.4. Curva de Produção Enzimática em diferentes meios	33
4.3.5. Avaliação da Influência da Composição do Meio de cultura na Produção enzimática	35
4.3.6. Recuperação das Enzimas Produzidas	36
4.3.7. Determinação de Atividade Enzimática	36
4.3.7.1. Determinação de Celulase Total (FPase)	36
4.3.7.2. Determinação de Atividade Endoglucanase	37
4.3.7.3. Determinação de Atividade Exoglucanase	37
4.3.7.4. Determinação de Atividade β -Glicosidase	38
4.3.8. Parâmetros Bioquímicos Enzimáticos	39
4.3.8.1. Estabilidade quanto à temperatura	39
4.3.8.2. Estabilidade quanto ao pH	39
4.3.9. Determinação de Proteínas	40
4.3.10. Perfil de Atividade Enzimática por Tempo de Incubação	40
4.3.11. Purificação Parcial das Enzimas	40
4.3.11.1. Precipitação por Sulfato de Amônio e Diálise	40
4.3.11.2. Precipitação por Etanol	41
4.3.11.3. Precipitação por Acetona	41
4.3.12. Eletroforese	41
4.3.13. Pré-Tratamento do Bagaço de Cana	42
4.3.14. Análise de composição de Bagaço de Cana <i>in natura</i> e pré –tratado	43
4.3.15. Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar	44
4.3.16. Análise da Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana <i>in natura</i> e pré-tratado	45
5. Resultados	46
5.1. Recuperação Fúngica e Técnica de Congo Red	46
5.2. Perfil de Atividade Enzimática	47
5.2.1. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio A	47
5.2.2. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio B	48
5.2.3. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio C	49
5.2.4. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio D	50

5.3. Avaliação da Influência da Composição do Meio de Cultura A na Produção Enzimática	52
5.4. Estabilidade Enzimática	56
5.4.1. Estabilidade Enzimática de <i>Aspergillus niger</i> cultivado em Meio A	56
5.4.1.1. Estabilidade ao pH	56
5.4.1.1.1. β -Glicosidase	56
5.4.1.1.2. Endoglucanase	57
5.4.1.1.3. Exoglucanase	58
5.4.1.1.4. FPAse	59
5.4.1.2. Estabilidade à Temperatura	61
5.4.1.2.1. β -Glicosidase	61
5.4.1.2.2. Endoglucanase	62
5.4.1.2.3. Exoglucanase	63
5.4.1.2.4. FPAse	64
5.4.2. Estabilidade Enzimática de <i>Aspergillus terreus</i> cultivado em Meio B	65
5.4.2.1. Estabilidade ao pH	65
5.4.2.1.1. β -Glicosidase	65
5.4.2.1.2. Endoglucanase	66
5.4.2.1.3. Exoglucanase	67
5.4.2.1.4. FPAse	68
5.4.2.2. Estabilidade à Temperatura	69
5.4.2.2.1. β -Glicosidase	69
5.4.2.2.2. Endoglucanase	70
5.4.2.2.3. Exoglucanase	71
5.4.2.2.4. FPAse	72
5.4.3. Estabilidade Enzimática de <i>Aspergillus terreus</i> cultivado em Meio C	73
5.4.3.1. Estabilidade ao pH	73
5.4.3.1.1. β -Glicosidase	73
5.4.3.1.2. Endoglucanase	74
5.4.3.1.3. Exoglucanase	75
5.4.3.1.4. FPAse	76
5.4.3.2. Estabilidade à Temperatura	77
5.4.3.2.1. β -Glicosidase	77
5.4.3.2.2. Endoglucanase	78
5.4.3.2.3. Exoglucanase	79
5.4.3.2.4. FPAse	80
5.4.4. Estabilidade Enzimática de <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em Meio C com 4 dias de cultivo	81
5.4.4.1. Estabilidade ao pH	81
5.4.4.1.1. β -Glicosidase	81
5.4.4.1.2. Endoglucanase	81
5.4.4.1.3. Exoglucanase	82
5.4.4.1.4. FPAse	83
5.4.4.2. Estabilidade à Temperatura	84
5.4.4.2.1. β -Glicosidase	84
5.4.4.2.2. Endoglucanase	84
5.4.4.2.3. Exoglucanase	85
5.4.4.2.4. FPAse	86

5.4.5.	Estabilidade Enzimática de <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em Meio C com 13 dias de cultivo	87
5.4.5.1.	Estabilidade ao pH	87
5.4.5.1.1.	β -Glicosidase	87
5.4.5.1.2.	Endoglucanase	87
5.4.5.1.3.	Exoglucanase	88
5.4.5.1.4.	FPAse	89
5.4.5.2.	Estabilidade à Temperatura	90
5.4.5.2.1.	β -Glicosidase	90
5.4.5.2.2.	Endoglucanase	90
5.4.5.2.3.	Exoglucanase	91
5.4.5.2.4.	FPAse	92
5.4.6.	Estabilidade Enzimática de <i>Aspergillus terreus</i> cultivado em Meio D	93
5.4.6.1.	Estabilidade ao pH	93
5.4.6.1.1.	β -Glicosidase	93
5.4.6.1.2.	Endoglucanase	94
5.4.6.1.3.	Exoglucanase	95
5.4.6.1.4.	FPAse	96
5.4.6.2.	Estabilidade à Temperatura	97
5.4.6.2.1.	β -Glicosidase	97
5.4.6.2.2.	Endoglucanase	98
5.4.6.2.3.	Exoglucanase	99
5.4.6.2.4.	FPAse	100
5.5.	Perfil de Atividade Enzimática por Tempo de Incubação	101
5.6.	Purificação Parcial	102
5.7.	Eletroforese	104
5.8.	Biodegradação de bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado	105
6.	Discussão	107
7.	Conclusões	126
8.	Referências	127
	Anexo I	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de degradação enzimática do complexo celulolítico	21
Figura 2.	Modelo de estrutura de lignina presente nas coníferas	25
Figura 3.	Fungos Filamentosos em meio PDA	46
Figura 4.	Crescimento de fungos filamentosos em meio com Congo Red.	47
Figura 5.	Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio A	48
Figura 6.	Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio B	49
Figura 7.	Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio C	50
Figura 8.	Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio D	51
Figura 9.	Atividade Enzimática Específica e proteína de triplicata do ensaio 8 de Plackett & Burman	55
Figura 10.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função do pH	57
Figura 11.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função do pH	58
Figura 12.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função do pH	59
Figura 13.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A por tempo, em função do pH	60
Figura 14.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função da Temperatura	61
Figura 15.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função da Temperatura	63
Figura 16.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função da Temperatura	64
Figura 17.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio A em função da Temperatura	65
Figura 18.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio B em função do pH	66
Figura 19.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio B em função do pH	67
Figura 20.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio B em função do pH	68
Figura 21.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio B em função do pH	69
Figura 22.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio B em função da Temperatura	70
Figura 23.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio B em função da Temperatura	71
Figura 24.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio B por tempo, variando a temperatura	72
Figura 25.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio B em função da Temperatura	73
Figura 26.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função do pH	74
Figura 27.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função do pH	75

Figura 28.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função do pH	76
Figura 29.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus niger</i> no Meio C em função do pH	77
Figura 30.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C por tempo, variando a temperatura	78
Figura 31.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função da Temperatura	79
Figura 32.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função da Temperatura	80
Figura 33.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em função da Temperatura	81
Figura 34.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH	82
Figura 35.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH	83
Figura 36.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH	84
Figura 37.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função da Temperatura	85
Figura 38.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função da Temperatura	86
Figura 39.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 4 dias de incubação em função da Temperatura	87
Figura 40.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH	88
Figura 41.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH	89
Figura 42.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH	90
Figura 43.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função da Temperatura	91
Figura 44.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função da Temperatura	92
Figura 45.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio C em 13 dias de incubação em função da Temperatura	93
Figura 46.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função do pH	94
Figura 47.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função do pH	95
Figura 48.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função do pH	96
Figura 49.	Porcentagem de Atividade residual de FPAse produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função do pH	96

Figura 50.	Porcentagem de Atividade residual de β -Glicosidase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função da Temperatura	98
Figura 51.	Porcentagem de Atividade residual de Endoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função da Temperatura	99
Figura 52.	Porcentagem de Atividade residual de Exoglucanase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função da Temperatura	100
Figura 53.	Porcentagem de Atividade residual de FPase produzida por <i>Aspergillus terreus</i> no Meio D em função da Temperatura	101
Figura 54.	Perfil de Atividade Enzimática por tempo de incubação do Extrato Enzimático Bruto produzido pelo Meio D	102
Figura 55.	Eletoforese desnaturante em gel de 10%	105
Figura 56.	Cromatogramas de CLAE coluna BIORAD AMINEX HPX-87H com ácido sulfúrico 0,005 mol.L ⁻¹ a 85°C por 12 minutos de corrida.	106
Figura 57.	Porcentagem de conversão de celulose em glicose por tempo de hidrólise	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção das enzimas celulolíticas par aos fungos filamentosos.	33
Tabela 2.	Composição do Meio A e as variáveis em Plackett & Burman	34
Tabela 3.	Disposição da combinação fatorial no modelo de Plackett & Burman de 16 ensaios	35
Tabela 4.	Fatorial de Plackett & Burman com 16 ensaios e atividade específica de β -glicosidase, endoglucanase, exoglucanase e FPAse	52
Tabela 5.	Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para β -Glicosidase.	53
Tabela 6.	Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para Endoglucanase.	53
Tabela 7.	Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para Exoglucanase.	54
Tabela 8.	Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para FPAse.	54
Tabela 9.	Análise da atividade específica das enzimas celulolíticas após processos de purificação parcial e taxas de recuperação	103
Tabela 10.	Composição Química de bagaço de cana <i>in natura</i> e tratado com sulfito-alcalino	105
Tabela 11.	Porcentagem de Conversão de Celulose em Glicose por tempo de hidrólise	107

RESUMO

O complexo celulolítico é composto principalmente por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases atuam clivando a celulose nas ligações internas da fibra, enquanto as exoglucanases hidrolisam as ligações externas. A necessidade de novas pesquisas de enzimas celulolíticas capazes de degradar eficientemente resíduos industriais como bagaço de cana-de-açúcar para diminuir o custo da hidrólise enzimática e favorecer a produção de etanol de segunda geração. Neste trabalho foram estudadas as melhores condições dos fungos filamentosos em agitação orbital, além de caracterizar os parâmetros bioquímicos como pH e temperatura ótimos e determinar o melhor produtor do complexo celulolítico e analisar a capacidade quanto à biodegradação de bagaço de cana-de-açúcar comparado com enzima comercial. Através da análise de atividade enzimática, o *Aspergillus terreus* mostrou-se o fungo com a maior produção nos diferentes meios de cultivo, atingindo a maior atividade enzimática no meio contendo CMC, apresentando 230,65 UI.mg proteína⁻¹ de endoglucanase, 10,79 UI.mg proteína⁻¹ de β -glicosidase, 57,79 UI.mg proteína⁻¹ de exoglucanase e 68,60 UI.mg proteína⁻¹ de atividade celulolítica total (FPase). A análise realizada através do delineamento experimental de Plackett & Burman realizada no meio contendo glicose e celulose cristalina não mostrou influência da composição do meio de cultura na produção das enzimas do complexo celulítico. O estudo de estabilidade ao pH revelou que o pH 3 influencia negativamente todas as enzimas do complexo celulolítico. A purificação parcial do complexo enzimático produzido por *A. terreus* em meio contendo CMC resultou em melhores resultados para a precipitação com acetona para β -glicosidase e exoglucanase e FPase e que a enzima exoglucanase fica retida na membrana de diálise. O peso molecular do complexo enzimático purificado parcialmente produzido por *A. terreus* em meio contendo CMC é de 73 kDa. A conversão de celulose em glicose do complexo produzido por *A. terreus* purificado parcialmente foi inferior à enzima comercial sobre bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, porém, com conversão superior à enzima comercial no bagaço de cana *in natura* nos tempos de 4 e 8 horas de incubação.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Enzimas. Enzimas celulolíticas. *Aspergillus terreus*. Bioconversão. Bagaço de cana.

ABSTRACT

The cellulolytic complex is composed mainly of endoglucanases, exoglucanases and β -glycosidases. Endoglucanases act by cleaving the cellulose in the internal bonds of the fiber, while the exoglucanases hydrolyze the outer bonds. The need for new research on cellulolytic enzymes capable of efficiently degrading industrial residues such as sugarcane bagasse to reduce the cost of enzymatic hydrolysis and favor the production of second generation ethanol. In this work the best conditions of the filamentous fungi were studied in orbital agitation, besides characterizing the biochemical parameters as pH and temperature optimum and to determine the best producer of the cellulolítico complex and to analyze the capacity regarding the biodegradation of sugarcane bagasse compared to Commercial enzyme. Through enzymatic activity analysis, *Aspergillus terreus* showed the fungus with the largest output in the different culture media, achieving higher production in D medium, showing 230,65 65 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ for endoglucanase, 10788,34 $\text{nmol}.\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ for β -glycosidase, 57.79 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ for exoglucanase and 68,60 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ for Total Cellulolytic Activity – Filter Papel Activity (FPase). The analysis made with the Plackett & Burman design for the medium content glucose and crystal cellulose showed that the medium composition not show an influence on the enzyme production of cellulolytic complex. The enzymatic stability of pH showed that pH 3 has a negative influence for all enzymatic complex. The endoglucanase and FPase tend to 0% of residual activity after 24 hours of incubation in all studied pHs for all fungi. The partial purification showed best results with the acetone precipitation and, also, the exoglucanase enzyme was the only one retained on the dialysis membrane. The enzymatic complex produced by *A. terreus* in medium content CMC has a molecular weight of 73 kDa. The conversion of cellulose to glucose from the partially purified *A. terreus* complex was lower than the commercial enzyme on alkali sulfite pretreated sugarcane bagasse, but with conversion higher than the commercial enzyme in the cane bag in natura at times of 4 and 8 hours incubation.

Keywords: Filamentous fungi. Enzymes. Cellulolytic enzymes. *Aspergillus terreus*, Bioconversion. Sugar cane bagasse.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é a aplicação dos conceitos de engenharia e biologia através da utilização de organismos vivos no objetivo de criar novos produtos para modificar e melhorar a saúde e o ambiente. A aplicação das técnicas biotecnológicas está inserida em diversas áreas, tanto para a saúde, como para vacinas, transplantes e órgãos, quanto para a indústria, polímeros, produtos químicos e enzimas, e atualmente para a biorremediação e área ambiental (JUDICE, 2006). O histórico da biotecnologia data de milhares de anos através da observação dos processos que ocorriam naturalmente, como à seleção de sementes gerando a agricultura, domesticação de animais e processos fermentativos, como a panificação e fermentados alcoólicos, que pode ser classificada como biotecnologia antiga. A partir de meados de 1800, a biotecnologia passa a ser científica e não apenas observativa devido a inúmeras descobertas como a descoberta dos microrganismos e transferência de genes hereditários dentre outras descobertas levaram ao uso dos microrganismos na forma como são encontrados na natureza na produção de produtos de interesse, caracterizando a biotecnologia clássica. Em meados de 1950, a ciência desvendou a molécula de DNA e sua conformação de dupla hélice, o conceito de operons e a produção do primeiro anticorpo monoclonal e a transferência de DNA exógeno em diversos microrganismos, dessa forma, pode-se melhorar geneticamente os microrganismos que passaram a produzir compostos que naturalmente não faziam parte de seu genoma e aumentando a produção em larga escala de medicamentos, enzimas entre outros produtos, caracterizando a era moderna da biotecnologia, sendo hoje uma área de grande interesse no mercado internacional e nacional (VERMA et al, 2011; CLARK et al., 2002).

Na área da saúde, a pesquisa e desenvolvimento biotecnológico levaram a uma inovação das tecnologias atuais, que facilitam a acessibilidade a medicamentos, diagnósticos e terapias, além de reduzir os custos com doenças infecciosas e crônicas, além da redução da

pobreza e possibilidade de crescimento econômico do país (SALICRUP & FEDORKOVÁ, 2006). A produção de enzimas através de processos biotecnológicos torna-se importante em diversas indústrias, como de alimentos, papel e têxtil, que possuem em suas matérias primas substâncias que são alvos de degradação enzimática, como as fibras de tecido e a celulose, entre outros. A escolha da utilização das enzimas nos processos citados é viável para um processo economicamente vantajoso, muitas vezes, ecologicamente favorável em relação ao uso de ácidos e bases fortes bem solventes orgânicos, que geram efluentes de difícil descarte (BEILEN & LI, 2002; MILLER JR & NAGARAJAN, 2000).

As enzimas celulolíticas são um diferencial na produção de etanol de segunda geração pois há um benefício ambiental vantajoso comparado aos processos utilizando ácidos ou bases para a hidrólise de celulose, principalmente porque os processos enzimáticos são realizados em condições medianas de temperatura e pH. O uso de bactérias para a produção de celulasas para hidrólise enzimática foi cogitado a princípio com os gêneros *Clostridium*, *Erwinia* e *Streptomyces*, mas foi observado que a produção bacteriana era baixa quando comparada a fúngica (SUN & CHENG, 2002). Os fungos mais estudados para produção enzimática de celulasas são dos gêneros, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*, sendo o *Trichoderma* o mais extensivamente estudado.

A celulose é o polímero que compõem majoritariamente a composição das plantas e no Brasil, uma das maiores culturas é a cana-de-açúcar que é utilizada na obtenção de açúcar e etanol. Contudo, ainda há a geração de subprodutos como a vinhaça e bagaço de cana, materiais ricos em lignina, hemicelulose e principalmente a celulose. Dentre as utilizações para os subprodutos, o bagaço de cana pode ser utilizado para gerar energia elétrica através da queima, contudo, o componente com maior capacidade calorífica é a lignina e não a celulose e hemicelulose, dessa forma, a separação dos compostos através de pré-tratamento pode melhorar a queima e ainda separar celulose e hemicelulose para outros processos

biotecnologicamente vantajosos. O pré-tratamento do material pode separar essas frações, separando parte da lignina insolúvel e da solúvel das demais porções, deixando assim, a celulose passível de degradação pela ação das enzimas celulolíticas, que é uma das aplicações para o bagaço de cana e um início para a produção de etanol de segunda geração (GALBE & ZACCHI, 2002; PANDEY et al, 2000).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Enzimas Celulolíticas

As enzimas são, em geral, proteínas e a sua atividade é dependente da integridade da sua conformação tridimensional nativa. Os primeiros relatos datam de procedimentos de Pasteur, que a princípio foi chamado de fermentos. Só a partir de 1878, Wilhelm Kühne empregou o termo enzima. Elas pertencem a uma classe de moléculas que possuem o peso molecular bem variável e podem ou não depender de outra molécula para ter sua ação catalítica, o cofator. Íons inorgânicos, como por exemplo Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ou Zn^{+2} , uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica chamada de coenzima podem ser cofatores. A descoberta das enzimas modificou a visualização do metabolismo de todos os organismos. As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam e podem ser: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. (LEHNINGER & NELSON, 2011)

As enzimas celulolíticas, classificadas como hidrolases, que na nomenclatura EC (Enzyme Commission Number) recebem o número 3, são capazes de catalisar a degradação de materiais celulósicos entre outros. As enzimas são utilizadas largamente em indústrias têxteis, detergentes, colorantes e tratamentos de efluentes, além da sua aplicação em industriais alimentícias e de alimentação animal, através da clivagem de compostos

celulolíticos que aumentam o conteúdo de carboidrato disponível e disponibilidade de diversos componentes (CHERRY & FIDANTSEF, 2003; BHAT, 2000)

A degradação da celulose pela ação do complexo enzimático possui diversas aplicações, dentre elas podemos destacar duas, o processo de sacarificação e a facilitação de extração de compostos de origem vegetal. A sacarificação consiste em converter a celulose em monômeros de glicose, de grande importância à indústria sucroalcooleira visando o aumento da produção de etanol, através do bagaço de cana de açúcar (HASUNUMA et al., 2012). A extração de compostos vegetais, por sua vez, utiliza a degradação da celulose como uma etapa do processo extrativo, decompõe a parede celular e componentes estruturais, facilitando assim a extração de metabólitos primários e secundários das plantas, principalmente de cascas e raízes que necessitam de processos técnicos com aquecimento, o que aumenta o custo e a probabilidade de degradar os compostos de interesse. (CASTRO et al., 2010)

O primeiro estudo em enzimas celulolíticas foi durante a Segunda Guerra Mundial através da verificação da deterioração de roupas e barracas nas trincheiras. O resultado foi uma linhagem de um fungo filamentoso, codificado como QM6a, que foi identificado como *Trichoderma viride*, pelo Dr. Elwyn T. Reese (CASTRO et al., 2010). Mais tarde, o *Trichoderma viride* passou a se denominar *Trichoderma reesei* em homenagem ao Dr. Reese pelos seus trabalhos. Este fungo é amplamente distribuído no mundo e produz colônias brancas, com filamentos de esporulação verdes ou amareladas (GAMS & BISSET, 1998). O complexo enzimático celulolítico possui um comportamento diferente das outras enzimas que avaliam a sua atividade através da correspondência com a quantidade de glicose liberada, ou seja, a atividade do complexo não é linear entre a taxa de glicose liberada e a ação enzimática (ESTERBAUER et al., 1991).

Dentre as enzimas com ação celulolíticas as principais são a endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase (EC 3.2.1.4) são enzimas que atuam clivando as ligações β -1,4 nas regiões amorfas internas na fibra celulósica. Contudo, as endoglucanases podem degradar uma grande variedade de substratos como carboximetil celulose e hidroxietil celulose, que são derivados de celulose. Através da análise de peso molecular foram descobertos três grupos de endoglucanases, sendo o primeiro grupo o maior que compreende 10% das proteínas secretas, com massa molecular de 54kDa (SHOEMAKER et al., 1983; BHIKHABHAI et al., 1984; HENRISAT et al., 1985; NIKU-PÄÄVOLA et al., 1985; GOYAL et al., 1991). O segundo grupo é mais comum em espécies e subespécies de *Trichoderma*, com 49,8kDa (SALOHEIMO et al., 1988; GOYAL et al., 1991). Entretanto, o terceiro grupo das endoglucanases possui os menores pesos moleculares, variando de 20 a 23,5kDa e são conhecidas por serem mais termolábeis que as demais, o que dificulta a sua caracterização (BELDMAN et al., 1985; GOYAL et al., 1991).

As enzimas exoglucanases compreendem as enzimas denominadas de celobiohidrolases (1,4- β -D-Glucanohidrolase) com EC 3.2.1.9.1 e enzimas denominadas também de exoglucohidrolases (1,4- β -D-Glucano-glucanohidrolase) com EC 3.2.1.7.4. Estas enzimas tem como ação a clivagem de terminais redutores e não redutores da fibra celulósica, porém, diferentemente das endoglucanases, estas atuam em regiões cristalinas e em alguns oligossacarídeos. *Trichoderma reesei* , por exemplo, possui dois tipos de celobiohidrolases, denominadas de CBI e CBII , e esse grupo de enzimas compõem cerca de 60% das enzimas secretadas, o peso molecular varia de 42 a 72 kDa (BHIKHABHAI et al., 1984; GOYAL et al., 1991).

As últimas enzimas do complexo enzimático são a celobiase e β -glicosidase (β -D-glicosideo-glucohidrolase) com EC 3.2.1.2.1. A celobiase hidrolise a celobiose, dissacarídeo compostos por duas D-glicose enquanto a β -glicosidase tem capacidade de hidrolisar

oligossacarídeos, com dois ou mais monômeros de D-glicose. A clivagem da celulose por essas enzimas se dão nas ligações O-glicosídicas e a β -glicosidase sofre uma repressão de atividade pelo produto, glicose (KUBICEK et al., 1996; BELDMAN et al., 1985; GOYAL et al., 1991). Essas enzimas do complexo celulolítico atuam de forma sinérgica a sacarificar a celulose em D-glicose e, portanto, uma das formas para determinar a atividade das celulasas é quantificar o açúcar formado pela hidrólise. (DASHTBAN et al, 2010). O esquema da atividade sinérgica do complexo enzimático pode ser visualizado na Figura 1.

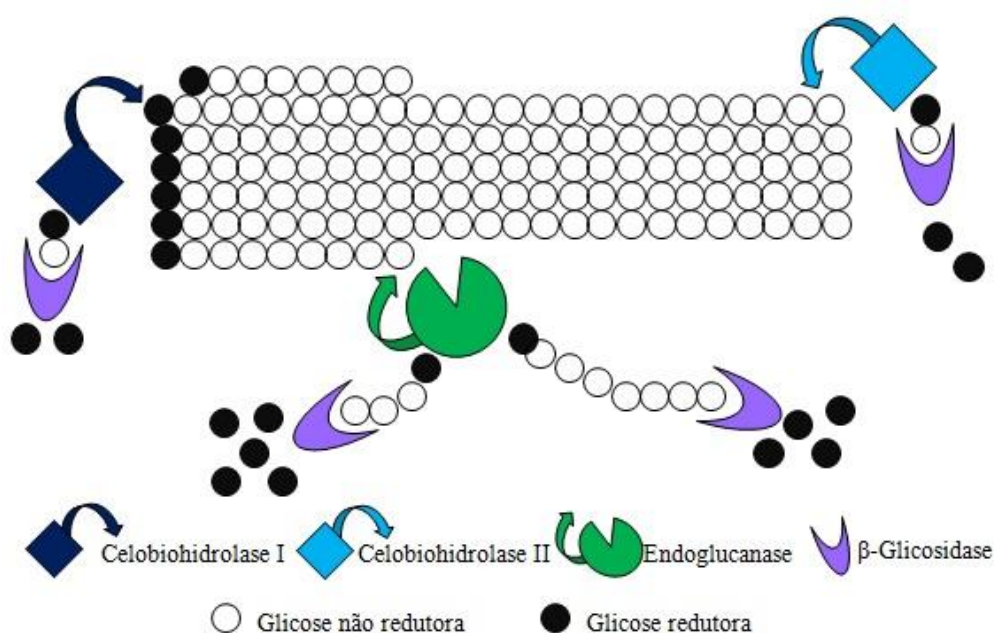


Figura 1. Esquema de degradação enzimática do complexo celulolítico (Adaptada de CASTRO, 2010)

2.2. Fungos Filamentosos

Trichoderma reesei foi o primeiro fungo a ter confirmada presença e atividade de enzimas celulolíticas. Este fungo faz parte dos Deuteromicetos incompletos, capazes de crescer em meio inorgânico com apenas uma fonte de carbono, produz longas hifas septadas e sua reprodução é assexuada por conídiosporos em formato de garrafas ou cilíndricas. O micélio é de crescimento branco e algodinoso, passando a verde ou às vezes amarelado quando produz seus conídios.

Contudo as linhagens de *Trichoderma* são capazes de produzir uma variedade de enzimas de interesse biotecnológico como hemicelulases, xilanases, glucomananases, proteases, amilases, lactases entre outras. A primeira linhagem de *T. reesei* estudada foi a QM 6a que em meados dos anos 70 passou por diversos processos de mutações com o objetivo de aumentar a produção de enzimas celulolíticas, que resultaram em linhagens básicas como a QM 9414, RUT C30 e MCG77, sendo que estes dois últimos são capazes de produzir enzimas celulolíticas em meios de cultura contendo apenas lactose como única fonte de carbono. Através de novas mutações, chegamos às linhagens VTT-D, L-27, SVG17, CL847 que são produtoras de larga escala usadas até hoje (ESTERBAUER et al., 1991; RECZEY et al., 1996; VELKOVSKA et al., 1997).

Os fungos do gênero *Penicillium* são normalmente encontrados em solo, pois possuem a característica de decomposição de matéria orgânica. Seus micélios são geralmente de coloração esverdeada, sua reprodução é assexual por conídios, em sua maioria. O gênero é famoso pela produção de metabólitos secundários que são utilizados como antibióticos e produtos farmacêuticos, sendo o mais famoso o *Penicillium chrysogenum* com a produção de penicilina, contudo, outras espécies de *Penicillium* também são importantes na indústria farmacêutica como por exemplo *Penicillium citrinum* na produção de estatinas. O gênero normalmente é saprofítico, contudo *P. marneffei* é um conhecido patógeno humano no sul da Ásia em imunodeficientes, esta espécie é uma das poucas do gênero capaz de crescer dimorficamente (ROYER et al., 2004; HOUBRAKEN et al., 2014).

Na indústria de alimentos, são largamente utilizados na produção de queijos pela capacidade de degradar componentes do meio como gordura e proteínas do leite, dentre os mais famosos temos o *P. camemberti* e *P. roqueforti*. O gênero também é capaz de produzir uma variedade de enzimas como amilase, protease, xilanase e celulasas (ROYER et al., 2004; VISAGIE et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014)

Ambos *Aspergillus* e *Penicillium* pertencem família *Aspergilaceae* da ordem *Eurotiales*, porém diferentemente do gênero *Penicillium* os fungos do gênero *Aspergillus* são bastante conhecidos por causar danos à saúde humana pela produção de micotoxinas como a aflatoxina, patulina, ocratoxina, citrinina e fumonisina, além de causar infecções das vias aéreas, sendo o mais conhecido *A. fumigatus* (HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014). Contudo, existem espécies do gênero *Aspergillus* que são de uso biotecnológico como o *A. oryzae* e *A. sojae* utilizados na Ásia para fermentações de alimentos a fim de produzir molho de soja, misô, saquê e diversos outros produtos, além de uma linhagem de *A. terreus* que produz lovastatina, importante redutor de colesterol utilizado na indústria farmacêutica (HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014). Outros exemplos de produtos de interesse biotecnológico produzidos por *Aspergillus* é o ácido cítrico (*A. niger*), ácido glucorônico (*A. niger*), ácido itacônico (*A. terreus*) e diversas enzimas como proteases, amilases, lipases pelo *Aspergillus oryzae* (HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014).

2.3. Biodegradação de Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço-de-cana requer um pré-tratamento do material lignocelulósico, necessário para facilitar a acessibilidade do complexo de celulasas, aumentando a conversão a D-glicose. Vários pré-tratamentos foram analisados e os mais clássicos são moagem, explosões a vapor (steam explosion), explosão das fibras com amônia (Ammonia fiber explosion – AFEX), água quente, hidrólise alcalina e hidrólise ácida (GALBE & ZACCHI, 2002). Entretanto, grandes partes destes processos clássicos dependem de energia excessiva e geram efluentes que devem ser tratados para serem descartados ou podem servir como base a novos processos biotecnológicos (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). A lignina é uma macromolécula produzida por plantas terrestres apenas com alta estabilidade química, está depositado nas

paredes celulares que recobrem a célula fornecendo rigidez, relativa impermeabilidade e resistência ao vegetal, tanto a impacto mecânico e torção, quanto à degradação por microrganismos, como bactérias e fungos. A resistência à degradação microbiana é devido à baixa acessibilidade da lignina aos organismos por ser uma macromolécula sem padrão de repetição conhecido, ou seja, os constituintes são randômicos. A polimerização da lignina é iniciada pela dehidrogenação de três precursores, álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool *p*-trans-cumárico, além de anéis aromáticos com cadeiras laterais e grupos hidroxila e metoxila ligados à molécula por ligações éter e carbono-carbono e um modelo da estrutura da lignina pode ser visualizado na figura 2 (MARCHAND et al, 2005; THEVENOT et al, 2010).

Enquanto a celulose é composta apenas por monômeros de glicose, a hemicelulose é um termo utilizado para denominar polissacarídeos de grupos distintos compostos por pentoses, como xilose e arabinose, e hexoses, como glicose, manose e galactose, além de ácidos urônicos e grupos acetila com reatividade maior do que a celulose, altamente ramificada e apenas amorfa (FENGEL & WEGENER, 1989; LYND, 1996).

Os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar são utilizados para facilitar o acesso da celulose para processos biotecnológicos e eles podem ser classificados como físicos, químicos e biológicos. O pré-tratamento deve levar em consideração fatores chave para ser efetivo como não degradar os açúcares, produção mínima de compostos tóxicos, não produzir resíduos sólidos, obter alta concentração de açúcar, ser compatível com fermentação para produção de etanol, possibilitar a recuperação da lignina e utilizar o menor aquecimento e energia (ANWAR et al, 2014; KARP et al, 2013; ALVIRA et al, 2010).

O pré-tratamento mecânico pode-se salientar a trituração mecânica que consiste em reduzir o tamanho do bagaço de cana-de-açúcar a fim de aumentar a superfície, contudo, é um processo que depende de grandes quantidades de energia para o processamento do bagaço

e normalmente é associado a outros métodos de pré-tratamento, pois não fornecer quantidades significativas de açúcar liberado (ANWAR et al, 2014; KARP et al, 2013; ALVIRA et al, 2010).

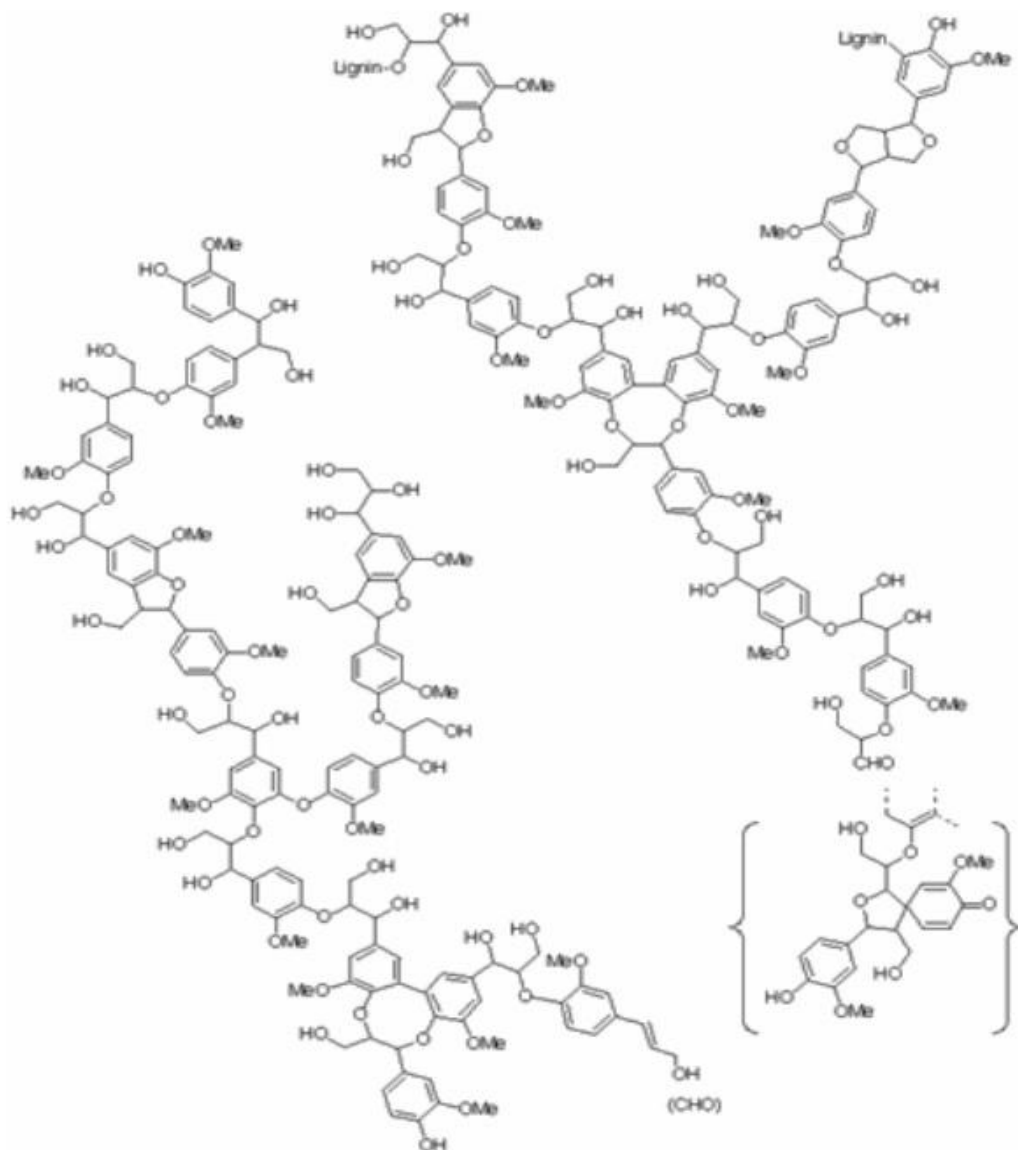


Figura 2. Modelo de estrutura de lignina presente nas coníferas (BROWNING, 1963).

O pré-tratamento ácido utiliza comumente o ácido sulfúrico, mas também o clorídrico e nítrico, combinado com uma temperatura moderada, podendo ser concentrado ou diluído, variando de 100 a 150°C, que degrada a hemicelulose solubilizando-a totalmente enquanto que a celulose e lignina permanecem praticamente inalteradas no material sólido. A fração

líquida possui componentes da degradação da hemicelulose e é rica em açúcares e produtos da degradação dos polissacarídeos e monômeros, como oligopolímeros, furfural e hidroximetilfurfural, sendo esses dois últimos fortes inibidores de crescimento microbiano. Alternativas aos ácidos comumente usados são os ácidos orgânicos como o ácido fumárico e malico que tem seu efeito comparado com o ácido sulfúrico em quesito de rendimento da hidrólise e produzem menor quantidade de hidroximetilfurfural e furfural (CARDONA et al, 2010; SOCCOL et al, 2010).

O pré-tratamento alcalino degrada a lignina em um álcali solúvel, tornando a celulose e hemicelulose disponíveis à degradação enzimática, dentre as bases utilizadas tem-se o hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio, sendo que o hidróxido de sódio aumenta a superfície da celulose e diminui também a cristalização que causa a quebra da lignina. Este processo é amplamente utilizado na obtenção de polpa de celulose e de derivados de celulose, que necessita de grandes quantidades de álcali e de elevadas temperaturas. Apesar de utilizar um tratamento térmico geralmente no binômio de 170°C/ 2 horas como ótimo para a degradação de hemicelulose, que é superior a temperatura de 150°C e produz menor degradação dos monômeros que a temperatura de 190°C, o processo pode ser realizado a temperatura ambiente o que pode levar até dias mas possui efeito positivo na menor degradação de açúcares. Contudo, este processo apenas extrai a hemicelulose e há presença de polímeros de cadeia longa, assim o tratamento térmico é utilizado combinado a outros tratamentos (CARDONA et al, 2010; SOCCOL et al, 2010).

Há outros pré-tratamentos que são utilizados como a explosão a vapor (*steam explosion*) que combina o método físico e químico, no qual o bagaço de cana-de-açúcar é pressurizado com vapor contendo sulfito alcalino e subitamente despressurizado. Neste processo, a água permeada no interior do bagaço de cana-de-açúcar na forma de vapor quando despressurizada para ao estado líquido rompendo as células e parede celulares e combinado com o sulfito

alcalino há a hidrosolubilização da hemicelulose (ANWAR et al, 2014; KARP et al, 2013; ALVIRA et al, 2010).

O pré-tratamento biológico consiste no uso de microrganismo para degradar os componentes da biomassa. Dentre esses microrganismos os *Basidiomycetes* são os fungos mais capazes de degradar materiais lignocelulósicos pela presença de enzimas específicas para oxidar a lignina. Outras opções cogitadas e utilizadas após um tratamento de retirada de lignina são os fungos *Ascomycetes* como os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (CARDONA et al, 2010; SOCCOL et al, 2010).

Comparando os métodos de pré-tratamento pode-se observar que o pré-tratamento biológico é capaz lignina e hemicelulose, possui baixo consumo de energia contudo a taxa de hidrólise é baixa. O pré-tratamento físico que diminui a cristalinidade da celulose, mas necessita de muita potência e consumo de energia. O pré-tratamento com ácidos pode ser dividido em concentrado e diluído. O ácido concentrado tem maior rendimento de glicose, pode ser feito em temperatura ambiente, mas como desvantagem há o alto custo do ácido e que necessita de recuperação, problema de corrosão do reator e a formação de inibidores. O pré-tratamento com ácido diluído possui menor problema de corrosão do que o ácido concentrado e forma menos inibidores porém há geração de produtos de degradação e menor concentração de açúcar no final. Por fim, o pré-tratamento alcalino possui um alto aumento da superfície acessível, altera eficientemente a estrutura da lignina e pouca geração de compostos tóxicos, todavia possui baixa solubilização da hemicelulose (ANWAR et al, 2014; KARP et al, 2013; ALVIRA et al, 2010).

A produção de enzimas com capacidade celulolítica é de grande importância, contudo o custo de produção do *pull* de enzimas tem um custo elevado e significativo para a utilização das mesmas, tornando baixa a viabilidade econômica dos processos biodegradativos. Uma forma de contornar o alto custo das enzimas comerciais é a produção por microrganismos

com custos mais baixos de produção, como os fungos filamentosos, através da seleção de melhores produtores, utilizando resíduos e matérias primas brutas e melhorias de técnicas de cultivos que aumentem a produção sem aumentar o custo (PIROTA et al, 2014; DELABONA et al, 2012; JOUDIER et al, 2012).

Dessa forma, após a etapa de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, é necessário a etapa de produção das enzimas celulolíticas ou o uso das enzimas comercial, a uso das enzimas no processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e por fim, o possível uso dos monômeros de glicose resultantes em fermentações etanólicas, sendo este ultimo passo ainda em processos de pesquisa para aplicação em larga escala. A etapa limitante é a produção de enzimas celulolíticas com alto poder de hidrólise a baixo custo além da necessidade de concentrar a glicose gerada através da biodegradação a uma porcentagem que favoreça a inoculação de levedura, como *Sacharomyces cerevisae*, para a fermentação alcoólica (RABELO et al, 2014; MESA et al, 2010).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi avaliar cepas de fungos filamentosos quanto à sua produção e atividade de complexos enzimáticos celulolíticos. Faz parte do objetivo a aplicação das enzimas visando à produção de etanol de segunda geração.

3.1. Objetivos Específicos

- Determinação de melhores meios de cultivo para produção de enzimas celulolíticas.
- Determinação de parâmetros bioquímicos enzimáticos.
- Seleção do melhor meio de cultura e melhor fungo produtor de enzimas celulolíticas
- Purificação parcial das enzimas do melhor fungo produtor
- Análise eletroforética das enzimas

- Aplicação das enzimas parcialmente purificadas em biodegradação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com sulfito-alcálico

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Acetona PA – Synth
- Ácido Cítrico – Neon
- Ácido Dinitrossalicílico (DNS) - Vetec
- Agar Bacteriológico - BD
- Carboximetil Celulose – Synth
- Celulose Microcristalina Avicell®
- Celulose Microcristalina USP – Synth
- Citrato de Sódio - Neon
- Cloreto de Cálcio – Vetec
- Cloreto de Cobalto – Synth
- Cloreto de Potássio – JT Baker
- Corante Congo Red – Neon
- Corn Streep Solids - Sigma
- Erlenmeyers
- Etanol PA – Synth
- Extrato de Levedura – Himeda
- Extrato de Malte Agar – Acumedia
- Fenol - Synth
- Filtro de Papel Whatman #1

- Fosfato de Potássio Dibásico Anidro PA - Qhemis
- Glicose – Synth
- Hidróxido de Sódio – Synth
- Metabissulfito de Sódio - Synth
- Peptona - Merck
- Potato Dextrose Ágar – Synth
- Potato Dextrose Broth - Acumedia
- *p*-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo – Sigma
- Pipetadores volumétricos
- Ponteiras de 5000 μ L, 1000 μ L e 200 μ L
- Potato Dextrose Agar (PDA) – Merck
- Reagente de Bradford - Sigma
- Sulfato de Amônio - Synth
- Sulfato Férrico - Synth
- Sulfato de Magnésio – Sigma
- Sulfato de Manganês – Sigma
- Sulfato de Zingo – Synth
- Tartarato de Sódio e Potássio - Synth
- Tris-HCl – JT Baker
- Ureia – GE Healthcare
- YNB (Base Nitrogenada de Levedura) - Sigma

4.2. Equipamentos

- Amersham ECL Gel Box – GE HEALTHCARE

- Autoclave Vertical FABBE 103
- Autoclave Vertical PRISMATEC C5
- Balança Analítica – Metter Toledo AB204
- Balança Semi Analítica
- Banho de Aquecimento FANEM 1101
- Banho de Aquecimento tipo DUBNOFF-QUIMIS Q226M1
- Banho de Fervura – FISATOM 550
- Bomba de Vácuo – Primatec 132
- Câmara de Fluxo Laminar – Veco (VLFS 12)
- Centrífuga Refrigerada – Eppendorf 5804R
- Espectrofotômetro UV-Visível – Bel Photonic (UV-M51)
- Estufa Microrganismo – FABRE 116
- Estufa de Secagem e Esterilização – Odontobras
- Incubadora Refrigerada com Agitação – Tecnal TE422
- Incubadora Refrigerada com Agitação – SOLAB SI222
- Microscópio Óptico – Olympus CX41
- Microscópio Óptico – ZEISS Prismo Star
- Ultrapurificador de água MiliQ – Millipore (Direct Q3)

4.3. Métodos

4.3.1. Microrganismos e Manutenção

O material utilizado foram cepas fúngicas isoladas pela Prof.^a Dra. Suraia Said da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e Prof.^a Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e que atualmente fazem parte do cepário do

Laboratório BiotecFar – FCF/UNESP. As cepas avaliadas foram: *Penicillium simplicissimum* (CCT 7686), *Aspergillus niger* (CCT 7687), *Aspergillus terreus* (CCT 7693), *Aspergillus sp* (CCT 7697), *Trichoderma reesei* QM9414 e *Trichoderma reesei* RUTC30.

A manutenção das cepas fúngicas foi realizada com meio PDA (Potato Dextrose Agar – Ágar Batata Glicose) 15 dias com repiques periódicos.

4.3.2. Meios de Cultura

4.3.2.1. Meios de cultura para a metodologia de coloração por Vermelho Congo

O meio de cultura para esta metodologia é composto por sais e apenas o CMC como fonte de carbono. (NaNO_3 : 3,0 g.L⁻¹; KH_2PO_4 : 1,0 g.L⁻¹; MgSO_4 : 0,5 g.L⁻¹; KCl : 0,5 g.L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10,0 mg.L⁻¹; CMC: 10,0 g.L⁻¹; ágar: 20,0 g.L⁻¹). Os inóculos dos microrganismos são executados através de agulhas na placa de Petri e as mesmas serão incubadas a 28°C por 4 dias. Após o período, uma solução de Vermelho Congo 2,5 g.L⁻¹ em tampão Tris-HCl (0,1 Mol.L⁻¹, pH 8,0) durante 30 minutos. A solução de Vermelho Congo é descartada após o período e então a placa é lavada com solução de 0,5 Mol.L⁻¹ em Tampão Tris-HCl (0,1 Mol.L⁻¹, pH 8,0). A degradação do CMC presente no meio é avaliada através do halo claro formado. A metodologia foi adaptada de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003).

4.3.2.2 Meios de cultura para produção de celulasas por fungos filamentosos

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de todos os fungos filamentosos citados estão listados na Tabela 1.

O inóculo do meio de produção foi de $1,0 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹ contados em câmara de Newbauer, pois a literatura utiliza quantidades de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^8$ esporos. mL⁻¹.

Tabela 1. Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção das enzimas celulolíticas para os fungos filamentosos

Composição	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D
Celulose (g.L ⁻¹)	10,0	-	7,5	-
Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	10,0	-	0,3	-
Glicose (g.L ⁻¹)	10,0	10,0	-	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	1,4	1,4	1,4	-
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	2,0	2,0	2,0	4,0
CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,4	0,5	0,3	-
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	-
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	5,0	5,0	5,0	-
CoCl ₂ . .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	3,7	-	20,0	-
MnSO ₄ .H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,6	1,6	1,6	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,4	1,4	1,4	-
Corn Steep Solids (g.L ⁻¹)	-	5,1	-	-
Peptona (g.L ⁻¹)	-	-	0,8	-
Ureia (g.L ⁻¹)	-	-	3,0	-
YNB (g.L ⁻¹)	-	-	-	6,7
CMC sódica (g.L ⁻¹)	-	-	-	20

Meios de cultura baseados em AHAMED e VERMETTE (2009).

4.3.3. Produção Enzimática em Agitador Orbital

A produção em agitador orbital consiste em Erlenmeyers contendo meio de cultura contido na Tabela 1 e os fungos filamentosos do item 4.3. Os cultivos foram realizados nos agitadores orbitais, a 30°C e 150 rpm por diferentes dias segundo a curva de crescimento realizada para cada fungo em cada meio.

4.3.4. Curva de produção Enzimática em Diferentes Meios

A fim de avaliar a máxima produção de cada fungo nos meios de cultura foram realizadas curvas de crescimento. Desta forma, foi possível observar quais os fungos se destacaram na produção de enzimas celulolíticas em função do tempo e dos meios, na tentativa de aperfeiçoar e aumentar a produção, o período de tempo foi de quinze dias.

4.3.5. Avaliação da Influência da Composição do Meio de Cultura na Produção Enzimática

A fim de avaliar a influência da composição do meio de cultura A na atividade enzimática foi utilizado o modelo fatorial de Plackett & Burman, baseado na matriz de 16 experimentos, variando os onze componentes do meio de cultura em níveis padrões do meio A e inferiores. Na Tabela 2 está listada a proposta de modelo com os componentes das variáveis e os valores de 1 e -1 e na Tabela 3 a disposição das variáveis na matriz.

Tabela 2. Composição do Meio A e as variáveis em Plackett & Burman

Componente	Variável	1	-1
Celulose (g/L)	x1	10,0	5,0
Ext. Levedura (g/L)	x2	10,0	5,0
Glicose (g/L)	x3	10,0	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	x4	1,4	0,0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	x5	2,0	0,0
CaCl ₂ .H ₂ O (g/L)	x6	0,4	0,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	x7	0,3	0,0
FeSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	x8	5,0	0,0
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg/L)	x9	3,7	0,0
MnSO ₄ .H ₂ O (mg/L)	x10	1,6	0,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	x11	1,4	0,0

A variável x12 e os parâmetros V11, V12, V13 foram utilizados para o calculo T calculado. Para cada ensaio, de 1 a 16, foram realizadas as dosagens de β -Glicosidase, Endoglucanase, Exoglucanase, FPase e Proteínas Totais no extrato enzimático bruto de cada ensaio para o cálculo da atividade específica para cada enzima.

Para os cálculos, uma coluna com todos os sinais positivos é adicionada, chamada de coluna identidade antes da coluna da variável x1 para determinação da media global. Uma linha de Soma + e uma linha de Soma -, foram utilizadas para checar a soma dos valores positivos e negativos que devem ser iguais à soma da coluna identidade.

Tabela 3. Disposição da combinação fatorial no modelo de Plackett & Burman de 16 ensaios

Ensaio	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12	VI1	VI2	VI3
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Foi calculada a diferença entre a Soma + e Soma- e através desta diferença realizou-se o cálculo do efeito das variáveis. O efeito das variáveis é a divisão entre a diferença da Soma+ e Soma – pelo número de ensaio na condição + ou -. O delineamento de Plackett & Burman utilizado foi de 16 ensaios, portanto, as condições + e – estavam em número idêntico, 8. O valor de t é calculado pela razão do efeito pelo erro padrão, sendo o erro padrão calculado através da equação 1:

$$ep = (ep(ef) \cdot n^{\frac{1}{2}}) / 2 \quad \text{Equação 1}$$

Onde ep(ef) é uma equação a parte, calculada pela equação 2:

$$ep(ef) = \{[(U1)^2 + (U2)^2 + (U3)^2 + \dots + (Uq)^2] / q\}^{1/2} \quad \text{Equação 2}$$

No qual o cálculo de ep(ef) é uma somatória das variáveis não utilizadas através da equação 3:

$$U_i = (\sum VI_i \times Y) / n \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

U = Somatória da multiplicação entre as colunas inertes e a atividade enzimática obtida no ensaio, dividida pelo número de ensaios realizados.

VI = variáveis inertes (Colunas da matriz PB não utilizadas como variáveis do estudo)

Y = Valores da coluna de atividade enzimática correspondente a cada ensaio.

q = número de variáveis inertes

n = número de ensaios

4.3.6. Recuperação das Enzimas Produzidas (EEB – Extrato Enzimático Bruto)

Após a incubação, o extrato contendo o meio de cultura e a biomassa foi filtrado a vácuo utilizando funil de Buchner contendo papel de filtro. O filtrado foi armazenado a -20°C para análises.

4.3.7. Determinação de Atividade Enzimática

4.3.7.1. Determinação de Celulase Total (FPase)

A atividade enzimática de FPase (Filter Paper Activity ou Atividade de Papel de Filtro) foi determinada com tiras de aproximadamente $1,0 \times 8,0$ cm (70 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-incubados a 50°C , contendo 1,0 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 5,0) e 1,0 mL do EEB. A hidrólise foi interrompida após 1h de incubação com a adição de 2,0 mL de DNS (Ácido dinitrosalicílico) e alíquotas de 1 ou 2 mL foram coletadas para a análise em espectrofotômetro a 540nm (WOOD & BHAT, 1988; MILLER, 1959).

A concentração de açúcar redutor total foi determinada através de uma curva de calibração utilizando D-glicose como padrão em diferentes concentrações conhecidas. A atividade, calculada pela equação 4 descrita abaixo, onde ϵ é a absortividade molar retirada da

curva de calibração, cuja unidade é $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})^{-1}$, ou seja, a quantidade de μmol de glicose por mL de água absorve em 540 nm. Sendo a equação 4:

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\text{absorbância}_{540\text{nm}} \times \text{volume do ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo}_{\text{minuto}} \times \text{volume da amostra}} \quad \text{Equação 4}$$

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade mínima de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto, por mL de reação, considerada com o UI (Unidades Internacionais).

4.3.7.2. Determinação de atividade de Endoglucanase

A atividade da endoglucanase foi determinada através de soluções de carboximetil celulose (CMC) (MANDELS et al., 1976). Dessa forma alíquotas das amostras de 1,0 mL de EEB serão incubadas a 50°C e a reação se dará pela adição de 0,5 mL de uma solução de CMC de viscosidade média (2% em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0). A reação foi interrompida após 30 minutos pela adição de 2,0mL da solução de DNS como descrito anteriormente. Para a concentração de glicose convertida foi determinada através de curva de calibração com padrão de D-glicose. (MILLER, 1959).

A concentração de açúcar redutor total foi determinada da mesma forma apresentada para a atividade de Celulase Total. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade mínima de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto, por mL de reação.

4.3.7.3. Determinação de atividade de Exoglucanase

Utilizou-se a metodologia de Deshpande ET AL (1984) incubando 250 μL do EEB com 500 μL de solução 1% (p/v) de celulose microcristalina tipo 50 Avicell® , em solução tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 5,0) a 50°C durante 2 horas. Para paralisar a reação,

os tubos foram adicionados de 2 mL de DNS e colocados em água fervente por 5 minutos, e após resfriamento, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos à 12000g. A concentração de açúcar foi realizada mediante a adição de DNS nas mesmas condições para Celulase total e a mesma equação utilizada (MILLER, 1959).

A concentração de açúcar redutor total foi determinada da mesma forma apresentada para a atividade de Celulase Total. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade mínima de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto, por mL de reação.

4.3.7.4. Determinação de atividade de β -glicosidase

Para determinar a atividade de β -glicosidase, segundo Wood & Bhat (1988) adicionou-se 0,25mL de extrato enzimático bruto (EEB) a tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL de uma solução de tampão citrato (50 mmol, pH 5,0). O meio foi incubado a 42°C, em seguida adicionou-se 0,25 mL da solução 4,0 mmol/L de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo em tampão citrato. Após 10 minutos, adicionou-se 1,0 mL de solução 1,0 mol/L carbonato de sódio, para interromper a reação por deslocar o pH para o meio básico, enzimas não atuam neste pH e p-nitrofenol possui coloração amarela. A concentração de glicose produzida pela atividade enzimática foi determinada indiretamente pela medida da concentração de p-nitrofenol no meio reacional, por leitura em espectrofotômetro a 410nm. A curva de calibração foi construída com soluções padrões de p-nitrofenol. A atividade, calculada pela equação 5, onde ϵ é a absortividade molar retirada da curva de calibração, cuja unidade é $(\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1})^{-1}$, ou seja, a quantidade de nmol de glicose por mL de água absorve em 410 nm, no qual ϵ utilizado foi de 0,079. Sendo a equação 5:

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\text{absorbância}_{410\text{nm}} \times \text{volume do ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo}_{\text{minuto}} \times \text{volume da amostra}} \quad \text{Equação 5}$$

Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de *p*-nitrofenol por mL, por minuto de reação considerada com o UI (Unidades Internacionais).

4.3.8. Parâmetros Bioquímicos Enzimáticos

Os fungos cuja atividade foram diferenciadas ao analisar as curvas de crescimento foram incubados e então avaliados quanto a sua estabilidade frente ao pH e Temperatura. A atividade residual foi obtida através da equação 6, na qual *AE contato* é a Atividade Enzimática calculada após contato com o pH e temperatura no determinado tempo e *AE sem contato* é a Atividade Enzimática calculada sem o contato com o pH e temperatura. Sendo a equação 6:

$$\% \text{ Atividade Residual} = \frac{100\% \times AE \text{ contato}}{AE \text{ sem contato}} \quad \text{Equação 6}$$

4.3.8.1. Estabilidade quanto à temperatura

Após a recuperação do EEB as enzimas foram avaliadas em relação à estabilidade de Endoglucanase, Exoglucanase, FPase e β -Glicosidase em diferentes temperaturas, sendo estas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C por períodos de tempo de 0; 0,17; 0,5; 1, 2, 3, 4 e 5 horas de incubação.

4.3.8.2. Estabilidade quanto ao pH

Após a recuperação do EEB as enzimas foram avaliadas em relação à estabilidade de Endoglucanase, Exoglucanase, FPase e β -Glicosidase em diferentes pHs, sendo estes de 3, 4, 5, 6, 7 e 8 por períodos de tempo de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas de incubação.

4.3.9. Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas totais foi feita com base no método de Bradford (1976) que utiliza uma curva padrão de Soro Albumina Bovina. Foi realizado através da adição de uma alíquota do extrato enzimático bruto de 200µL com 200 µL do reagente de Bradford e completado para 1mL com Água MilliQ.

4.3.10. Perfil de Atividade Enzimática por tempo de incubação

A atividade das enzimas celulolíticas foi avaliada conforme o tempo para determinar o seu perfil de atividade. A β -Glicosidase foi avaliada no período de 0; 2,5; 5; 10; 20; 25; 30; a endoglucanase no período de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60; a exoglucanase no período de 0, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180; e por fim, a FPAse no período 0, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 90, 120.

4.3.11. Purificação Parcial das Enzimas

4.3.11.1. Precipitação por Sulfato de Amônio e Diálise

As proteínas do meio de cultura contidas no extrato enzimático bruto foram precipitadas com a adição de sulfato de amônio na concentração final de 75%. O sulfato de amônio foi adicionado aos poucos sob agitação e em banho de gelo. Após, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 7000 rpm e o sobrenadante descartado.

O precipitado obtido a partir da precipitação por sulfato de amônio foi resuspenso em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e dialisado em sacos de diálise de celulose para retirar o sulfato de amônio. Como as enzimas são celulolíticas, a diálise foi realizada através de um fracionamento de duas horas, com troca da água e da membrana de diálise, mantida em temperatura variando de 4 a 10°C. Para recuperar todas as enzimas que poderiam estar aderidas as membranas, as mesmas foram maceradas em tampão citrato de sódio 50 mM e analisadas quanto às atividades enzimáticas.

4.3.11.2. Precipitação por Etanol

As enzimas produzidas e contidas no extrato enzimático bruto foram precipitadas através da adição de etanol gelado na proporção 1:3, ou seja, uma parte de extrato enzimático para três partes de etanol gelado. Após a agitação em vortex e repouso por 30 minutos, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 700 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet de proteína foi resuspendido no menor volume de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e posteriormente analisado quando à atividade enzimática.

4.3.11.3. Precipitação por Acetona

As enzimas produzidas e contidas no extrato enzimático bruto foram precipitadas através da adição de acetona gelada na proporção 1:4, ou seja, uma parte de extrato enzimático para quatro partes de acetona gelado. Após a agitação em vortex e repouso por 60 minutos, e foram mantidos no freezer a -20°C por 60 minutos. A mistura foi centrifugada por 20 minutos a 7000 rpm, o sobrenadante descartado e a acetona evaporada a temperatura ambiente em capela. O pellet de proteína foi resuspendido no menor volume de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e posteriormente analisado quando à atividade enzimática.

4.3.12. Eletroforese

A partir da enzima parcialmente purificada pelo melhor método, uma análise eletroforética foi realizada em gel desnaturando (com SDS – Dodesilsulfato de sódio). O tampão de corrida foi preparado diluindo o tampão 10x da Amersham ECL Gel para a concentração de 1x e este tampão foi adicionado a cada tanque do Amersham ECL Gel Box. O gel, obtido já preparado pela Amersham foi lavado com água MilliQ e adicionado no ECL Gel Box com o lado dos poços junto ao anodo, foi realizado uma pré-corrida por 12 minutos a 160V.

Adicionou-se 6 mL de tampão de corrida no recipiente dos poços e as amostras foram preparadas adicionando o tampão de amostra: glicerol (1,0 mL), solução tampão 1x (0,5 mL), azul de bromofenol (0,5 mg) e água MilliQ para 5,0 mL de volume final. A aplicação das amostras foi realizada em cada poço de forma a não exceder 35µL em cada poço e aos poços não utilizados foram adicionados o tampão de corrida para não ocorrer ressecamento do gel sendo então foi realizada a corrida em 160V. Ao término da corrida, as porções dos poços e da parte inferior, cerca de 2 cm, foram removidos e então foi realizada a coloração com Comassie Blue constituído de Comassie Blue (0,3% v/v), metanol (50% v/v), ácido acético (10% v/v) e água *qsp* 1L e para visualização das bandas foi utilizado uma solução descolorante constituída de metanol (30% v/v), ácido acético (7% v/v) e água MilliQ *qsp* 1L.

4.3.13. Pré-Tratamento do Bagaço de Cana

O bagaço de cana foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Masarin do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, que utilizou o processo alcalino como pré-tratamento. Aproximadamente 50g de bagaço (dados em base seca) foram pesados, em Becker de polipropileno de 1L e posteriormente adicionado em um reator de 1,5 L. Foram adicionados 250 mL de uma solução de NaOH 1% (massa/volume) e 250 mL de uma solução de sulfito alcalino (Na_2SO_4) a 2% (m/v), onde nesta condição a relação mássica é de 5g de NaOH e 10g de Na_2SO_4 para cada 100g de bagaço de cana em base seca, com consistência igual a 10%.

Os reatores foram fechados e com a temperatura selecionada de 140°C e agitação de 4 rpm. Quando a temperatura do reator atingiu os 140°C desejados, o tempo de 30 minutos foi cronometrado e após esse tempo, o equipamento foi desligado. As válvulas foram abertas para saída de vapor até o resfriamento completo do reator. Após, o material foi lavado com água

destilada e o processo de lavagem foi interrompido quando o pH da água de lavagem atingiu a neutralidade. O material foi recolhido e seco em estufa a 40°C por 24 horas.

4.3.14. Análise de composição de Bagaço de Cana *in natura* e pré-tratado pós hidrólise enzimática

Uma análise prévia do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado foi realizada pelo Prof. Dr. Fernando Masarin do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia e pelo aluno de mestrado Fernando Paz do Programa de Alimentos e Nutrição, afim de analisar a composição de carboidratos e lignina.

Porções de 300mg de base seca das amostras foram tratadas com 3mL de ácido sulfúrico 72% (massa/massa) por 1 hora a 30°C. Em seguida, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para frascos de erlenmeyer de 250 mL com adição de 79 mL de água destilada para lavagem do tubo. A mistura foi autoclavada por 1 hora, 121 °C, resfriada e filtrada em filtros de vidro. O material retido foi lavado com duas porções de 5 mL de água e seco em estufa, 60°C por 12 horas, posteriormente, o material foi seco a 105°C por 2 horas, resfriado em dessecador munido de sílica e pesado, sendo este material referente aos aromáticos insolúveis.

A detecção dos açúcares monoméricos foi utilizada uma pequena alíquota do filtrado que foi passada através de membranas de 0,45µm e na sequencia, passado através de cartuchos do tipo SEP-PACL C₁₈ e injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica utilizou uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87, com ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como eluente a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C. Nesta coluna foram detectados e quantificados glicose e xilose. Os experimentos foram realizados em triplicata e para quantificação foi elaborada uma curva de calibração com padrões autênticos de glicose e xilose (Sigma), ou

seja, valores conhecidos de concentrações de glicose e xilose passadas pela mesma coluna. A massa total de glicose foi multiplicada pelo fator de hidrólise de glicose para glucana (0,9) e o resultado foi considerado como massa de glucana na amostra. Este fator de conversão é o desconto da inserção de uma molécula de água na quebra da celulose.

4.3.15. Hidrolise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar

O teste de biodegradação utilizou bagaço de cana *in natura*, seco e moído apenas, e bagaço pré-tratado com sulfito-alcalino como descrito no item 4.3.13. Aproximadamente 200mg de bagaço de cana foram pesados, em base seca, em tubos tipo falcons de 50 mL e 8,3 mL de tampão acetato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ foram adicionados. Foram pesados 200 mg de bagaço de cana, *in natura* e tratado com sulfito alcalino, descontando a umidade do bagaço de cana, sendo 13,93% e 11,45% respectivamente.

O complexo enzimático foi adicionado a uma concentração de $2,0 \text{ UI.mg proteína}^{-1}$ da FPAse (Atividade Celulolítica total), sendo que para atingir a concentração das enzimas foram necessários 1,7 mL das enzimas purificadas por acetona. Adicionalmente, foi realizado o teste com os mesmos substratos com a enzima comercial Celic Cetec 2 (Novozymes), que possui $89 \text{ UI.mg proteína}^{-1}$ da FPAse, que foi adicionado apenas 0,224 mL do extrato diluído 10 vezes, como comparação do potencial do extrato enzimático produzido e purificado dos por *A. terreus* com enzima comercial.

Os falcons foram incubados em agitador orbital, a 45°C , 120 rpm por 72 horas. Aliquotas de 0,5 mL foram retiradas nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas recolhidas em eppendorfs e fervidas por 10 minutos para a inativação das enzimas e armazenadas até a -20°C até a análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Controles abióticos foram realizados adicionando apenas o bagaço, *in natura* e pré-tratado, e o tampão, para

observar e se necessário descontar se o processo não libera glicose. Ainda foram realizados controles das enzimas purificadas de *A. terreus* para verificar se não há glicose contaminante.

O cálculo da quantidade de glicose foi realizado através da integração da área dos picos de glicose e convertida em concentração de glicose através de uma curva de calibração realizada através de valores conhecidos de soluções de glicose e a área correspondente. A concentração de glicose foi descontada a concentração de glicose presente na solução enzimática, tanto a de *A. terreus* quanto a da Cellic Cetec2, quanto os controles abióticos que foram realizados da mesma forma que a hidrólise apenas excluindo a adição de enzimas a fim de descontar possíveis glicoses que poderiam ser liberadas do bagaço de cana pelo tempo e temperatura empregados na hidrólise. A taxa de conversão de celulose a glicose foi realizada utilizando a porcentagem de celulose calculada nos bagaços em relação à polpa básica, sendo 34,6% para *in natura* e 52,7% para o bagaço tratado com sulfito-alcálico. Dessa forma, das 200mg de bagaço pesado 69,2mg e 105,4mg correspondem a celulose passível de hidrolisar, respectivamente.

4.3.16. Análise da Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana *in natura* e pré-tratado

Os sobrenadantes recolhidos dos tempos de coleta da hidrólise enzimática foram descongelados e analisados por CLAE nas mesmas condições do item 4.3.14. exceto que a coluna é a BIORAD AMINEX HPX-87H, com ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como eluente a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ a 85°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C. A partir dos dados de composição química e os fatores de hidrólise enzimática (0,9 para conversão da glicose) foram calculadas as porcentagens de conversão de glucanas em glicose e de galactanas em galactose. Para o cálculo, também foram previamente descontadas as massas de glicose e galactose presentes nos extratos enzimáticos utilizados em cada reação.

5. Resultados

5.1. Recuperação Fúngica e Técnica de Congo Red

Os microrganismos foram repicados em meio PDA como pode ser visualizado na Figura 3. As placas contendo o meio foram coradas com Vermelho Congo de acordo com a metodologia de Ruegger & Tauk-Tornisielo (2003) na Figura 4 e os halos de degradação. As placas contendo o meio com Vermelho Congo foram incubadas por mais tempo a 50°C e houve o aparecimento de halos claros devido ao rompimento da ligação entre o corante e as ligações β -1,4-glicopiranosil, como estudado por Theater & Wood (1982). O maior halo foi obtido para *T. reesei* QM9414 de 27,90mm, seguido de *P. simplicissimum* (25,45mm), *A. terreus* (17,33mm), *T. reesei* RUT C30, *Aspergillus sp* (11,65mm) e por fim, *A. niger* (3,37mm). Podemos notar que o maior halo foi obtido para o *T. reesei* QM9414 sendo 8,27 vezes maior que o menor halo obtido por *A. niger*.

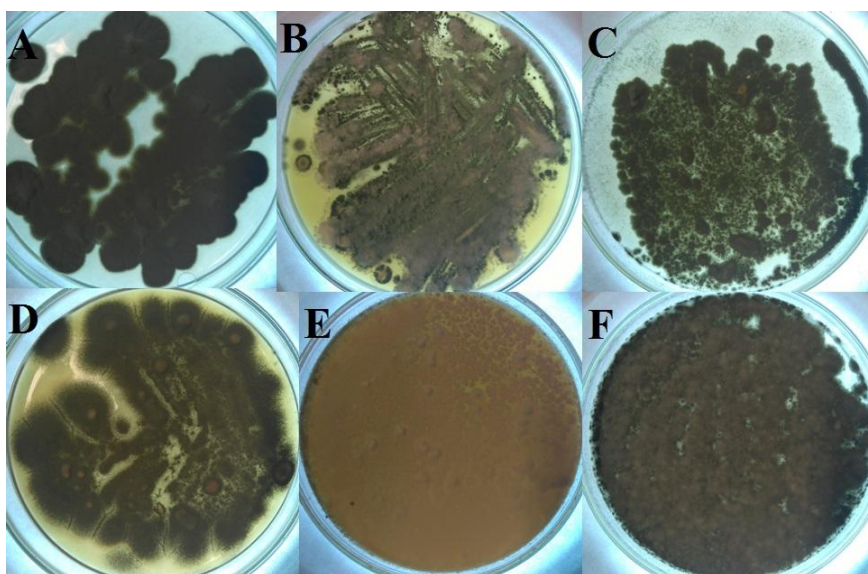


Figura 3. Fungos filamentosos celulolíticos em meio PDA. (A) *Aspergillus niger*, (B) *Trichoderma reesei* QM9414, (C) *Trichoderma reesei* RUTC30, (D) *Aspergillus sp*, (E) *Aspergillus terreus*, (F) *Penicillium simplicissimum* (arquivo próprio).

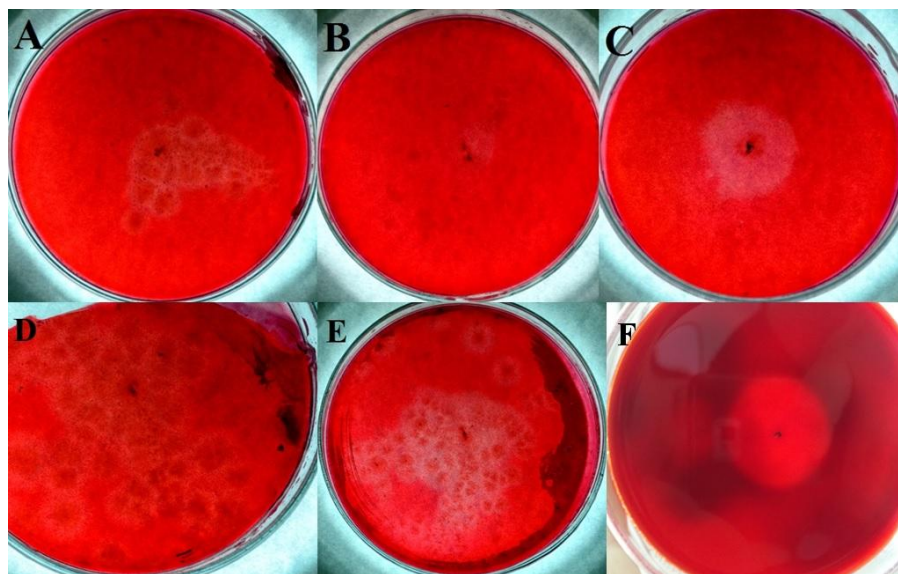


Figura 4. Crescimento de fungos filamentosos em meio com Congo Red. (A) *Aspergillus sp.*, (B) *Aspergillus niger*, (C) *Trichoderma reesei* RUTC30, (D) *Penicillium simplicissimum* e (E) *Trichoderma reesei* QM9414 e (F) *A. terreus* (arquivo próprio).

5.2. Perfil de Atividade Enzimática

5.2.1. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio A

Os fungos descritos no item 4.3. foram incubados no meio A por 15 dias. A cada dia eram coletadas amostras dos sobrenadantes para realizar uma curva de atividade enzimática para cada enzima do complexo enzimático e a atividade de celulase total. Os maiores valores de atividade enzimática específica estão demonstrados na Figura 5 e os valores completos dos quinze dias de cultivo estão no Anexo I, Tabela 1.

Pode-se notar que a β -Glicosidase apresentou níveis elevados para *A. terreus* no décimo dia. Os demais fungos mostraram menores níveis com máximas atividades em nove dias para *P. simplicissimum*, sete dias para *T. reesei* QM9414, quatro dias *T. reesei* RUTC30, quatro dias para *Aspergillus sp* e nove dias para *A. niger*.

P. simplicissimum obteve a maior atividade de endoglucanase no segundo dia. Para *T. reesei* QM9414 a maior atividade deu-se no sexto dia, seguida da atividade específica de *A. niger* no décimo segundo dia. Para o *A. terreus* foram obtidos dois picos de atividades máximas em sete e dez dias de incubação. Os fungos *T. reesei* RUT C30 e *Aspergillus sp*

forneceram os menores valores de atividade específica no décimo quarto e décimo primeiro dia, respectivamente.

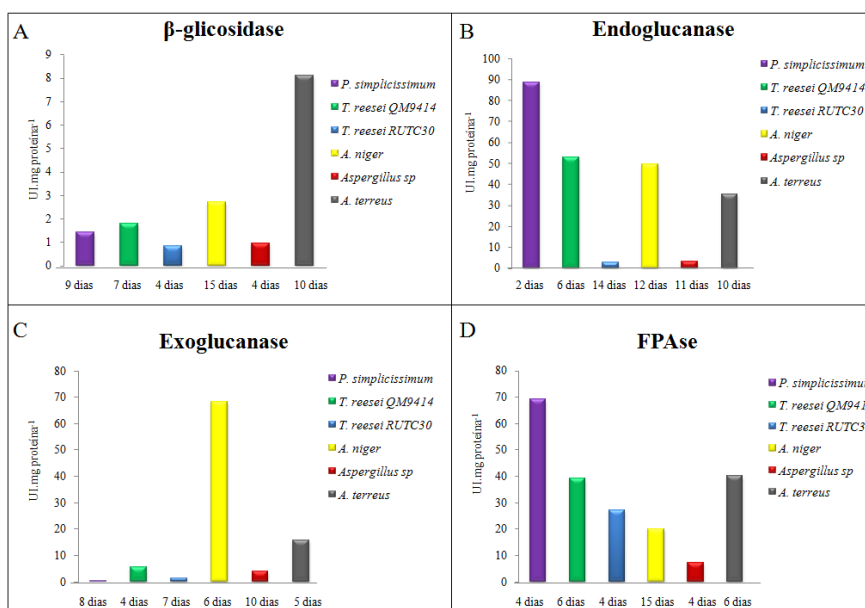


Figura 5. Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio A. Período de 15 dias de incubação. (A) β-Glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPase.

A maior atividade específica de exoglucanase foi obtida por *A. niger* em seis dias de incubação e os demais fungos atingiram valores baixos de atividade específica, sendo o *A. terreus* o segundo maior em cinco dias de incubação. A ação celulolítica total teve a maior atividade para *P. simplicissimum* com 4 dias de incubação, seguida de *A. terreus* e *T. reesei* QM9414 ambos com seis dias de incubação.

5.2.2. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio B

Os fungos descritos no item 4.3. foram incubados no meio B por 15 dias. A cada dia eram coletadas amostras dos sobrenadantes para realizar uma curva de atividade enzimática para cada enzima do complexo enzimático e a atividade de celulase total. Os maiores valores de atividade enzimática específica estão demonstrados na Figura 6 e os valores completos dos quinze dias de cultivo estão no Anexo I, Tabela 2.

Pode-se notar que a maior atividade de β-glicosidase foi obtida para a *A. niger* aos sete dias de cultivo, seguida de *A. terreus* aos doze dias. O *P. simplicissimum* apresentou pico de

produção enzimática aos dez dias, *T. reesei* QM9414 e *Aspergillus sp* aos oito dias, enquanto *T. reesei* RUT C30 aos sete dias, sendo deste os menores níveis.

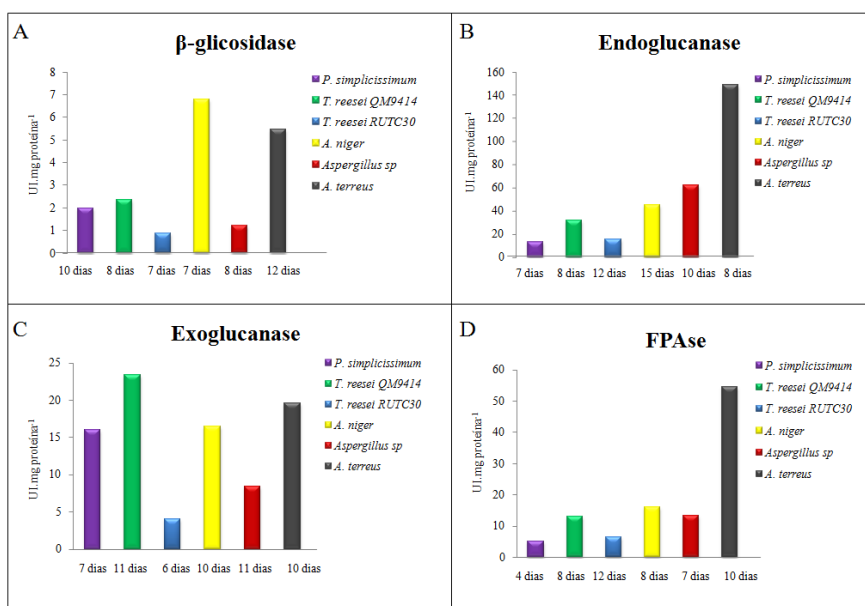


Figura 6. Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio B. Período de 15 dias de incubação. (A) β -Glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPAse.

A maior atividade específica de endoglucanase e FPAse foram observadas para *A. terreus* em oito e dez dias de incubação, respectivamente. Os demais fungos obtiveram atividades baixas comparadas a *A. terreus* nas duas enzimas. A exoglucanase teve a maior atividade específica para *T. reesei* QM9414 em onze dias de incubação seguida de *A. terreus* com dez dias, *A. niger* e *P. simplicissimum* com dez e sete dias respectivamente.

5.2.3. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio C

Os fungos descritos no item 4.3. foram incubados no meio C por 15 dias. A cada dia eram coletadas amostras dos sobrenadantes para realizar uma curva de atividade enzimática para cada enzima do complexo enzimático e a atividade de celulase total. Os maiores valores de atividade enzimática específica estão demonstrados na Figura 7 e os valores completos dos quinze dias de cultivo estão no Anexo I, Tabela 3.

Os maiores níveis enzimáticos ocorreram para β -glicosidase de *A. terreus* que apresentou pico de produção aos doze dias. Neste mesmo tempo foi notado a produção de β -

glicosidase para *Aspergillus* sp, *A. niger* e *T. reesei* RUT C30, enquanto *T. reesei* QM9414 teve sua maior produção aos sete dias e *P. simplicissimum* com onze dias.

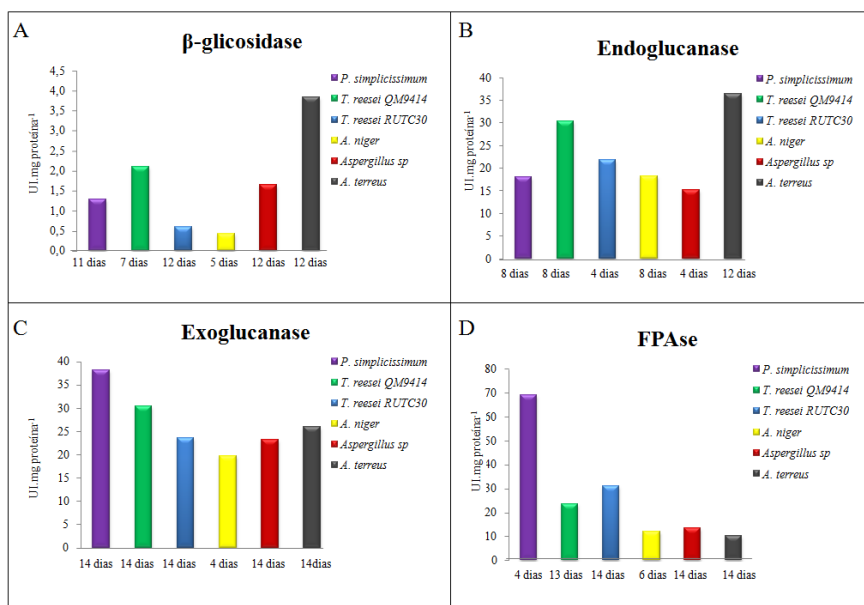


Figura 7. Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio B. Período de 15 dias de incubação. (A) β-Glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPase.

A endoglucanase mostrou os melhores níveis de atividade para *A. terreus* em doze dias de incubação, seguida de *T. reesei* QM 9414 em oito dias de incubação, sendo que os demais fungos apresentaram valores similares de atividade específica para endoglucanase. *P. simplicissimum* obteve a maior atividade para exoglucanase em meio C com catorze dias de incubação seguida do *T. reesei* QM9414 no mesmo período de tempo, que também foi o tempo necessário para o *T. reesei* RUTC30, *Aspergillus* sp e *A. terreus*, apenas diferindo para o *A. niger* com quatro dias de incubação. A atividade celulolítica total foi maior para o *P. simplicissimum* com quatro dias de incubação seguida de *T. reesei* RUTC30 em catorze dias e *T. reesei* QM9414 em treze dias, e os demais fungos com valores similares.

5.2.4. Perfil de Atividade Enzimática dos Fungos em Meio D

Os fungos descritos no item 4.3., foram incubados no meio D por 15 dias. A cada dia eram coletadas amostras dos sobrenadantes para realizar uma curva de atividade enzimática para cada enzima do complexo enzimático e a atividade de celulase total. Os maiores valores

de atividade enzimática específica estão demonstrados na Figura 8 e os valores completos dos quinze dias de cultivo estão no Anexo I, Tabela 4.

Pode-se notar que os melhores níveis enzimáticos ocorreram para a β -glicosidase de *T. reesei* RUTC30 com quinze dias de incubação, seguido de *T. reesei* QM9414 em onze dias de incubação e *A. terreus* com doze dias de incubação. Os demais fungos obtiveram valores similares para o *P. simplicissimum* em onze dias, *A. niger* em catorze dias e *Aspergillus sp* em treze dias.

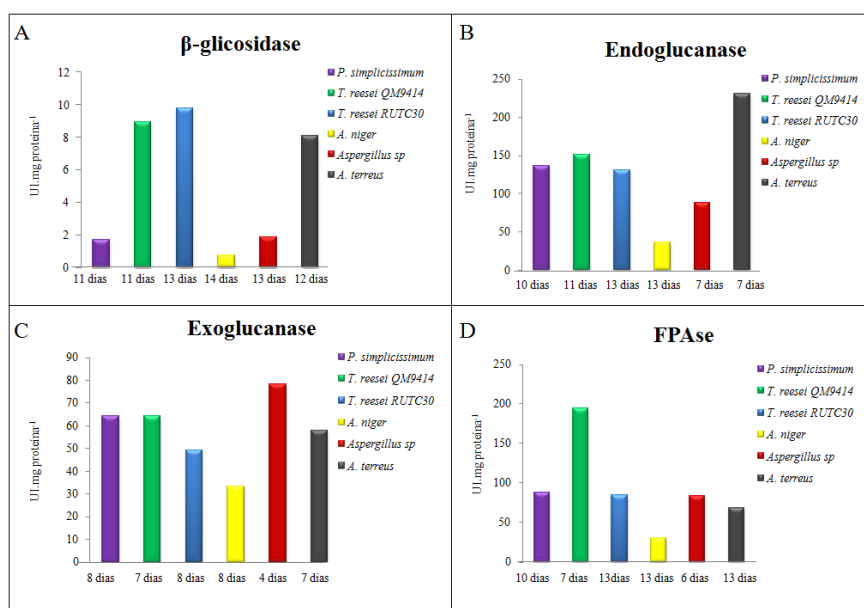


Figura 8. Curva de Atividade enzimática dos fungos filamentosos em Meio B. Período de 15 dias de incubação. (A) β -Glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPase.

A. terreus obteve a maior atividade para *A. terreus* em sete dias de incubação, seguido de *P. simplicissimum* com dez dias, *T. reesei* QM9414 com onze dias e *T. reesei* RUTC30 com treze dias e ambos com valores similares. Para a exoglucanase a maior atividade específica foi obtida para *Aspergillus sp* com quatro dias de incubação, seguido de *P. simplicissimum* em oito dias, *T. reesei* QM9414 em sete dias e *A. terreus* em sete dias. A menor atividade foi observada para *A. niger* com oito dias de incubação. A atividade celulolítica total foi observada para *T. reesei* QM9414 em sete dias de incubação, seguida de *P. simplicissimum* em dez dias de incubação, *T. reesei* RUTC30 em treze dias de incubação, *Aspergillus sp* em seis dias de incubação e *A. terreus* com treze dias. A menor atividade máxima foi observada para *A. niger* em treze dias de incubação.

5.3. Avaliação da Influência da Composição do Meio de Cultura A na Produção Enzimática

Os ensaios foram realizados pesando os meios de culturas individuais e o cultivo foi realizado no dia de maior produção da atividade enzimática para o *A. niger* no meio A, sendo dez dias de cultivo. Após o período de cultivo, o extrato enzimático bruto foi submetido aos ensaios de atividade enzimática, além de mensurada a quantidade de proteínas para o cálculo da atividade específica. A disposição das variáveis e do fatorial de 16 ensaios de Plackett & Burman estão descritas no item 4.3.5. e as atividades enzimáticas específicas estão dispostas na Tabela 4.

A partir da obtenção das atividades específicas foram realizadas as análises estatísticas do efeito descritas no item 4.3.5. e estão dispostas na Tabela 5. para β -glicosidase, Tabela 6. para endoglucanase, Tabela 7. para exoglucanase e Tabela 8. para FPAse.

Tabela 4. Fatorial de Plackett & Burman com 16 ensaios e atividade específica de β -glicosidase, endoglucanase, exoglucanase e FPAse

Ensaio	β -Glicosidase*	Endoglucanase*	Exoglucanase*	FPAse*	Proteína**
1	0,17008	0,08500	0,46560	0,33744	0,07824
2	0,00449	1,37142	1,36152	2,73625	0,03042
3	0,11875	0,78587	0,83048	2,81656	0,05424
4	1,63181	2,72199	1,25196	3,74319	0,03187
5	0,74455	0,88398	1,04976	0,91820	0,07660
6	0,78063	0,69570	0,53023	0,93888	0,08951
7	0,15496	0,44689	1,89247	1,27684	0,03315
8	12,47058	6,80491	11,11498	1,72826	0,00466
9	0,00869	0,92309	3,26201	3,60252	0,02915
10	0,08863	1,73570	0,97232	1,70755	0,06078
11	1,43302	0,00000	1,80570	2,65182	0,01733
12	0,67913	2,15610	0,73203	0,88020	0,05678
13	0,67553	2,69634	0,75974	2,52365	0,03442
14	0,55044	2,90509	0,96980	1,84642	0,03569
15	0,01579	0,72270	1,14103	0,32208	0,07696
16	0,01180	0,65729	2,34753	1,17767	0,05151

* $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

** mg de proteína

Tabela 5. Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para β -Glicosidase.

Componentes	Efeito	Erro Padrão	t-valor	p-valor	Confiança
Celulose	1,5237	2,5493	0,5633	0,6033	39,67
Ext. Levedura (g/L)	-1,5877	2,5493	0,5861	0,5893	41,07
Glicose (g/L)	2,0122	2,5493	0,7439	0,4983	50,17
(NH₄)₂SO₄ (g/L)	-1,0802	2,5493	0,3999	0,7100	29,00
KH₂PO₄ (g/L)	1,4987	2,5493	0,5540	0,6091	39,09
CaCl₂.H₂O (g/L)	1,5772	2,5493	0,5831	0,5911	28,97
MgSO₄.7H₂O (g/L)	1,0794	2,5493	0,3990	0,7103	28,97
FeSO₄.7H₂O (mg/L)	1,6800	2,5493	0,6215	0,5679	43,21
CoCl₂.6H₂O (mg/L)	-1,5226	2,5493	0,5629	0,6036	39,64
MnSO₄.H₂O (mg/L)	-1,4934	2,5493	0,5521	0,6103	38,97
ZnSO₄.7H₂O (mg/L)	-1,0889	2,5493	0,4026	0,7079	29,21

Observando a atividade enzimática específica pode-se inferir o efeito daquele componente na produção e atividade da enzima β -Glicosidase, sendo que a celulose, glicose, KH₂PO₄, CaCl₂.H₂O e FeSO₄.7H₂O obtiveram efeitos positivos para a enzima, enquanto que extrato de levedura, CoCl₂.6H₂O e MnSO₄.H₂O obtiveram efeitos negativos. O ensaio 8, obteve atividade enzimática específica de 12,47058 nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ e neste ensaio as variáveis com efeito positivos estavam em +1 e as negativas, -1.

Tabela 6. Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para Endoglucanase.

Componentes	Efeito	Erro Padrão	t-valor	p-valor	Confiança
Celulose	0,6870	1,0657	0,3723	0,7285	27,15
Ext. Levedura (g/L)	-0,3077	1,0657	0,1668	0,8757	12,43
Glicose (g/L)	0,9343	1,0657	0,5064	0,6392	36,08
(NH₄)₂SO₄ (g/L)	-1,0614	1,0657	0,5752	0,5959	40,41
KH₂PO₄ (g/L)	0,6771	1,0657	0,3670	0,7322	26,78
CaCl₂.H₂O (g/L)	0,7619	1,0657	0,4129	0,7001	29,99
MgSO₄.7H₂O (g/L)	0,9211	1,0657	0,4992	0,6238	37,62
FeSO₄.7H₂O (mg/L)	0,7234	1,0657	0,3921	0,7150	28,50
CoCl₂.6H₂O (mg/L)	-0,3839	1,0657	0,3707	0,7297	27,03
MnSO₄.H₂O (mg/L)	-0,6581	1,0657	0,3566	0,7394	26,06
ZnSO₄.7H₂O (mg/L)	-0,2497	1,0657	0,1353	0,8989	10,11

Os efeitos positivos na produção e atividade da enzima Endoglucanase foram observadas para Glicose e MgSO₄.7H₂O e os efeitos negativos foram observados apenas para

(NH₄)₂SO₄. O ensaio 8 forneceu a maior atividade enzimática específica 6,80491 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, sendo este o ensaio que as variáveis com efeito positivos estavam em +1 e as negativas, -1.

Tabela 7. Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para Exoglucanase.

Componentes	Efeito	Erro Padrão	t-valor	p-valor	Confiança
Celulose	1,0763	1,7589	0,3359	0,7538	24,62
Ext. Levedura (g/L)	-0,9658	1,7589	0,3014	0,7781	22,19
Glicose (g/L)	0,8204	1,7589	0,2560	0,8105	18,95
(NH₄)₂SO₄ (g/L)	-0,8946	1,7589	0,2792	0,7939	20,61
KH₂PO₄ (g/L)	0,5684	1,7589	0,1774	0,8678	13,22
CaCl₂·H₂O (g/L)	1,6132	1,7589	0,5035	0,6411	35,89
MgSO₄·7H₂O (g/L)	1,4179	1,7589	0,4425	0,6810	31,90
FeSO₄·7H₂O (mg/L)	1,3824	1,7589	0,4314	0,6884	31,16
CoCl₂·6H₂O (mg/L)	-1,1562	1,7589	0,3608	0,7364	26,36
MnSO₄·H₂O (mg/L)	-1,7776	1,7589	0,5548	0,6086	39,14
ZnSO₄·7H₂O (mg/L)	-1,6340	1,7589	0,5099	0,6369	36,31

Os efeitos positivos para a produção e atividade enzimática foram observados para CaCl₂·H₂O, MgSO₄·7H₂O e FeSO₄·7H₂O e os efeitos negativos para MnSO₄·H₂O e ZnSO₄·7H₂O. O ensaio 8 forneceu novamente a maior atividade específica para exoglucanase, 11,11498 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, sendo que o ensaio 8 no qual as variáveis com efeito positivos estavam +1 e as variáveis com efeito negativo, -1.

Tabela 8. Análise do efeito e de estatísticas dos componentes do fatorial de Plackett & Burman para FPase.

Componentes	Efeito	Erro Padrão	t-valor	p-valor	Confiança
Celulose	0,5449	0,1229	0,2285	0,8304	16,96
Ext. Levedura (g/L)	1,1802	0,1229	0,4949	0,6466	35,34
Glicose (g/L)	0,4368	0,1229	0,1831	0,8636	13,64
(NH₄)₂SO₄ (g/L)	-0,6775	0,1229	0,0283	0,9788	2,12
KH₂PO₄ (g/L)	-1,0732	0,1229	0,4500	0,6760	32,40
CaCl₂·H₂O (g/L)	0,6752	0,1229	0,2831	0,7911	20,89
MgSO₄·7H₂O (g/L)	-0,1058	0,1229	0,0444	0,9667	3,33
FeSO₄·7H₂O (mg/L)	0,5032	0,1229	0,2110	0,8432	15,68
CoCl₂·6H₂O (mg/L)	0,0192	0,1229	0,0080	0,9939	0,61
MnSO₄·H₂O (mg/L)	0,0067	0,1229	0,0028	0,9979	0,21
ZnSO₄·7H₂O (mg/L)	0,3680	0,1229	0,1543	0,8848	11,52

A FPAse forneceu os efeitos com menores valores positivos, sendo estes a celulose, extrato de levedura e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e efeito negativo apenas KH_2PO_4 . O ensaio 4 com atividade específica de $3,74319 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, no qual a celulose e extrato de levedura estavam +1 e o KH_2PO_4 estava -1, contudo o $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ estava -1, ou seja, ausente na composição. Outro ensaio que forneceu uma atividade e produção elevado foi o 9, $3,60252 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, nas mesmas condições para a celulose e extrato de levedura +1 e KH_2PO_4 estava -1, contudo, neste caso o $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ estava +1, ou seja, presente na composição do ensaio.

Apesar do intervalo de confiança não ser $p < 0,05$ o fato da atividade e efeito das três enzimas quando analisadas separadas obterem no ensaio 8 suas melhores análises foi realizado um novo estudo em triplicata deste ensaio para avaliar a atividade enzimática e os resultados estão demonstrados na Figura 9.

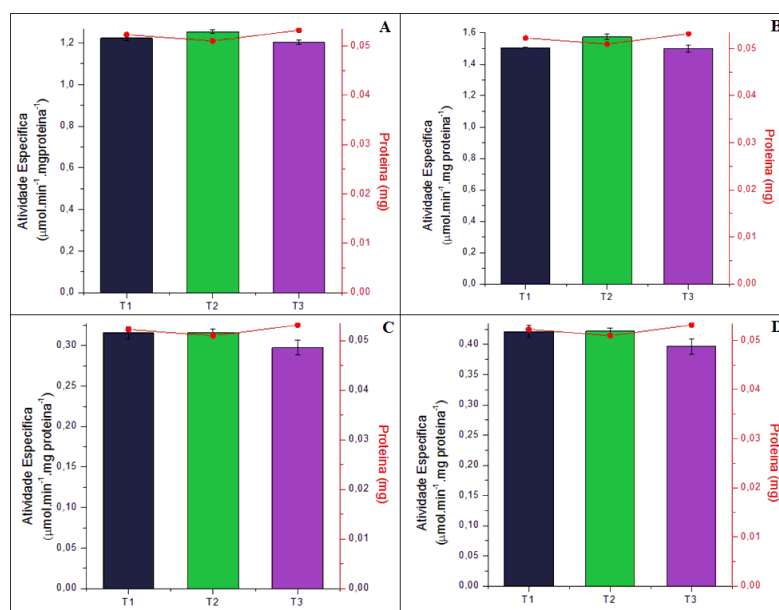


Figura 9. Atividade Enzimática Específica e proteína de triplicata do ensaio 8 de Plackett & Burman. (A) β -glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPAse

Apesar das triplicatas demonstrarem desvio padrão pequeno nas triplicatas realizadas no doseamento o teor de proteína foi o grande diferencial entre o primeiro ensaio e a triplicata, sendo 0,00466 e uma média de 0,05211 respectivamente, uma quantidade dez vezes

superior o que resultou em atividades específicas baixas quando comparadas ao primeiro ensaio.

5.4. Estabilidade Enzimática

5.4.1. Estabilidade enzimática de *Aspergillus niger* Cultivada em Meio A

5.4.1.1. Estabilidade ao pH

5.4.1.1.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. niger* produzida em meio A e sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizados na Figura 10 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 5.

Podemos observar que o perfil de estabilidade ao pH foi similar entre os pH estudados até uma hora de incubação. Porém após duas horas de incubação, no pH 3 há queda de atividade foi de 91,4% enquanto que nos demais pHs a atividade enzimática residual permaneceram entre 45 a 70% da sua atividade enzimática residual.

O pH 3 apresentou uma queda de atividade acentuada, e após cinco horas de ensaio a atividade foi de 0%. Os outros valores de pH estudados mantiveram a atividade enzimática relativamente constantes após 1h de incubação e também apresentaram atividade após onde o pH 5 obteve a maior atividade residual (47,9%) seguido pelo pH 4 (45,4%).

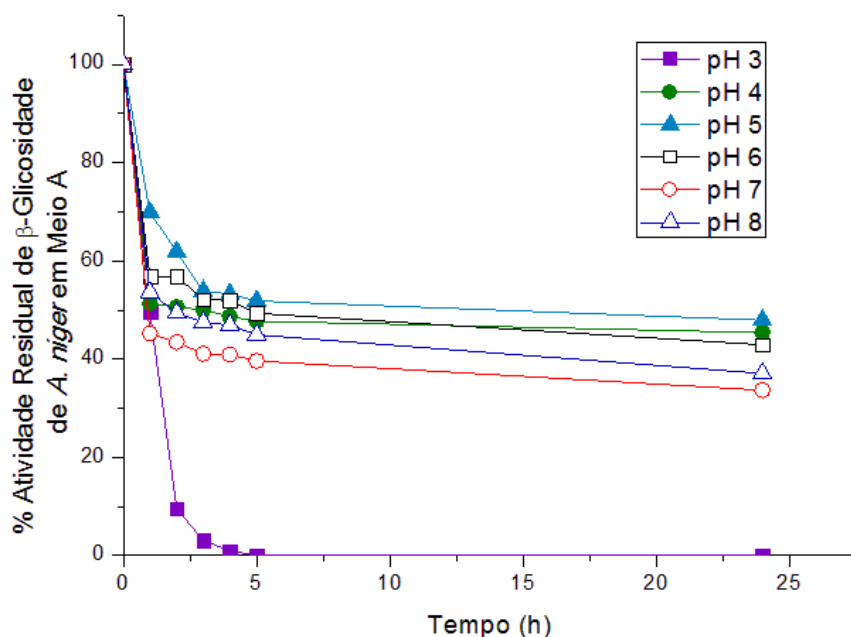


Figura 10. Porcentagem de atividade residual de β -Glicosidase produzida por *Aspergillus niger* no Meio A em função do pH.

5.4.1.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *A. niger* produzida em meio A e sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizados na Figura 11 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 6.

Para a endoglucanase, os valores de pH tiveram grande influencia na estabilidade. O pH 3 novamente demonstrou um efeito mais acentuado sobre a queda de atividade enzimática pois no primeiro ponto (1h) a atividade enzimática foi de 24,1%. Neste mesmo período de tempo, o pH 5 manteve uma atividade de 65,0%, seguido do pH 4 e pH 6 (51,7% e 51,2% respectivamente). Entretanto, no último ponto, 24h, todos os pH demonstraram uma queda chegando a valores próximos à zero ou mesmo zero. O pH 5 manteve uma atividade de 4,7% seguido do pH 6 com 1,7 e os demais chegaram a 0. Diferentemente da β -glicosidase, a endoglucanase não possuiu uma estabilidade frente a diferentes valores de pH, ou seja, a atividade enzimática foi decrescendo em relação ao tempo.

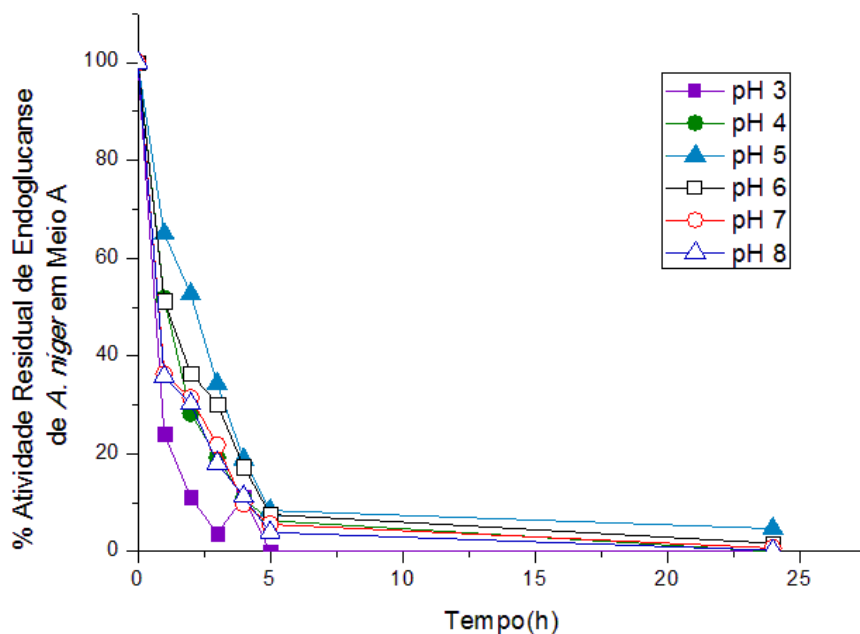


Figura 11. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus niger* no Meio A por tempo em função do pH.

5.4.1.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas Figura 12 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 7.

O perfil de estabilidade da exoglucanase não possuiu similaridades entre os pHs. O pH 3 novamente relevou resultados que influenciaram negativamente a atividade enzimática conforme o tempo, no qual após uma hora a atividade obteve uma queda de 92,7% chegando a 0% de atividade residual em três horas de ensaio que foi mantida até o final do ensaio. Os pHs 4, 5, 6, e 7 após uma hora de incubação obtiveram um resultado similar de atividade enzimática remanescente.

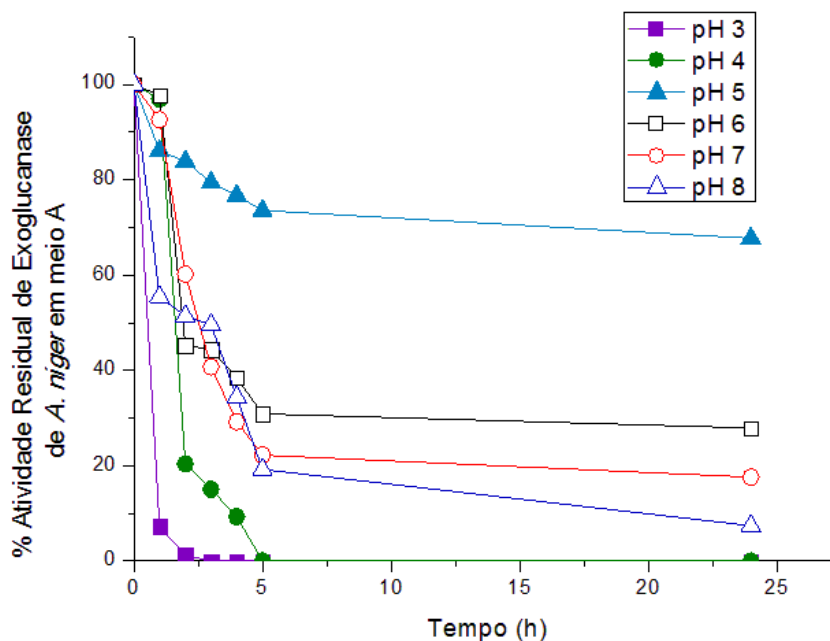


Figura 12. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus niger* no Meio A por tempo em função do pH.

Entretanto, após as duas horas de incubação com o pH 4, a atividade enzimática caiu para 20,4%, ou seja, uma queda de 79,6% de atividade em relação à atividade de uma hora. Os pHs 6 e 7 ocasionaram quedas de atividade, sendo 52,5 e 32,4% respectivamente. Em pH 5 foi obtido uma atividade enzimática consideravelmente constante em relação ao tempo que se manteve após 24h de contato (67,7%). Em pH 8 foi obtida uma atividade enzimática para o tempo de uma hora de 55,5% e se manteve relativamente constante até três horas, porém a partir deste período houve uma queda da atividade enzimática atingindo 7,4% ao final de 24 horas para a exoglucanase produzida por *A. niger*.

5.4.1.1.4. Atividade de Celulase Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pH podem ser visualizadas na Figura 13 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 8.

O perfil de atividade residual de FPAse para o Meio A foram consideravelmente diferentes, exceto pelo tempo de 24 horas, no qual todos os pH analisados obtiveram o resultado de 0% de atividade enzimática. Os pHs 3 e 4 apresentaram perfis similares com perdas de atividades de 38,8 e 53,8% respectivamente após uma hora e após três horas de ensaio, nestes pHs foi mostrado queda de atividade enzimática para 0%.

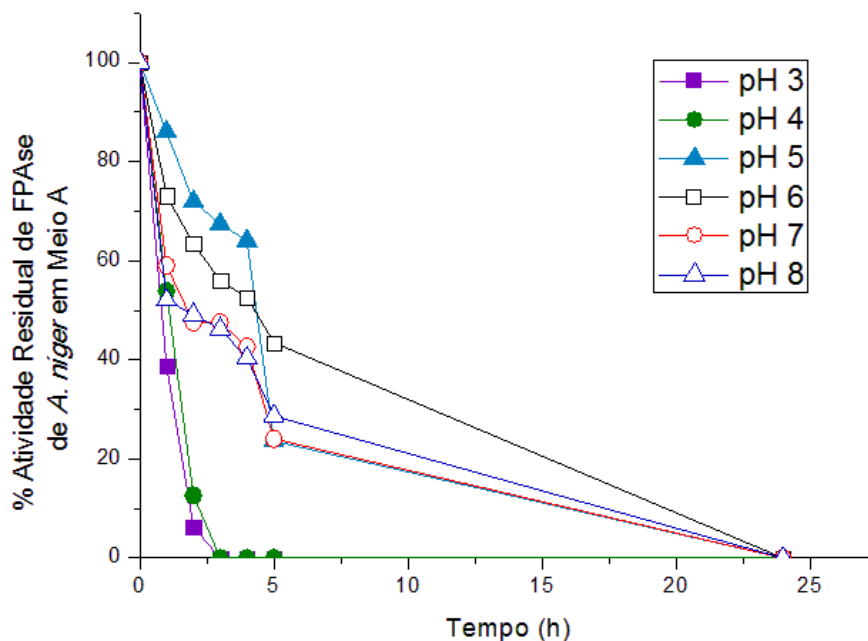


Figura 13. Porcentagem de atividade residual de FPAse produzida por *Aspergillus niger* no Meio A em função do pH.

Em pHs 4, 7 e 8, após uma hora de ensaio, possuíam valores remanescentes da atividade enzimática similares, sendo 53,8%; 59,0% e 52,0% respectivamente. Para o pH 5 foi obtido o maior valor de atividade remanescente 86,0%, mantendo a atividade enzimática de 64,0% no tempo de incubação quatro horas. Porém, após cinco horas de ensaio, a atividade foi de 23,6%, ou seja, uma queda 62,4% em relação à atividade obtida com uma hora de ensaio, para o pH 5.

Em pH 6 foi obtido o segundo melhor perfil de estabilidade enzimática, que porém superou o pH 5 após cinco horas, no qual sua atividade enzimática residual foi de 43,4% e o do pH 5 foi de apenas 23,6%, sendo 1,8 vezes maior. A FPAse em pHs 7 e 8 possuíam perfis

similares, como por exemplo em cinco horas de ensaio cujas atividades enzimáticas residuais foram 24,04% e 28,66% respectivamente.

5.4.1.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.1.2.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *Aspergillus niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 14 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 9..

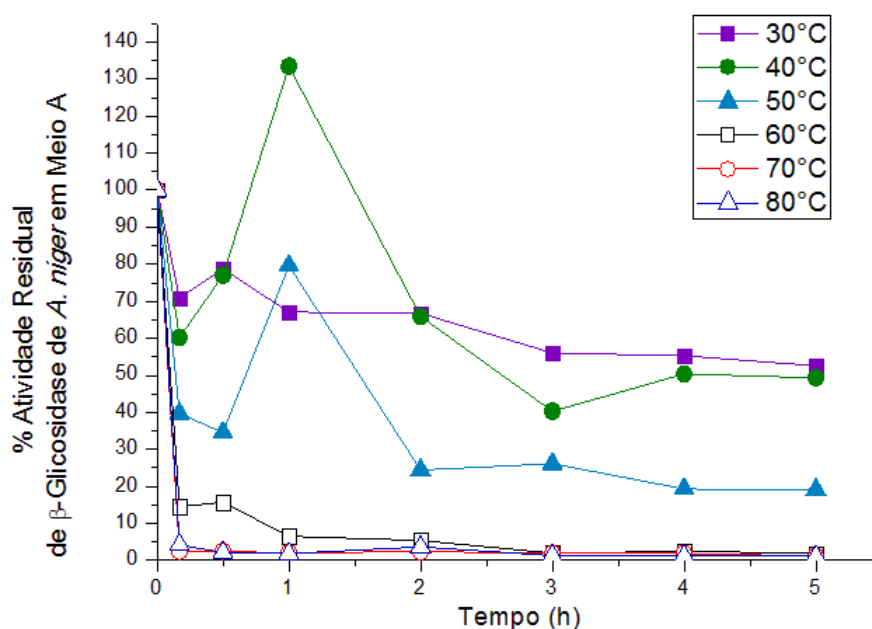


Figura 14. Porcentagem de atividade residual de β -glicosidase produzida por *Aspergillus niger* no Meio em função da Temperatura.

A análise dos resultados de estabilidade térmica exhibe perfis similares de atividade enzimática para as temperaturas de 40°C e 50°C, ambas possuindo a atividade máxima em uma hora de incubação (133,5% e 79,6% respectivamente). O aumento da atividade enzimática pode ser devido a uma modificação da conformação enzimática, expondo assim o sítio ativo, favorecendo a sua atividade. A temperatura de 30°C no tempo de 30 minutos de incubação manteve uma estabilidade relativamente constante (78,7%) durante o tempo total

de ensaio. Entretanto, as temperaturas de 60, 70 e 80°C forneceram valores de atividade enzimática tendendo a zero.

5.4.1.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *A. niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 15 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 10. A enzima endoglucanase sofreu pouca interferência durante sua incubação na temperatura de 30°C, tendo seu pico de atividade em 30 minutos (95,35%), mesmo período de incubação observado para a β -glicosidase. Na temperatura de 50°C o pico de atividade enzimática ocorreu em uma hora de ensaio, 65,37%, após o qual houve uma queda de 42,72% em relação à atividade máxima. A temperatura de 40°C exibiu valores de atividade enzimática baixas, variando em torno de 25% a atividade remanescente. A temperatura de 60°C mostrou uma baixa estabilidade térmica com atividade remanescente variando de 25 a 30%. A temperatura de 70°C demonstrou um aumento de atividade enzimática em quatro horas de incubação de aproximadamente 50%. Na temperatura de 80°C foi obtido o seu valor máximo de atividade após 1 hora de ensaio (34%) e após este período, houve uma queda de 25% da atividade enzimática, com cerca de apenas 17% de atividade residual no final do ensaio.

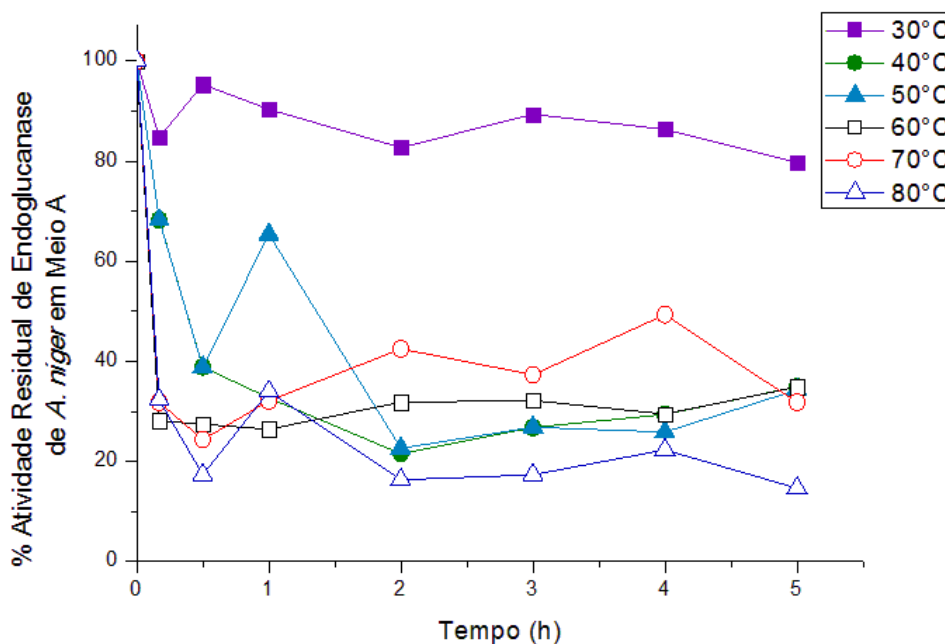


Figura 15. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus niger* no Meio A em função da Temperatura.

5.4.1.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de 3xoglucanase de *A. niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 16 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 11. Nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 70°C foram obtidas valores acima do 100% , sendo na temperatura de 30°C em uma hora de ensaio, e nas demais temperaturas em duas horas de ensaio. A maior atividade foi obtida na temperatura de 70°C, seguida de 40°C, 50°C e 30°C (194,01%;151,88% ;142,43% e 115,71% respectivamente). Podemos sugerir que estes valores são devido à modificação na conformação tridimensional da enzima favorecendo a ligação do sítio ativo com o substrato.

Apesar de fornecer a maior atividade enzimática, a temperatura de 70°C levou a uma perda considerável de atividade nas horas seguintes do ensaio chegando ao último ponto de incubação a 15,57% da atividade, ou seja, uma queda de 12,5 vezes da atividade alcançada, e que pode ser explicado pelo início da degradação da enzima. As outras temperaturas citadas

mantiveram no último período de incubação valores significativos, sendo a de 30°C uma atividade relativa de 84,59%.

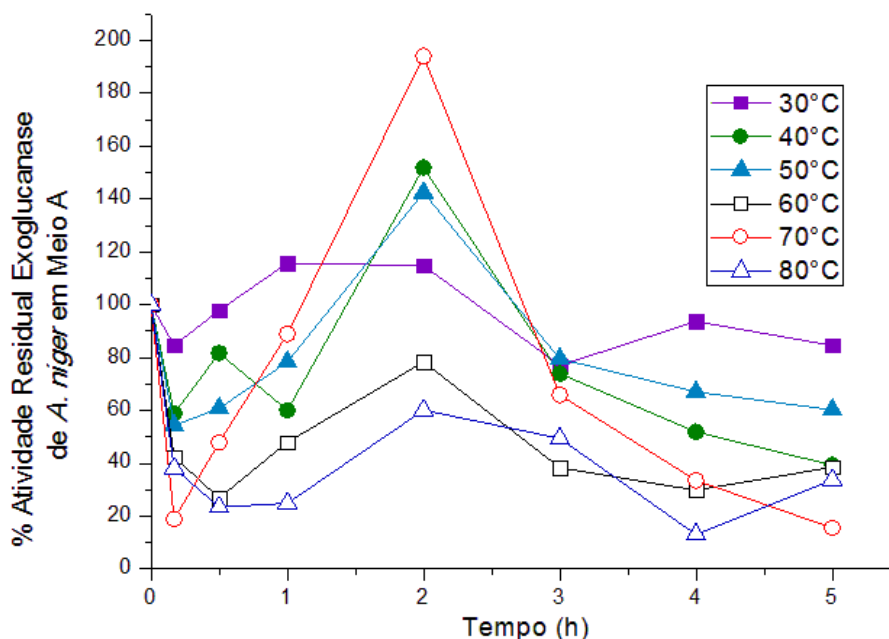


Figura 16. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus niger* no Meio A em função da Temperatura.

5.4.1.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. niger* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperatura podem ser visualizadas na Figura 17 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 12. A temperatura de 40°C forneceu o maior pico de atividade enzimática, acima de 100% em duas horas de ensaio (106,86%), seguida da temperatura de 50°C também em duas horas de ensaio (94,3%).

Na temperatura de 30°C foi obtida a maior atividade enzimática em três horas de ensaio, porém menores que os outros dois citados (88,39%), assim como a temperatura de 70°C também mostrou seu pico de atividade enzimática após duas horas de ensaio, embora com valores bem abaixo dos demais (56,2%). Para as demais temperaturas, a atividade máxima esteve na faixa de 50%.

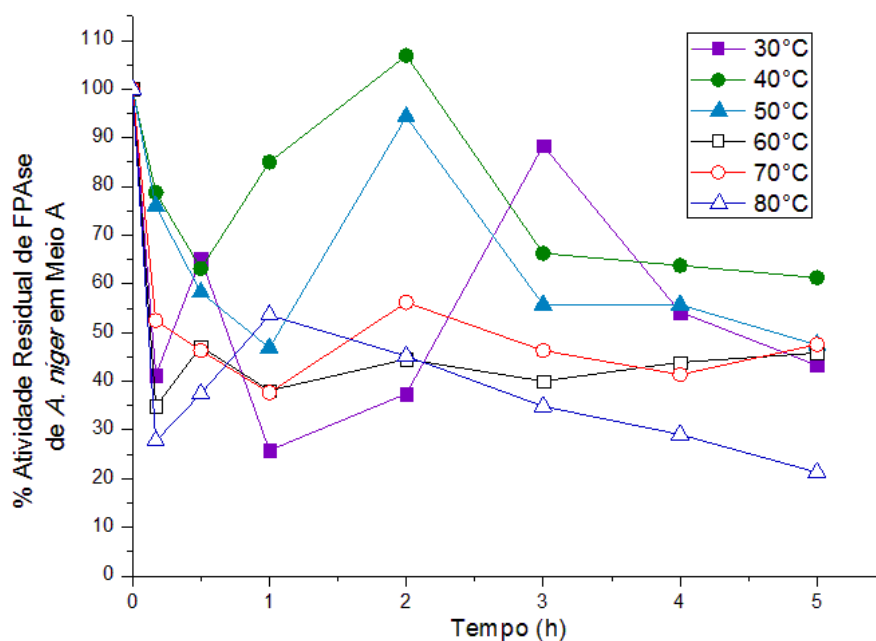


Figura 17. Porcentagem de atividade residual de FPAse produzida por *Aspergillus niger* no Meio A em função da Temperatura.

5.4.2. Estabilidade enzimática de *Aspergillus terreus* cultivada em Meio B

5.4.2.1. Estabilidade ao pH

5.4.2.1.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. terreus* produzida em meio A e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 18 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 13. Podemos observar que os perfis de atividade residual são bastante distintos quando alteramos os pHs. O pH que forneceu a maior atividade e também para o tempo de uma hora (66,86%), foi o pH 6,0 mantendo a atividade enzimática em valores elevados após quatro horas de incubação, após as 5 horas ocorreu uma queda da atividade enzimática, que ainda assim foi superior aos demais pHs analisados (37,3%). O pH 3 forneceu a menor atividade enzimática quando comparado a todos os pHs analisados atingindo 0% logo após duas horas de ensaio. Após 24 horas de ensaio, todos os pHs mostraram quedas acentuadas.

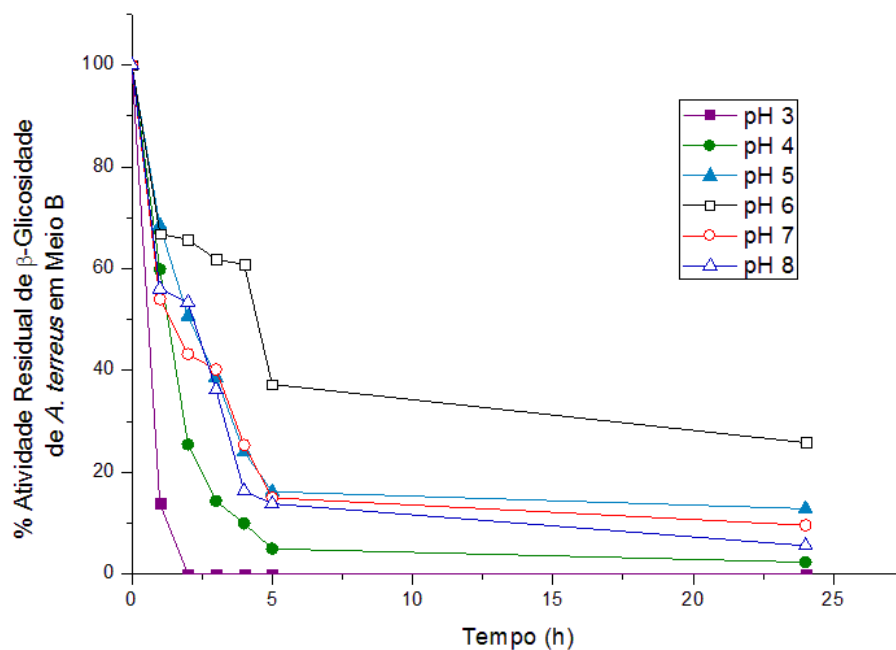


Figura 18. Porcentagem de atividade residual de β -Glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função do pH.

5.4.2.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *Aspergillus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 19 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 14.

A endoglucanase apresentou um perfil de estabilidade frente ao pH bastante similar para todos os pHs analisados em todos os tempos. Ocorreu queda de atividade enzimática acima de 50% na primeira hora de incubação. Após 24 horas, todos os pHs demonstraram um remanescente de atividade próximos à zero. Diferentemente da β -glicosidase em pH 6, a endoglucanase não possuiu uma estabilidade ao longo do tempo de incubação, ou seja, a atividade enzimática foi decrescendo em relação ao tempo.

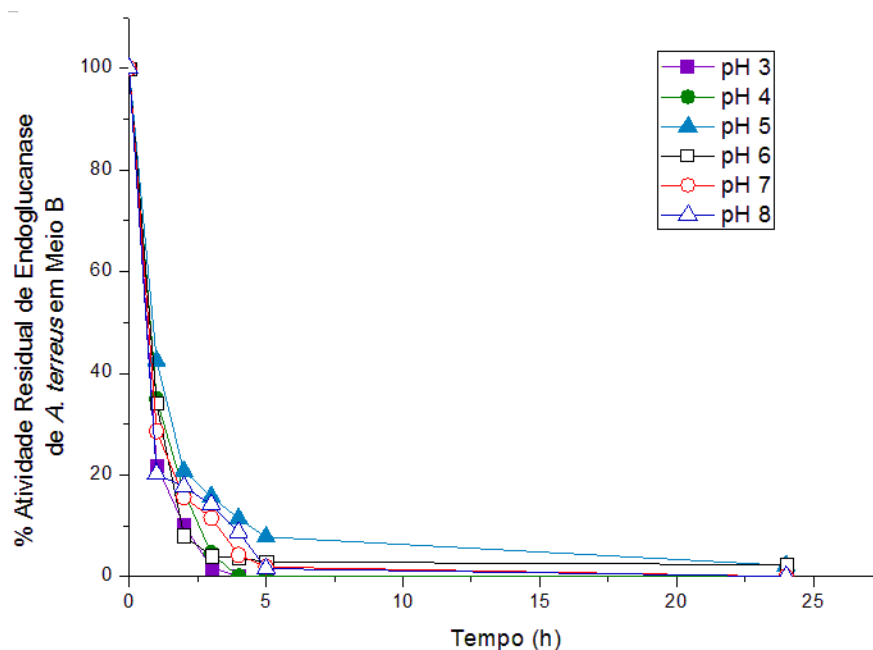


Figura 19. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função do pH.

5.4.2.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 20 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 15. Para a atividade de exoglucanase, o pH 3 novamente influenciou negativamente a atividade enzimática no decorrer o tempo, sendo que em uma hora de atividade obteve uma queda de 69,3% e chegando a 0,0% de atividade após quatro horas de incubação.

Para os pHs 4 e 5 no tempo de uma hora de incubação, as atividades residuais foram semelhantes, sendo 84,5% e 89,4% respectivamente. As curvas de atividade residuais dos pHs 5 e 8 são similares, sendo a do pH 5 superior a do pH 8, e ainda, o pH 5 forneceu a maior atividade residual após a cinco horas (47,6%) e 24 horas (42,1%), mostrando dessa forma que durante este período a atividade permaneceu constante. Nos demais pHs ocorreram quedas após 24 horas, porém nem todas as atividades de exoglucanase chegaram à zero.

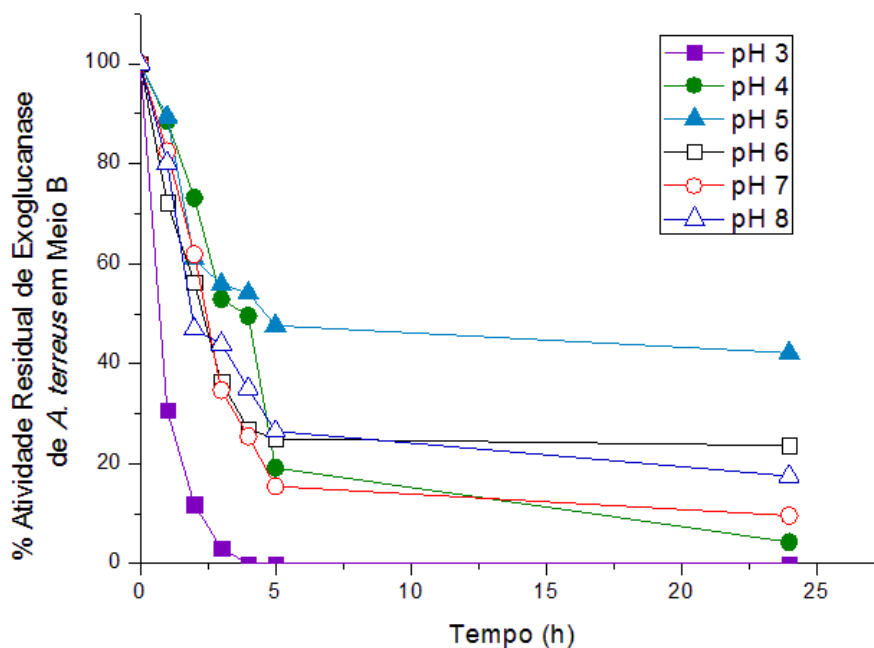


Figura 20. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função do pH.

5.4.2.1.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pH podem ser visualizadas na Figura 21 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 16. O perfil de atividade de celulase total (FPase) para o meio B foram semelhantes. No tempo de uma hora de ensaio, as atividades residuais do pH 5, 6, 7 e 8 foram similares. Em pH 4 foi obtida a menor atividade enzimática.

Para os pHs 3 e 5, o perfil foi muito similar, e ambos chegaram a 0,0% de atividade residual após cinco horas de incubação. Nos pHs de 6, 7 e 8 as atividades mostraram perfis similares entre si e as atividades residuais variaram de 20 a 30% após cinco horas de ensaio. Entretanto, em todos os pHs, excetuando o 7, após as 24 horas de incubação, resultaram em atividades residuais de 0,0% enquanto em pH 7 a atividade remanescente foi de 26%.

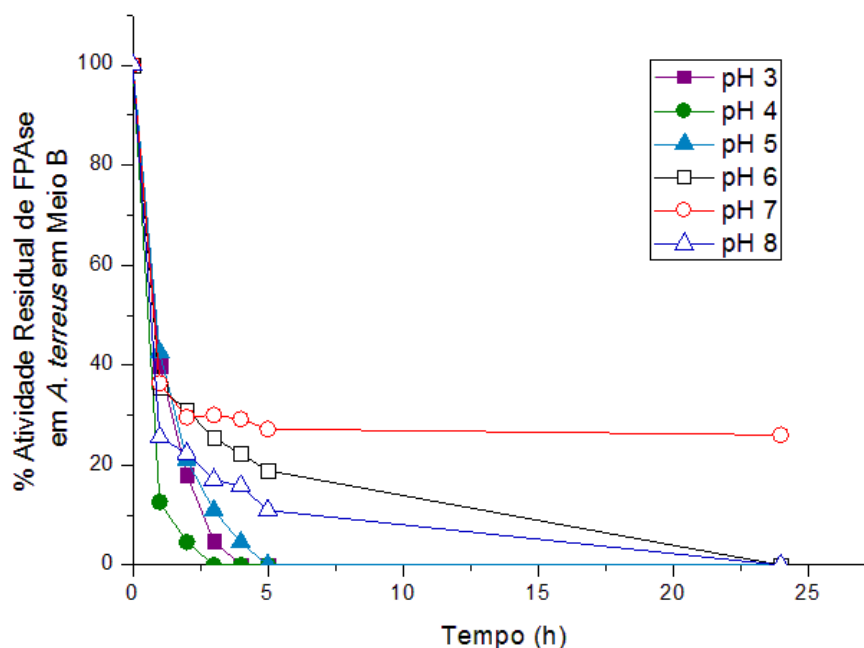


Figura 21. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função do pH.

5.4.2.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.2.2.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 22 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 17. Na temperatura de 30°C foi obtida a melhor estabilidade térmica, sendo o máximo de sua atividade com uma hora de ensaio (72,5%). A temperatura de 50°C mostrou dois picos de atividade remanescente para a β -glicosidase, um em uma hora de ensaio (57,7%) e outro em quatro horas de ensaio (59,6%).

Na temperatura de 40°C a máxima atividade também ocorreu em uma hora de incubação (51,4%). Porém, nas temperaturas de 60 e 70°C os máximos de atividade foram em duas e três horas de ensaio, enquanto que na temperatura de 80°C a atividade de β -glicosidase decaiu cerca de 25% após trinta minutos de incubação. Podemos sugerir que a β -glicosidase é uma enzima com baixa estabilidade térmica para temperaturas elevadas.

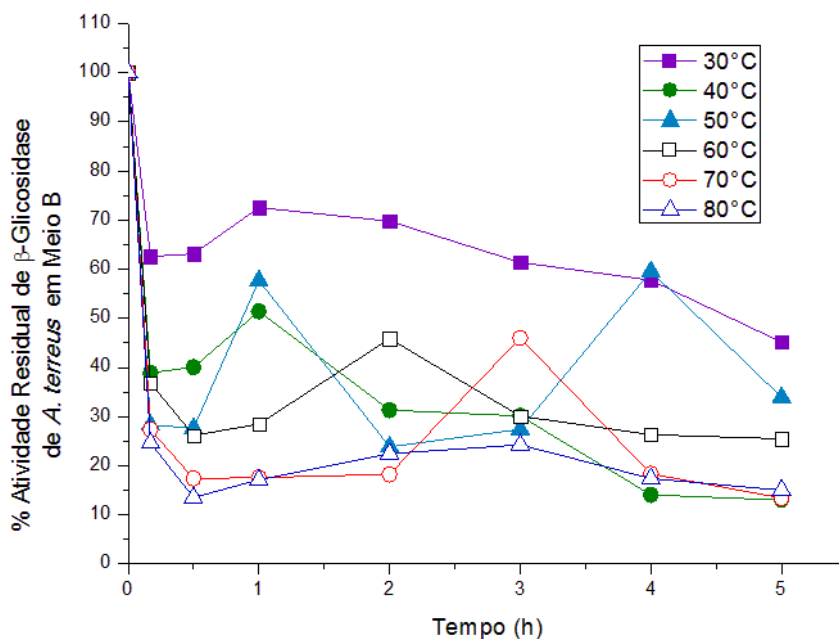


Figura 22. Porcentagem de atividade residual de β -glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função da Temperatura.

5.4.2.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de Endoglucanase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 23 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 18. A enzima endoglucanase sofreu um aumento da sua atividade após 30 minutos de incubação, a 30°C atingindo, 114,43% de atividade remanescente. Depois deste máximo de atividade, houve uma queda acentuada na atividade durante todo o período de estudo.

Os perfis de atividade residual das temperaturas de 40°C e 50°C foram similares e o máximo de atividade para 40°C e 50°C atingindo em apenas 10 minutos do ensaio, 102,% e 88,7% respectivamente. Em ambas as temperaturas a endoglucanase sofreu uma queda acentuada até duas horas de ensaio com ligeiro aumento em três e quatro horas.

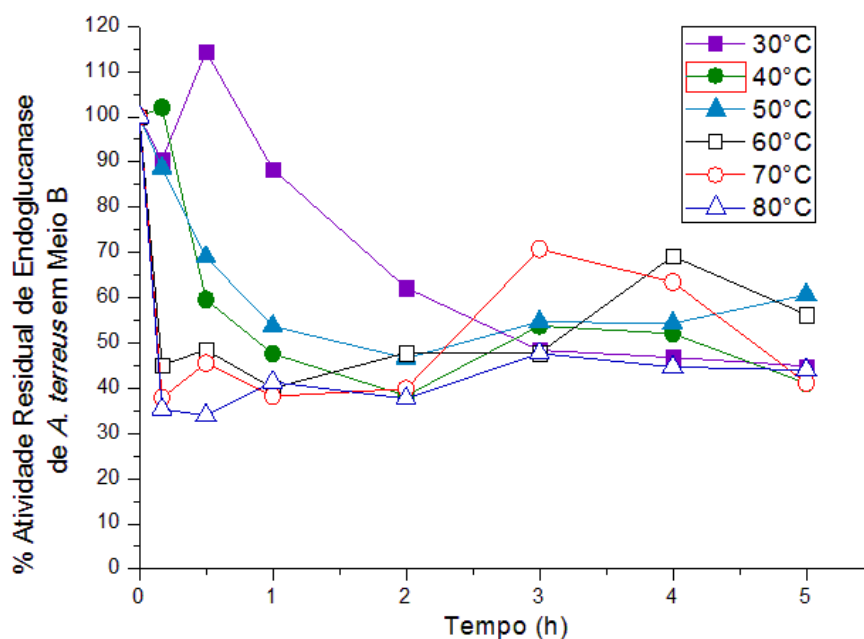


Figura 23. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função da Temperatura.

Para as temperaturas de 60°C e 70°C ocorreu decaimento de atividade situada em 30 minutos de incubação, mantendo as baixas atividades até duas horas de ensaio, e assim como observado para as temperaturas de 40°C e 50°C, voltaram a subir em três e quatro horas de ensaio. Na temperatura de 80°C a menor atividade residual das temperaturas foi demonstrada. Após uma hora de incubação a atividade residual caiu cerca de 42,72% em relação à atividade máxima.

5.4.2.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 24 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 19. Na temperatura de 30°C foi obtido o maior resultado de atividade de atividade residual em duas horas de ensaio, atingindo uma atividade de 136,8%, assim como na temperatura de 50°C também foi demonstrado o seu máximo de atividade em duas horas

de ensaio, 128,6%. O máximo de atividade em função da temperatura de 40°C foi em duas horas de ensaio, mas sendo muito menor do que as anteriores (79,1%).

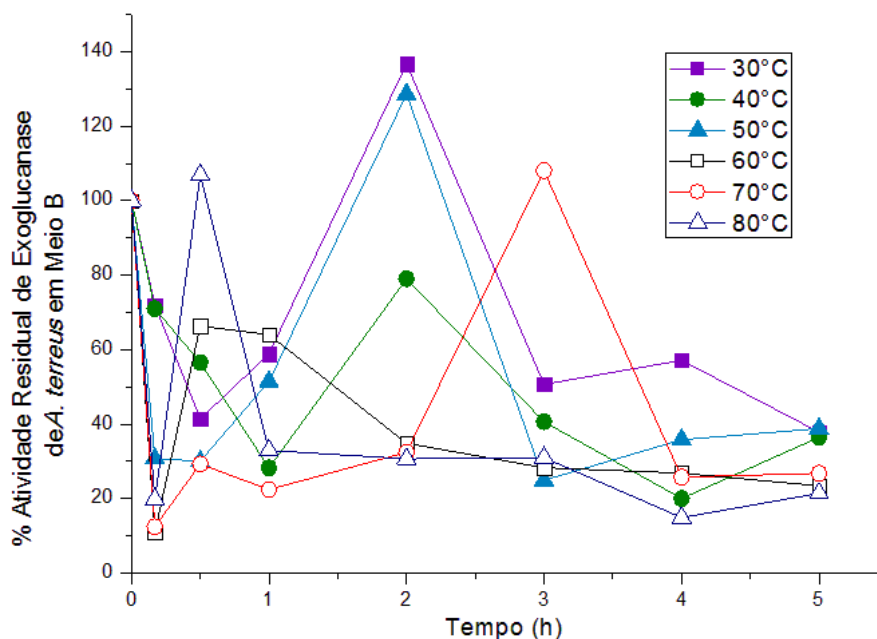


Figura 24. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função da Temperatura.

Na temperatura de 80°C foi obtido o máximo de atividade em trinta minutos de ensaio ultrapassando, também, os 100% e depois há uma queda considerável da sua atividade, o que pode sugerir uma perda de atividade enzimática. Na temperatura de 60°C, o máximo de atividade ocorreu em trinta minutos.

5.4.2.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio B e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 25 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 20. O perfil de atividade remanescente foi diferente das demais enzimas. A temperatura de 50°C foi a que ocasionou o maior pico de atividade dentre as temperaturas, sendo a única a ultrapassar os 100%, atingindo a atividade de 134,7%, em apenas dez minutos

de incubação. Depois houve uma queda para 50% de atividade residual e se manteve em uma faixa de 50-65% de atividade.

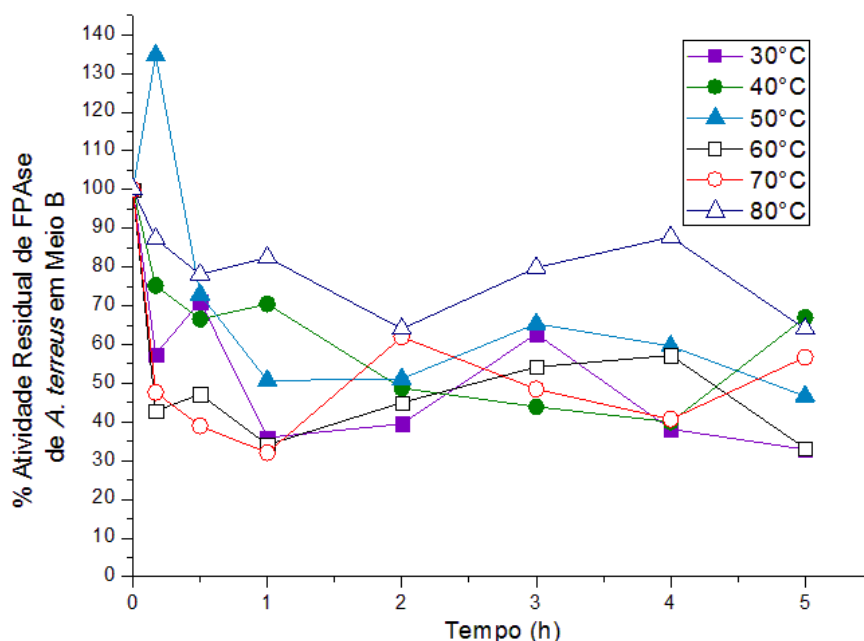


Figura 25. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio B em função da Temperatura.

Na temperatura de 80°C as atividades residuais de FPase mantiveram-se elevadas, sendo a maior atividade somente com quatro horas de ensaio (87,7%) . Na temperatura de 30°C, a atividade máxima foi atingida em trinta minutos (71,1%) e depois em três horas atividade (62,7%). Na temperatura de 40°C, a atividade remanescente máxima foi obtida em dez minutos de ensaio (75,2%) e a partir deste há queda de atividade residual.

5.4.3. Estabilidade Enzimática de *Aspergillus terreus* cultivada em meio C

5.4.3.1. Estabilidade ao pH

5.4.3.1.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 26 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 21. A atividade no pH 3 resultou nas menores atividades residuais para β -

glicosidase, sendo sua maior atividade após uma hora de incubação, entretanto com queda de 80,6% de atividade enzimática. A maior atividade no período de uma hora foi obtida com pH 5 (85,6%) , seguida do pH 6 (83,3%).

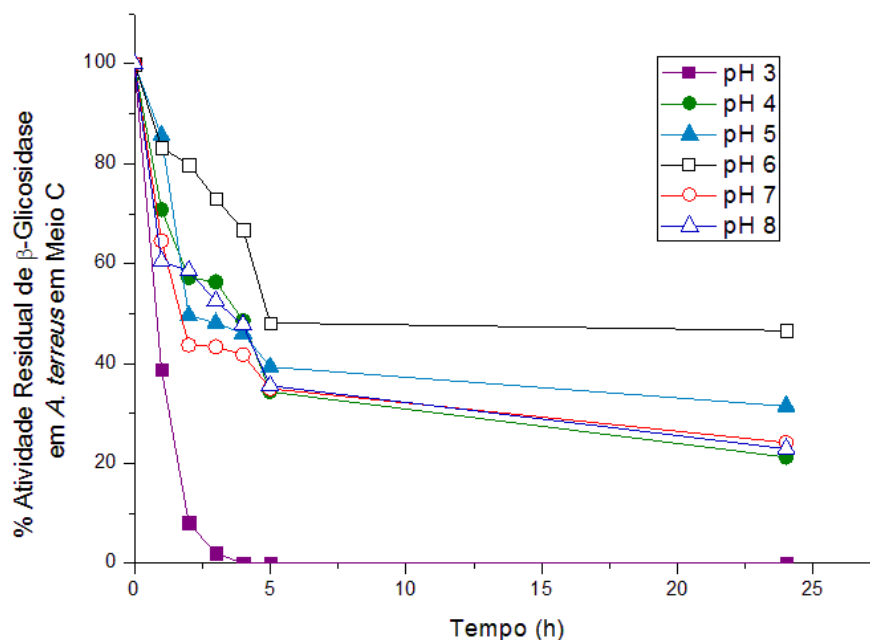


Figura 26. Porcentagem de atividade residual de β-Glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função do pH.

A β-glicosidase incubada no pH 6 apresentou maior estabilidade após 24 horas de ensaio, sendo sua atividade residual de 46,6%. O pH 5 também apresentou uma atividade após 24 horas de ensaio de 31,5%. Os pHs 4, 7 e 8 tiveram atividades após 24 horas de ensaio bastante similares, sendo 21,2; 24,2 e 22,9% respectivamente. O pH 3 atingiu 0% de atividade enzimática após as quatro horas de ensaio.

5.4.3.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 27 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 22.

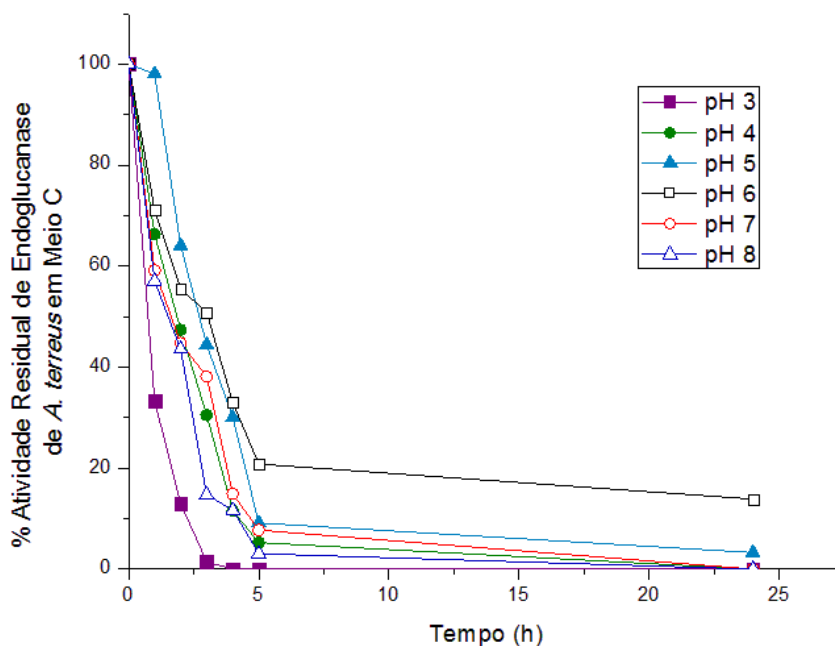


Figura 27. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função do pH.

Para endoglucanase o efeito dos pHs mostrou que as maiores atividades foram em uma hora de atividade. O pH 3 resultou novamente que nos menores valores de atividade. A maior atividade foi do pH 5 em uma hora de atividade (98,0%). As atividades dos pH 4, 6, 7 e 8 forneceram atividades entre 60-70%. Para o tempo de 24 horas de incubação, o pH que resultou na maior atividade foi o pH 6 (13,9%), seguido do pH 5 (3,3%), contudo para os demais pHs a atividade foi 0%.

5.4.3.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 28 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 23.

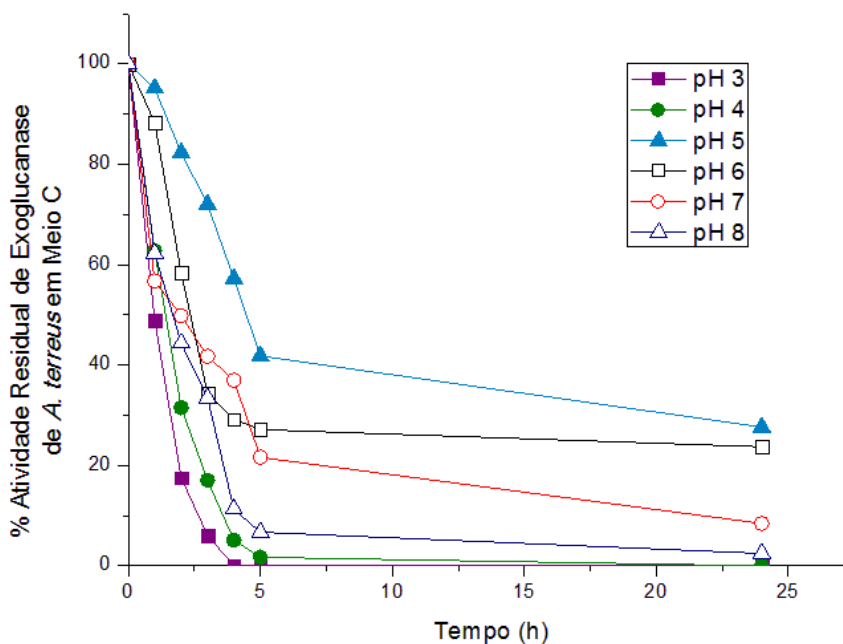


Figura 28. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função do pH.

O pH que forneceu a menor atividade enzimática foi o pH 3, tendo em seu primeiro ponto em uma hora de ensaio, uma queda de 51,1%. A maior atividade enzimática em uma hora de ensaio foi no pH 5 cujo valor foi de 95,2%. A segunda maior atividade foi encontrada no pH 6, cujo valor é de 88,3%. Para o último ponto de incubação (24 horas) o pH 5 manteve a sua estabilidade e atividade em 27,7%, enquanto o pH 6 apresentou atividade de 23,7%. O pH 7 forneceu o valor de atividade após 24 horas de 8,4% e o pH 8, de 2,5%. Os pHs 3 e 4 atingiram 0% de atividade após 24 horas.

5.4.3.1.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 29 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 24.

A maior atividade enzimática foi observada para o pH 5 no tempo de uma hora de incubação (95,2%). Enquanto a menor atividade enzimática deu-se novamente no pH 3 (48,9%). Ainda, a atividade enzimática em uma hora de ensaio para o pH 6 foi a segunda maior observada (88,3%), seguida do pH 7 com 73,6%. Para os pH 4 e 8, as atividades enzimáticas em uma hora de ensaio foram semelhantes, sendo 42,6 e 44,8% respectivamente. Após 24 horas de incubação todas as atividades remanescentes foram baixas entre 7,4 e 0%.

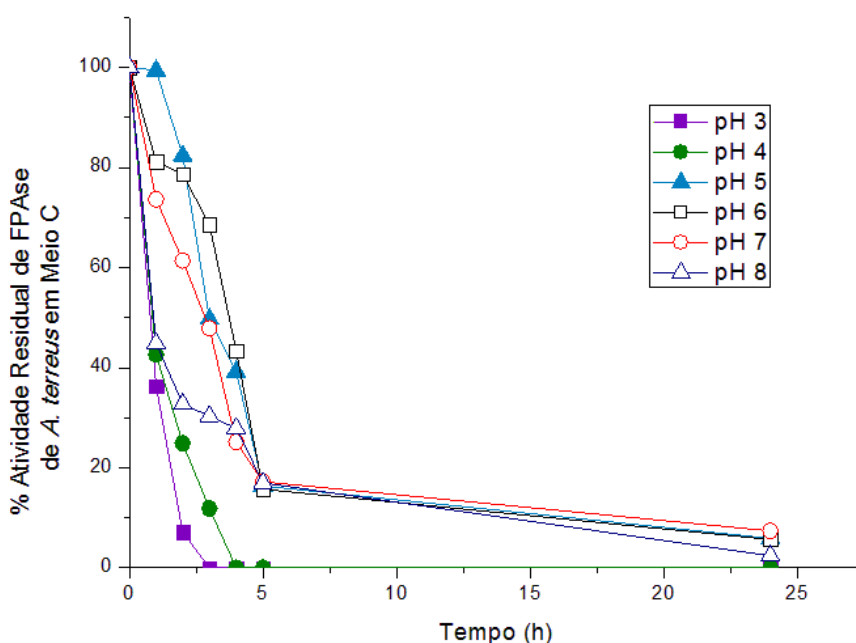


Figura 29. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função do pH.

5.4.3.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.3.2.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -Glicosidase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 30 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 25.

Após uma hora de incubação, nas temperaturas de 40, 50, 60 e 80°C foi observado um pico de atividade residual, sendo a maior atividade em 40°C (87,6%). Em 30°C houve uma queda nos primeiros minutos de incubação em torno de 30%, que se manteve, e após cinco horas de incubação atingiu cerca de 40% de atividade residual. Na temperatura de 70°C houve uma queda acentuada nos primeiros minutos e atingiu a 0% de atividade.

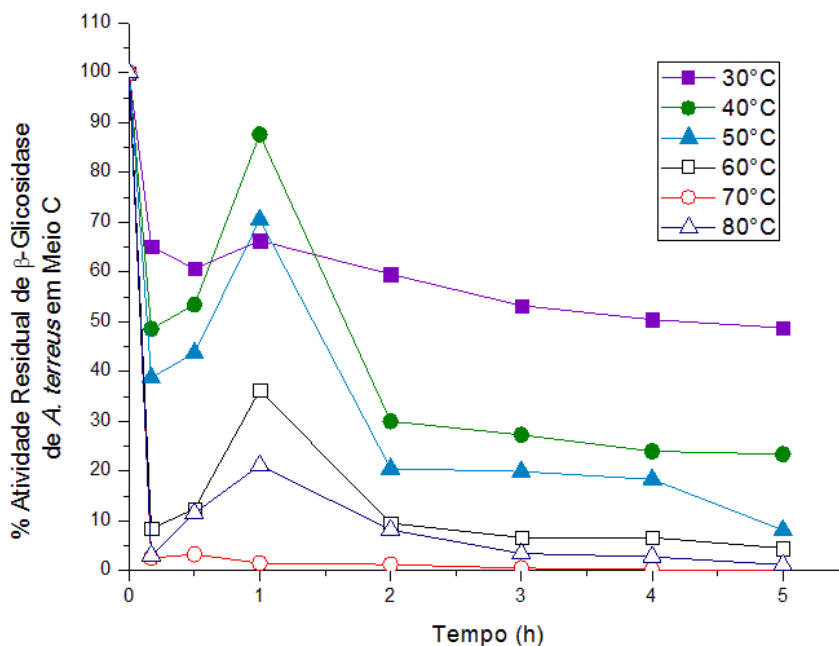


Figura 30. Porcentagem de atividade residual de β -Glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função da temperatura.

5.4.3.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 31 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 26.

A maior atividade visualizada para endoglucanase foi à temperatura de 30°C em uma hora de incubação (65,7%), sendo que esta temperatura novamente fornece uma estabilidade maior com o decorrer do tempo, variando de 40 a 65% no período de uma a quatro horas,

caindo para cerca de 30% com cinco horas de incubação. Em todas as temperaturas houve queda acentuada de atividade, mantendo-se baixa até cinco horas de incubação.

Nas temperaturas de 60°C e 80°C houve um aumento de atividade residual máxima em trinta minutos de ensaio (30,3% e 25,4%, respectivamente). A temperatura de 70°C foi a que forneceu as menores atividades, tendo seu ponto de atividade máxima em uma hora de ensaio, porém com valor de 18,8% de atividade residual.

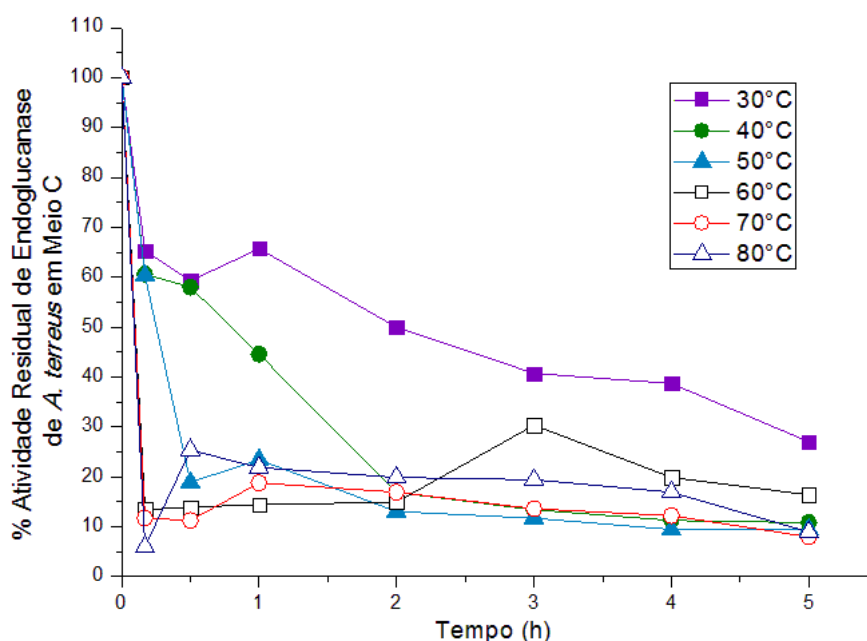


Figura 31. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função da temperatura.

5.4.3.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 32 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 27.

Podemos observar que todas as enzimas sofreram queda nos primeiros tempos de incubação em todas as temperaturas. A temperatura de 50°C, após uma queda inicial,

apresentou um pico de atividade residual em três horas. Após cinco horas de incubação, em todas as temperaturas, as atividades remanescentes chegaram abaixo de 20%.

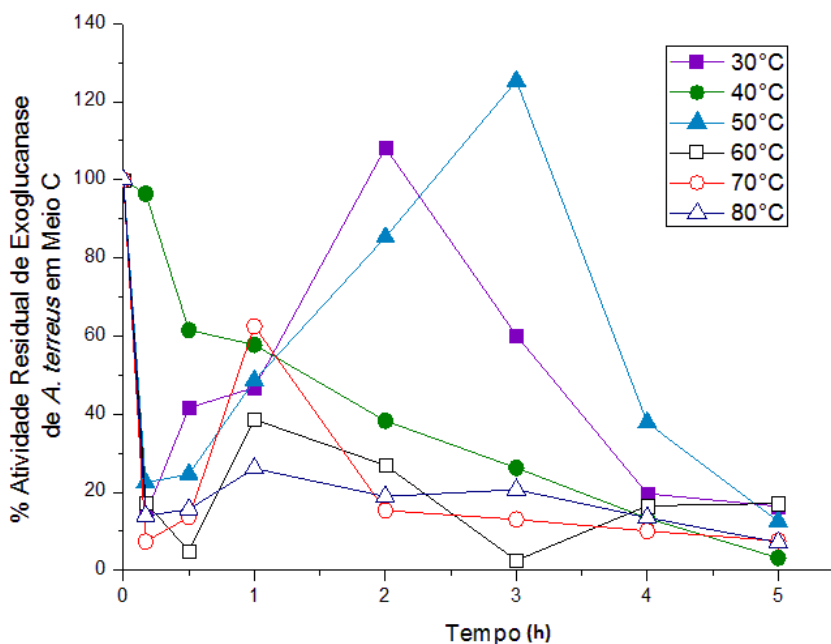


Figura 32. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função da temperatura.

5.4.3.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 33 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 28.

A maior atividade residual da atividade celulolítica total ocorreu na temperatura de 40°C em apenas uma hora de incubação (128,5%), e logo após houve uma queda brusca de atividade de 86,2%. Após, a atividade se manteve constante entre 20 a 40%.

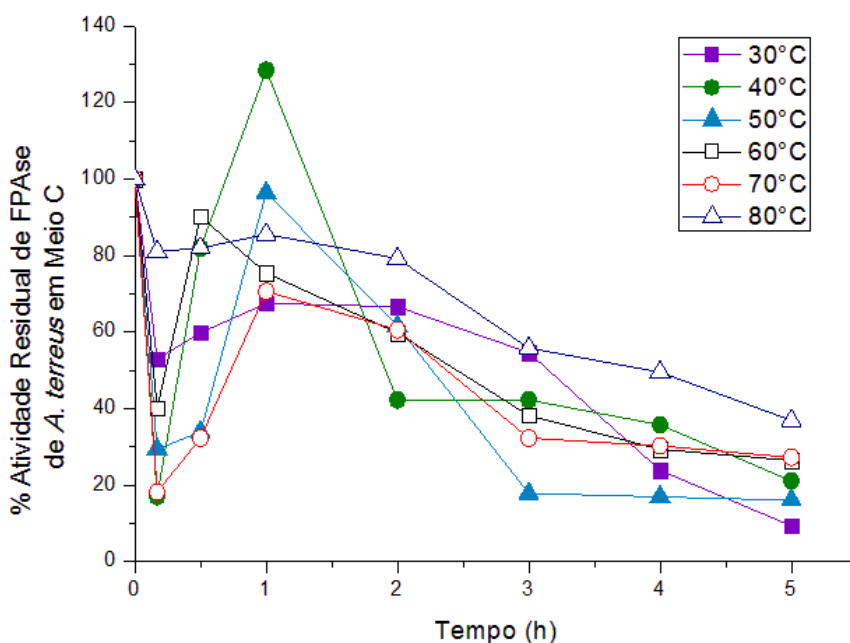


Figura 33. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio C em função da temperatura.

5.4.4. Estabilidade Enzimática de *Penicillium simplicissimum* cultivada em Meio C com 4 dias de cultivo

5.4.4.1. Estabilidade ao pH

5.4.4.1.1. β -Glicosidase

Não houve produção da enzima β -glicosidase neste período de incubação do *Penicillium simplicissimum*.

5.4.4.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 34 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 29. Analisando os perfis de atividade residual de endoglucanase podemos notar que o efeito dos pHs foi similar para os pares: pH 3 e pH 8; pH 4 e pH 5; pH 6 e pH 7.

Comparando o efeito dos pHs no tempo de uma hora de ensaio, que é a atividade máxima para todos os pHs, o pH 5 forneceu a melhor atividade (78,5%) e o pH 3 a menor atividade (43,9%). No último tempo de ensaio, 24 horas, apenas o pH 6 resultou uma atividade, sendo de apenas 4,5%, os demais atingiram 0% de atividade, os quais, já a partir de cinco horas de incubação, estavam com perda acentuada de atividade enzimática.

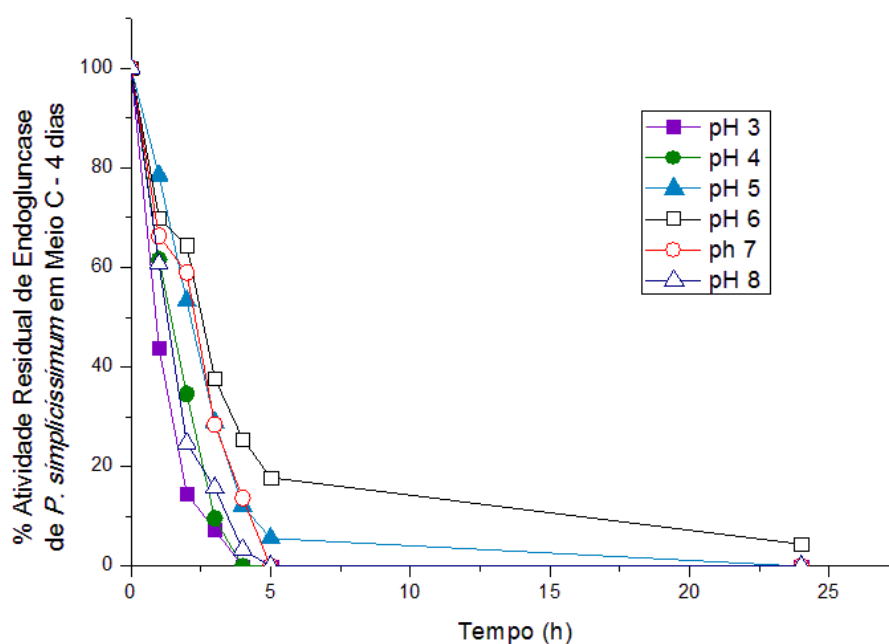


Figura 34. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida em *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH.

5.4.4.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 35 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 30. A exoglucanase obtida com o tratamento de pH 5 apresentou as melhores atividades residuais com o máximo em uma hora de ensaio (81,7%) permanecendo, após as 24 horas de ensaio, com uma atividade de 18,9%.

As menores atividades residuais foram obtidas com pH 3, sendo que em apenas uma hora de ensaio houve uma queda de 61,8% da atividade enzimática. Para os pHs 3 e 4 não foi

mantida a atividade enzimática após as 24 horas de ensaio chegando em 0% de atividade enzimática residual. Contudo, nos pHs 6,7 e 8 as atividades remanescentes foram muito baixas, de 2 a 6% .

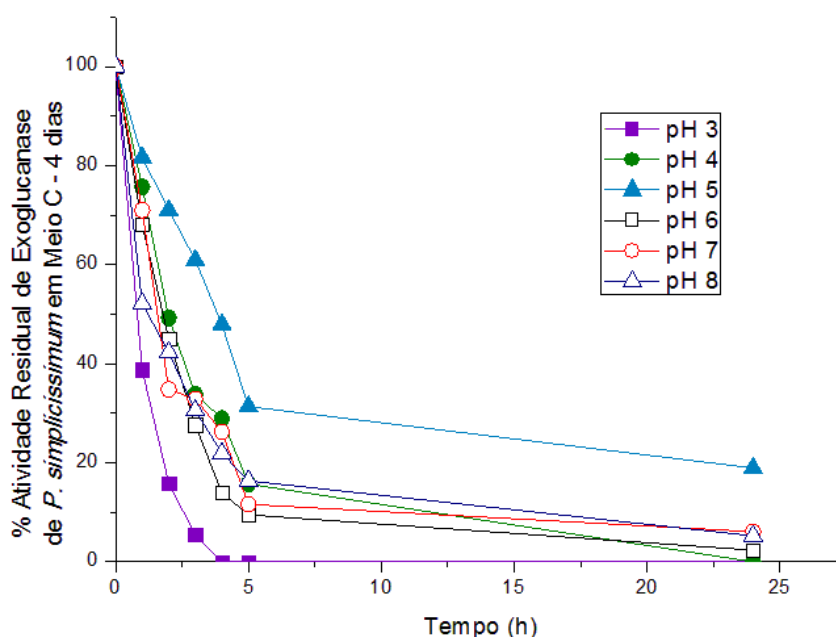


Figura 35. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida em *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH.

5.4.4.1.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 36 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 31.

Novamente, no pH 5 foi obtida a maior atividade residual em uma hora de ensaio (73,3%), porém após as 24 horas de ensaio, a sua atividade remanescente foi de apenas 2,0%. Comparando a primeira hora de ensaio, em pH 8 foi obtida menor atividade residual (22,3%), porém as atividades entre duas e cinco horas de ensaio mantiveram-se constantes, com perdas de no máximo 3,0%. Para o pH 3, que normalmente exibe as menores atividades enzimáticas,

neste caso apresentou ainda uma atividade de 49,3%. Após as 24 horas de ensaio, nos pH 6, 7 e 8 as atividades residuais variaram de 8,8%; 7,1% e 7,0% respectivamente.

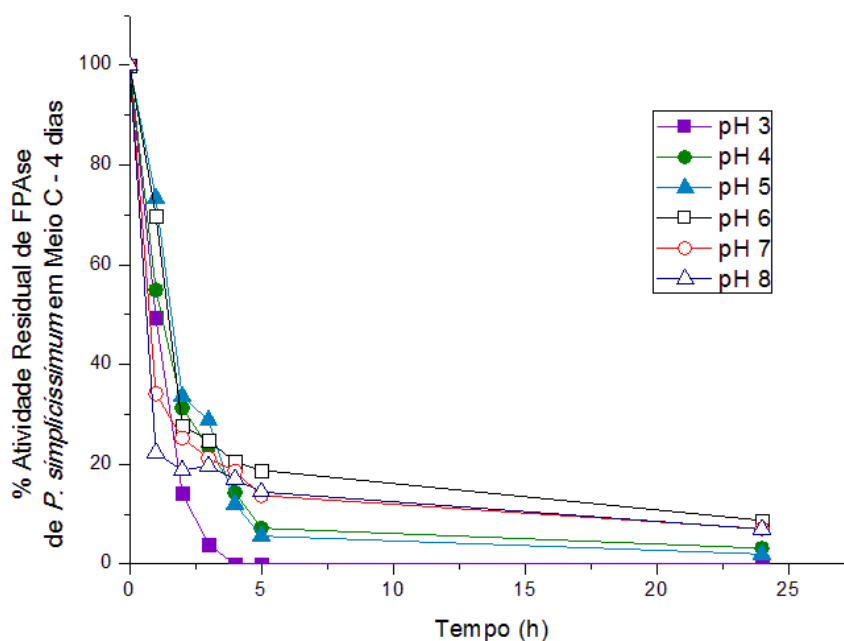


Figura 36. Porcentagem de atividade residual de FPAse produzida em *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função do pH.

5.4.4.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.4.2.1. β -Glicosidase

Não houve produção da enzima β -glicosidase neste período de incubação do *Penicillium simplicissimum*.

5.4.4.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 37 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 32. Analisando a Figura 37, podemos observar que o maior pico de atividade enzimática foi da temperatura de 50°C em trinta minutos de ensaio (112,9%) decaindo em uma hora (39,4%).

Após uma hora de incubação nas temperaturas de 40°C, 70°C e 80°C houve quedas de atividade enzimática exibindo níveis abaixo de 50% que continuaram a diminuir até cinco horas. Na temperatura de 60°C apesar de estar abaixo de 50% de atividade após uma hora de incubação, foi obtido um pico de atividade em duas horas de 59,3% de atividade residual.

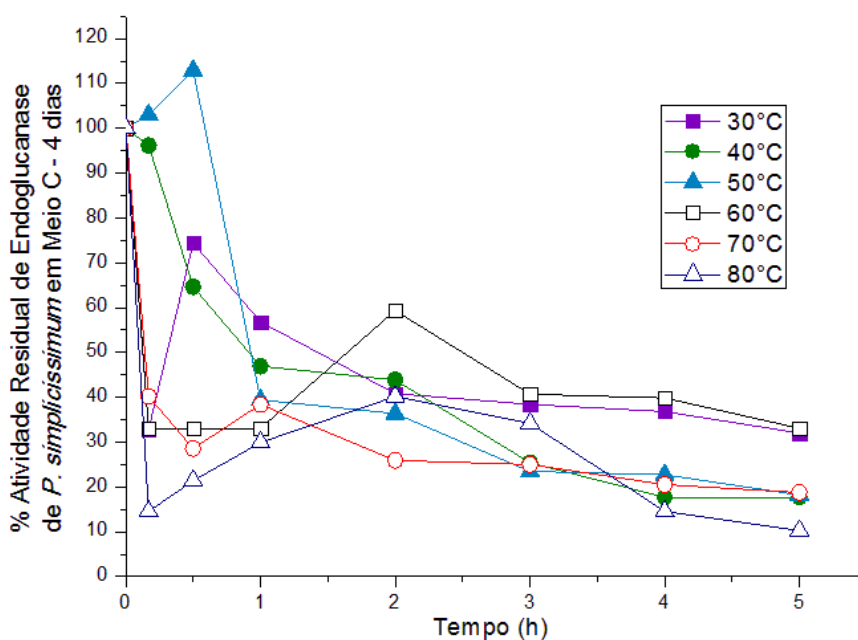


Figura 37. Porcentagem de atividade residual de FPAse produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função da temperatura.

5.4.4.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 38 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 33.

Para a exoglucanase podemos notar na Figura 38 que para todas as temperaturas houve um pico de atividade residual em uma hora de incubação, exceto para a temperatura de 80°C, que apresentou decaimento de 37,1% entretanto apresentando sua atividade máxima em trinta minutos de incubação (103,0%). Nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C 60 °C os valores de atividade foram acima de 100% na primeira hora de ensaio (354,0%; 212,1%; 242,4% e 126,8% respectivamente).

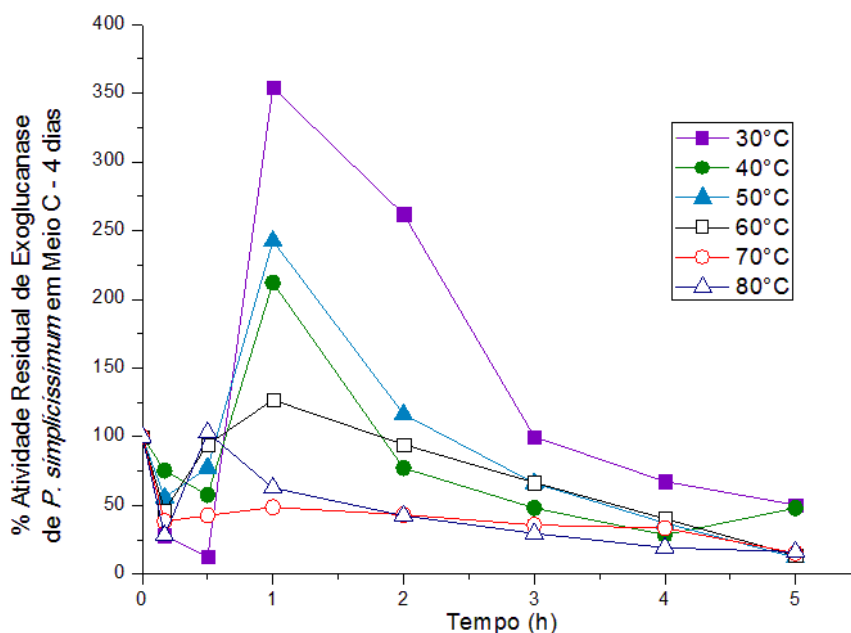


Figura 38. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função da temperatura

5.4.4.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 39 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 34.

Observamos que o maior pico de atividade enzimática foi obtido após a incubação em 50°C por uma hora (125,7%). Ainda em uma hora na temperatura de 30°C a FPase apresentou 76,8% de atividade. Nas temperaturas de 60°C e 70°C, em uma hora de incubação foram atingidos os níveis de 56,8% e 38,5% respectivamente.

Na temperatura de 80°C a atividade máxima foi apenas em dez minutos de ensaio (97,4%), contudo, as demais atividades remanescentes foram mais estáveis, ficando na faixa de 65 a 80%.

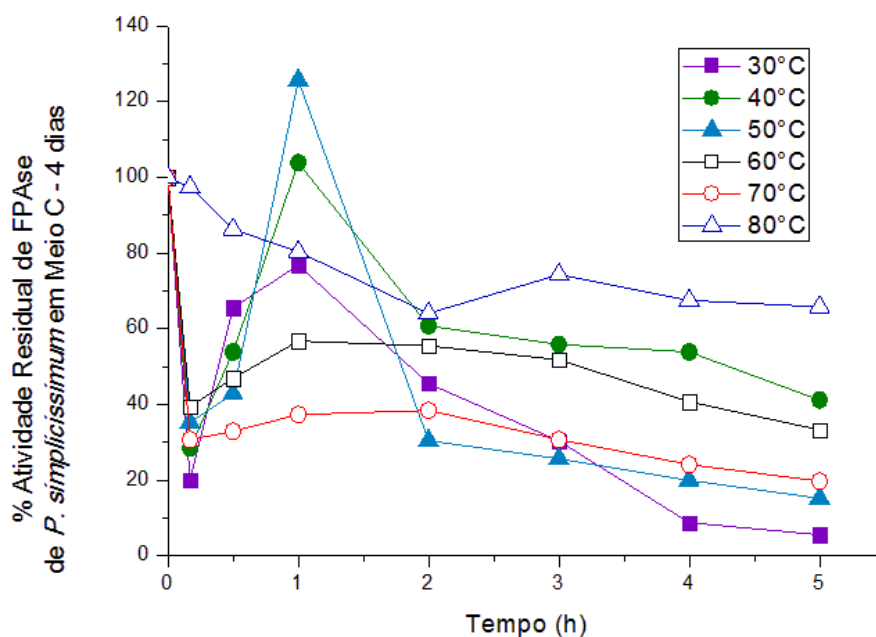


Figura 39. Porcentagem de atividade residual de FPAse produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 4 dias de incubação em função da temperatura.

5.4.5. Estabilidade Enzimática de *Penicillium simplicissimum* em Meio C cultivada em 13 dias

5.4.5.1. Estabilidade ao pH

5.4.5.1.1. β -Glicosidase

Não houve produção da enzima β -glicosidase neste período de incubação pelo *Penicillium simplicissimum*.

5.4.5.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 40 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 35. Nos pHs de 4, 5 e 6 as maiores atividades foram obtidas em uma hora de incubação.

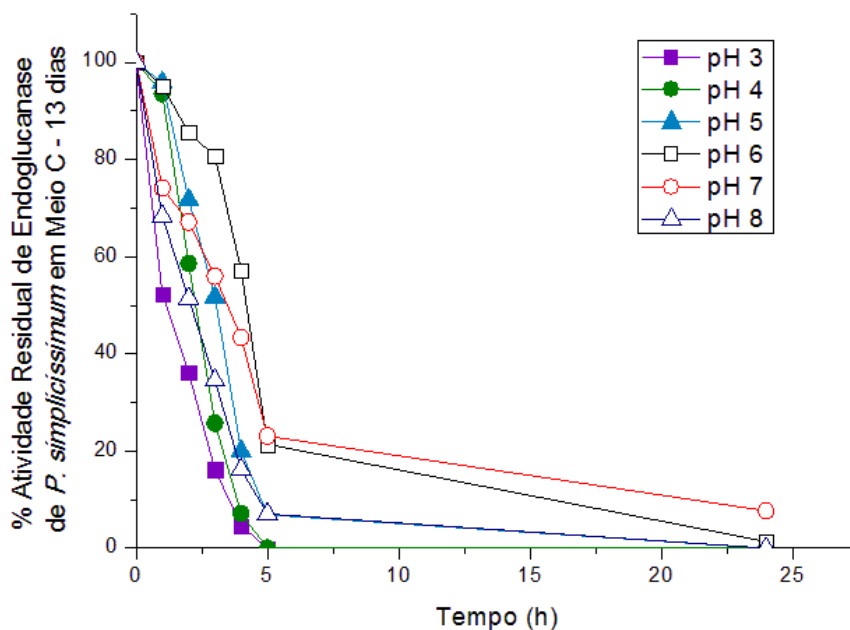


Figura 40. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH.

Nos pHs 7 e 8 as atividade embora altas em uma hora de incubação foram menores que os anteriores, enquanto no pH de 3 a menor atividade residual foi obtida em uma hora de incubação (52,3%). Após 24 horas de incubação, todas as atividades atingiram 0% de atividade, exceto os pH 6 e 7, que mantiveram atividades discretas de 1,4 e 7,7% respectivamente.

5.4.5.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *P. simplicissimum* produzida em meio C por 13 dias de incubação e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 41 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 36.

O perfil de atividade enzimática dos pHs 5 e 6 são bastante similares, tendo seus pontos de maior atividade em uma hora de incubação (86,7% e 84,7% respectivamente). Os pHs 4, 7 e 8 também possuem similaridades em diversos pontos de suas curvas, entretanto, podemos destacar a queda acentuada de atividades em tais pHs a partir de cinco horas.

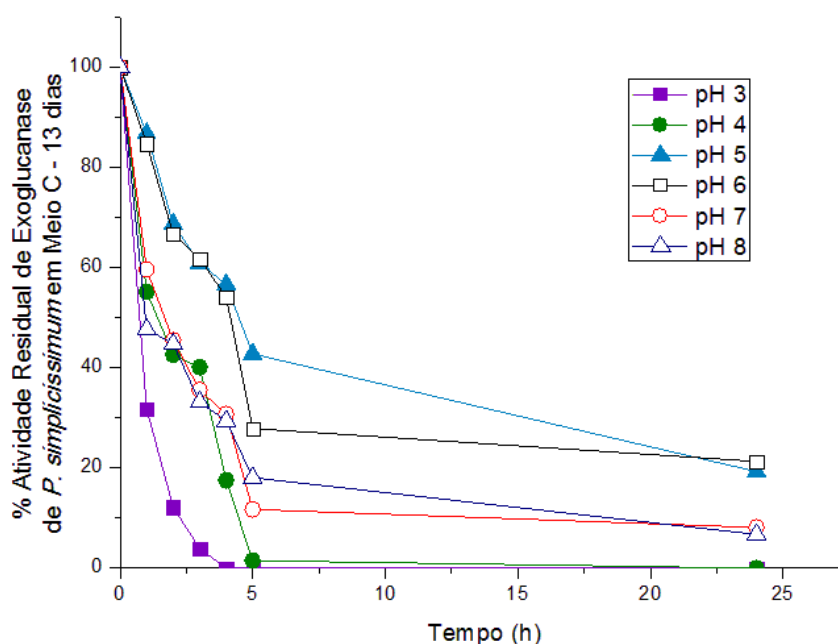


Figura 41. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH.

5.4.5.1.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *P. simplicissimum* produzida em meio C por 13 dias de incubação e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 42 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 37.

As maiores atividades na primeira hora de incubação foram obtidas com as incubações em pHs 5 e 6 (90,4% e 86,2% respectivamente). Em todos os pHs houve uma queda acentuada progressiva em cinco horas de incubação e após as 24 horas, as atividades remanescentes ficaram abaixo de 20%.

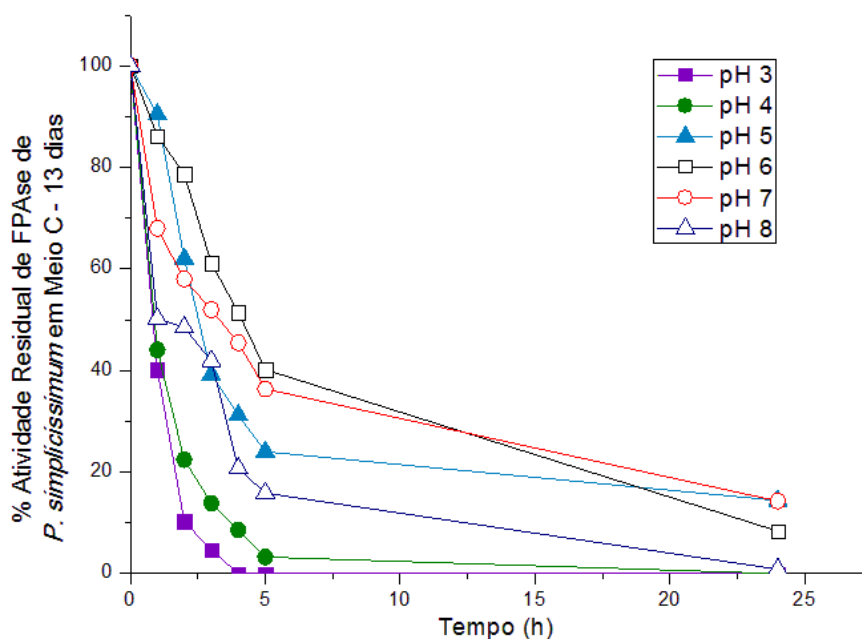


Figura 42. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida em *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função do pH.

5.4.5.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.5.2.1. β -Glicosidase

Não houve produção da enzima β -glicosidase neste período de incubação pelo *Penicillium simplicissimum*.

5.4.5.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* produzida em meio C por 13 dias de incubação e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 43 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 38.

A maior atividade enzimática residual foi obtida na temperatura de 50°C, após 30 minutos de incubação. Em todas as temperaturas houve queda acentuada de atividade a partir dos primeiros minutos de incubação. Os níveis obtidos após cinco horas de incubação permaneceram baixos.

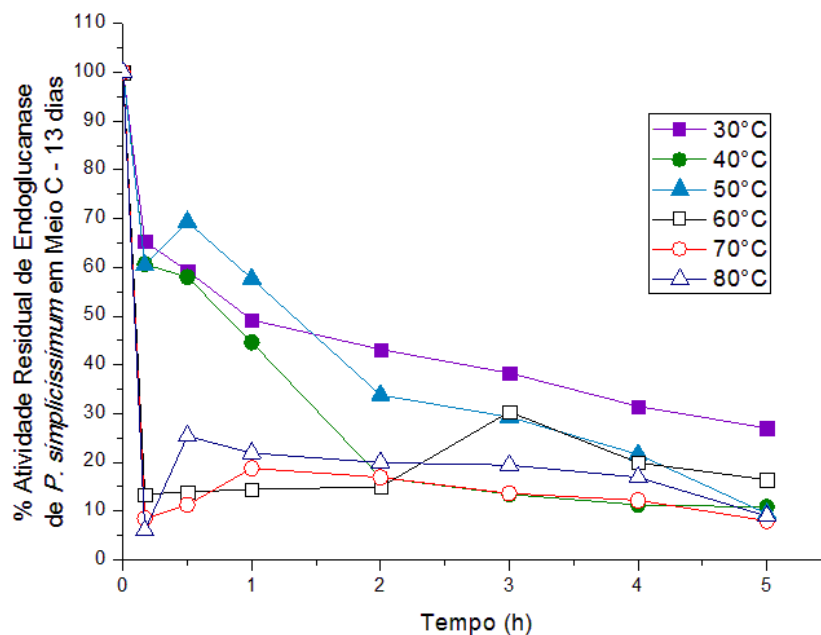


Figura 43. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função da temperatura.

5.4.5.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *Penicillium simplicissimum* produzida em meio C por 13 dias de incubação e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 44 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 39.

A maior atividade enzimática residual foi exibida novamente pela temperatura de 50°C em duas horas de ensaio (149,9%). A temperatura de 30°C forneceu um perfil singular de atividade possuindo dois picos de atividade, o primeiro em dez minutos de incubação (113,9%) e outro em duas horas (137,6%). Nas temperaturas de 40°C e 60 °C foram obtidos picos de atividades em duas horas de incubação, 100,6% e 93,3%, respectivamente. Ainda em 60°C houve um remanescente de atividade enzimática de 64,0%.

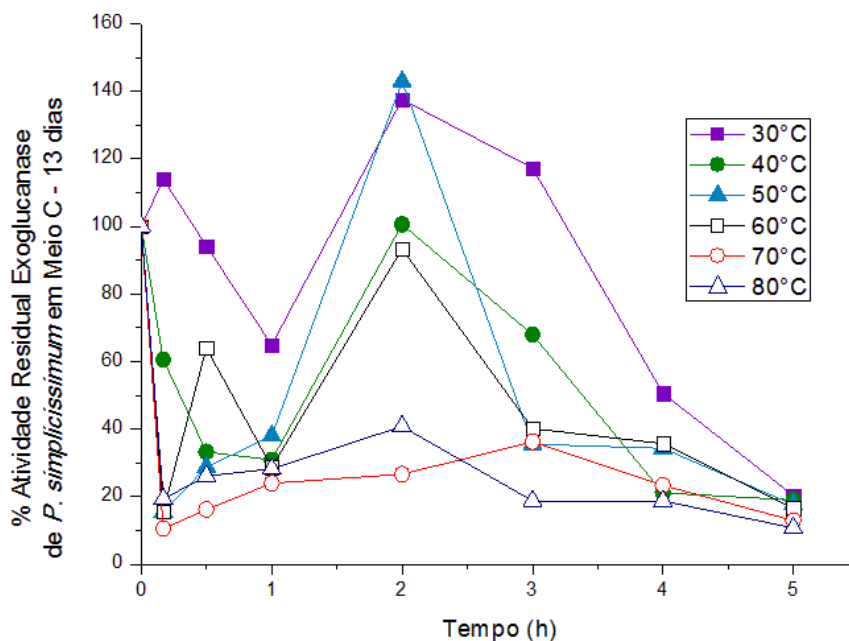


Figura 44. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função da temperatura.

5.4.5.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *Penicillium simplicissimum* produzida em meio C por 13 dias de incubação e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 45 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 40.

A maior atividade residual foi a de 70°C a dez minutos de incubação com 156,2% de atividade, contudo a atividade enzimática caiu drasticamente, uma queda de 108,3% em relação à atividade máxima nos 30 minutos de atividade e após uma hora de incubação, queda de 126,4% em relação à atividade máxima.

A segunda maior atividade ocorreu na temperatura de 80°C em 30 minutos de incubação (144,1%), contudo não houve uma queda acentuada de atividade como na temperatura de 70°C. Na temperatura de 30°C a atividade máxima em três horas de incubação, foi de 123,4%. As temperaturas de 40°C e 50°C possuem perfis muito similares, incluindo seu pico de atividade em duas horas de incubação (116,4% e 110,2%

respectivamente). A temperatura de 60°C forneceu uma atividade máxima em apenas uma hora do ensaio com um valor de 71,4%.

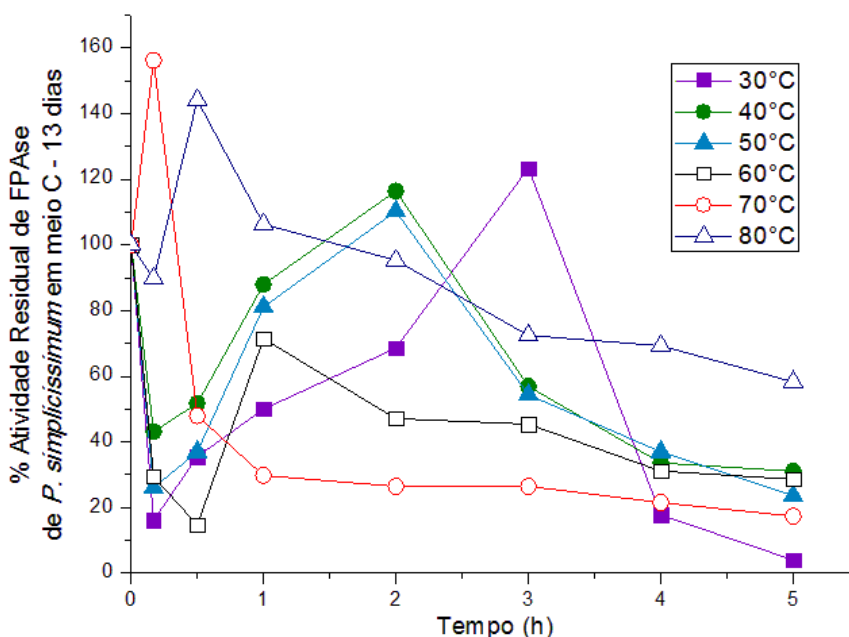


Figura 45. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Penicillium simplicissimum* no Meio C em 13 dias de incubação em função da temperatura

5.4.6. Estabilidade Enzimática de *Aspergillus terreus* em Meio D

5.4.6.1. Estabilidade ao pH

5.4.6.1.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 46 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 41.

A maior atividade residual de β -glicosidase para a primeira hora de incubação com os pHs analisados foi a do pH 5,0 (92,6%). Os pHs de 4,6, e 8 possuem valores similares na primeira hora de ensaio (79,5; 85,9; 81,7 e 76,2%). No pH 3 foram obtidas as menores atividades, sendo que para a primeira hora de incubação houve uma queda de 75,7% da atividade. A estabilidade de após 24 horas, mostrou diferentes atividades remanescentes sendo para o pH 4 a maior atividade residual (25,4%). Os pHs de 5,6,7 e 8 obtiveram atividades

residuais variando de 9-12% neste período. O pH 3 não teve atividade residual de β -glicosidase a partir das cinco horas de incubação.

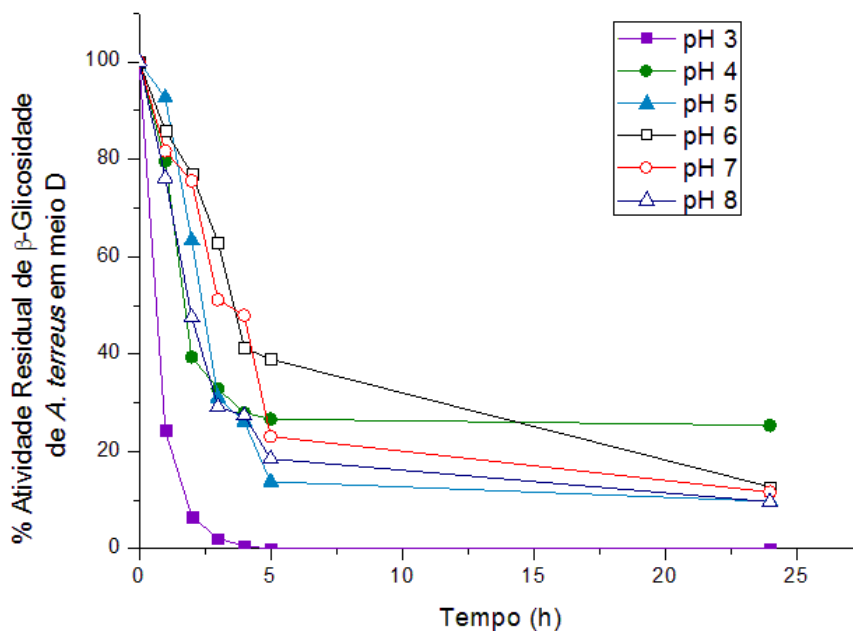


Figura 46. Porcentagem de atividade residual de β -glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função do pH.

5.4.6.1.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 47 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 42.

O perfil enzimático da endoglucanase foi bastante similar para todos os pHs. Entretanto, o pH apresentou as melhores atividade, como por exemplo o para a primeira hora (84,4%). Os demais pHs mostraram atividade variando de 35 a 40% em uma hora de incubação. Após 24 horas de incubação, a endoglucanase, em todos os pHs apresentou queda de atividade com valores próximos a 0%.

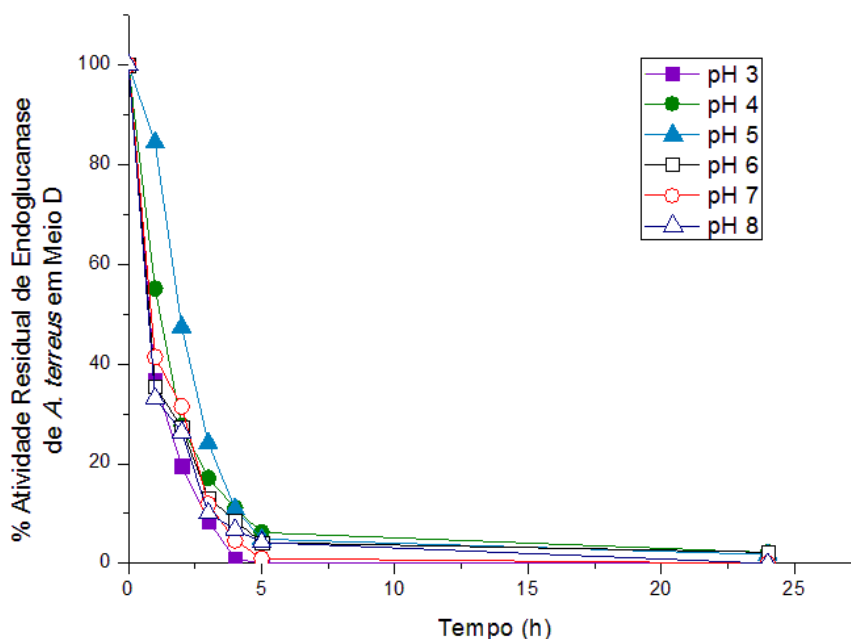


Figura 47. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função do pH.

5.4.6.1.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 48 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 43.

A maior atividade para uma hora de incubação foi em pH 5 (98,2%), seguida do pH 4, 6 e 7 (88,1; 76,4 e 50,2% respectivamente).

Nos pHs 3 e 8 os valores de atividade residual na primeira hora de ensaio foram similares, 29,3 e 31,4%. Após 24 horas de ensaio, a atividade da Exoglucanase do pH 5 ainda possui atividade residual de 20,2%. Os pHs de 6 e 7 também possuem atividades após as 24 horas de ensaio (9,9 e 4,8% respectivamente). Os pHs 4 e 8 obtiveram valores de atividade residual próximos à zero, após as 24 horas, e o pH 3 atingiu 0% de atividade

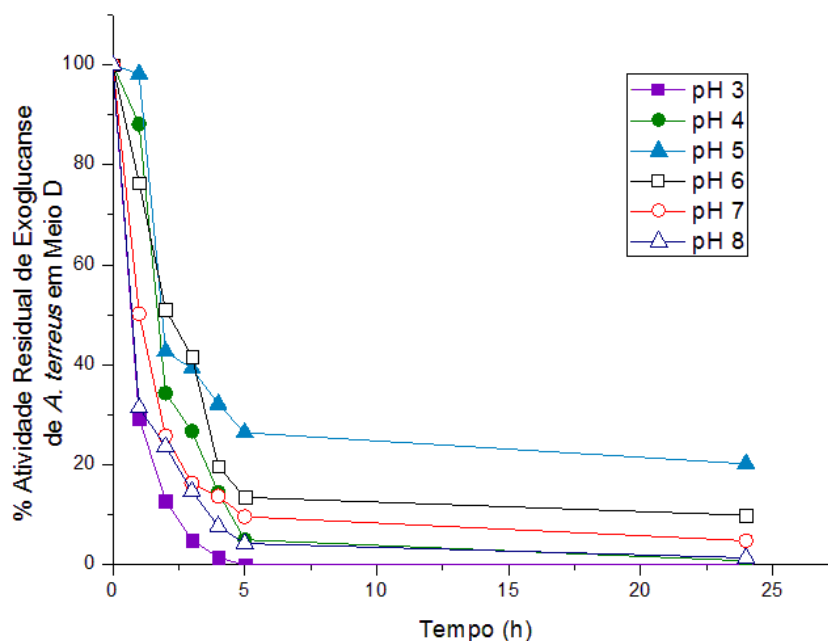


Figura 48. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função do pH.

5.4.6.1.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes pHs podem ser visualizadas na Figura 49 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 44.

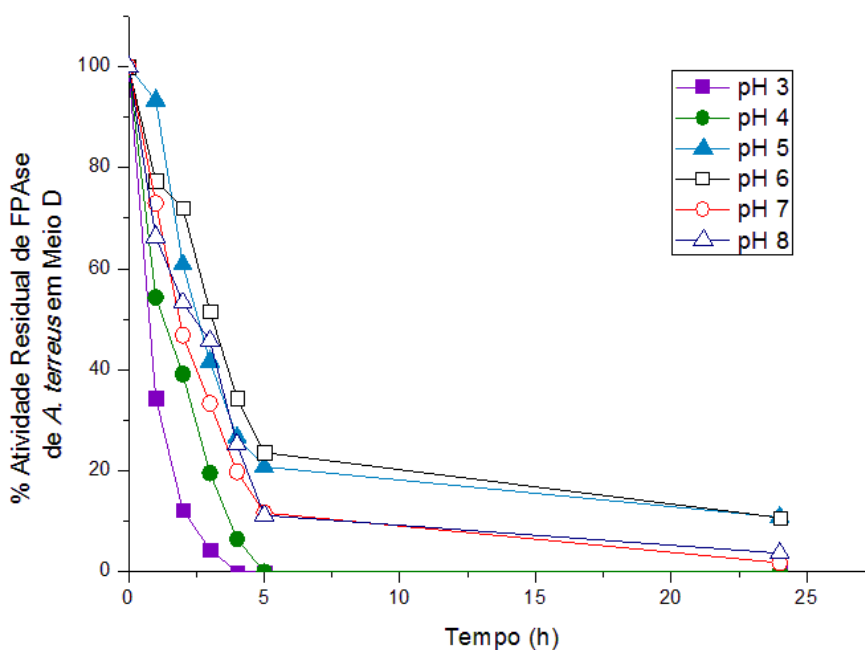


Figura 49. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D por tempo, variando o pH. A: tempo de 0 a 24 horas; B: tempo de 0 a 5 horas.

A maior atividade para uma hora de incubação foi a do pH 5 (93,3%) seguida do pH 6, 7 e 8 (77,4; 73,0 e 66,4% respectivamente). Os pH 3 foi, novamente, o que forneceu menores atividades residuais, sendo que na primeira hora de incubação a atividade enzimática teve um decaimento de 65,5% de atividade. No maior período de incubação, a atividade residual nos pH 5 e 6 foram de 10%. Para os demais pHs as atividades residuais atingiram valores próximos de zero.

5.4.6.2. Estabilidade à Temperatura

5.4.6.2.1. β -Glicosidase

Os valores de atividade específica de β -glicosidase de *A. terreus* produzida em meio D e sua atividades residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 50 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 45.

A maior atividade residual foi observada para a temperatura de 40°C em uma hora de incubação (99,3%), porém, há uma queda considerável na atividade no ponto de duas horas de incubação, sendo a queda de 57,7% em relação ao ponto de uma hora. Para a temperatura de 30°C *A. terreus* apresentou pico em 30 minutos de incubação (91,2%) , após uma queda inicial, porém sua atividade se manteve elevada até quatro horas de incubação.

Na temperatura de 50°C também foi observado um pico de atividade máxima em uma hora de ensaio (83,3%). Enquanto na temperatura de 60°C ocorreu em apenas 30 minutos de ensaio (79,8%) assim como a de 30°C. Nas temperaturas de 70 e 80°C as atividades enzimáticas máximas ocorreram em duas horas de incubação (52,8 e 66,4% respectivamente). Todas as temperaturas apresentaram uma queda considerável de atividade após as cinco horas de incubação, sendo nas temperaturas de 50 e 80°C as menores atividades.

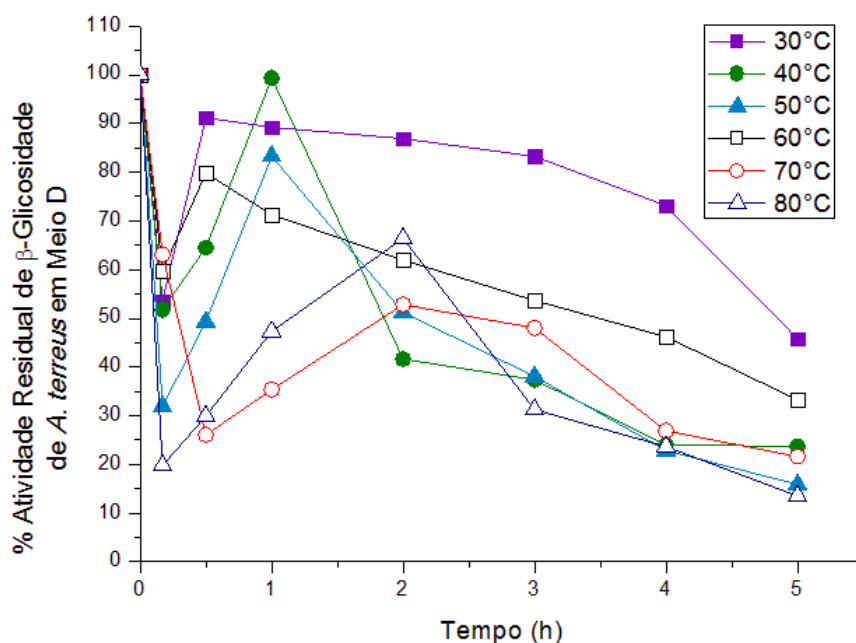


Figura 50. Porcentagem de atividade residual de β -Glicosidase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função da temperatura.

5.4.6.2.2. Endoglucanase

Os valores de atividade específica de endoglucanase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 51 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 46.

A atividade máxima de endoglucanase foi observada para a temperatura de 50°C após o período de 10 minutos de incubação, 136,0%. Contudo, há uma queda de atividade enzimática logo após o pico de atividade, sendo a queda de 74,1% em relação ao pico aos 30 minutos e uma queda de 93,3% da atividade, em relação à máxima atividade, após 1 hora de incubação.

Na temperatura de 40°C ocorreu uma atividade superior ao 100% no período de 10 minutos de incubação (109,4%), porém também houve uma queda de atividade em 30 minutos de 54,7% . A temperatura de 30°C obteve sua atividade máxima em 30 minutos de incubação (96,9%) e também sofreu uma queda no ponto seguinte, sendo este decaimento da

atividade enzimática de 33,5% em relação ao pico máximo. As temperaturas de 60,70 e 80°C tiveram suas atividades máximas no ponto de três horas de incubação (69,0; 95,8 e 103,4% respectivamente).

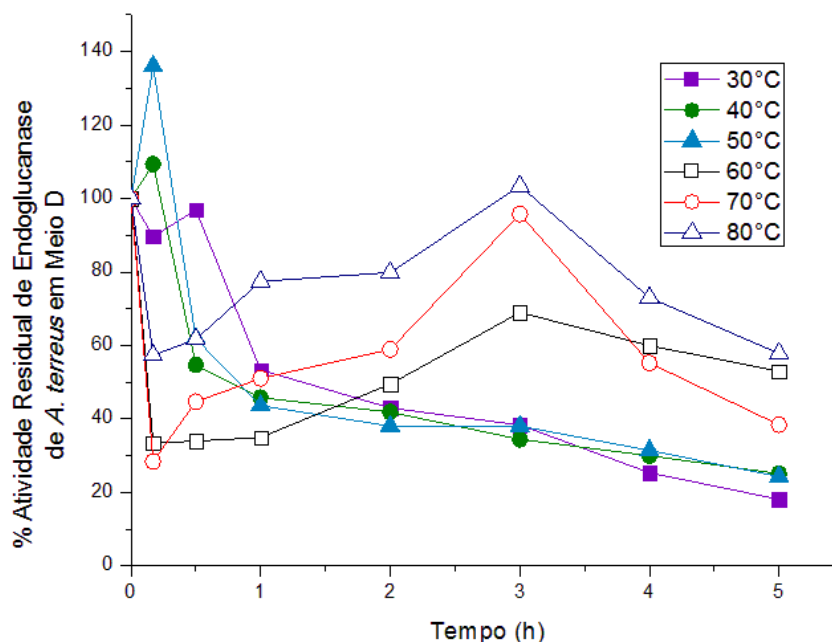


Figura 51. Porcentagem de atividade residual de Endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função da temperatura.

5.4.6.2.3. Exoglucanase

Os valores de atividade específica de exoglucanase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 52 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 47.

A maior atividade enzimática foi muito similar para três temperaturas, 30°C, 50°C e 70°C. Na temperatura de 50°C a atividade máxima ocorreu em três horas de incubação (160,8%) e as temperaturas de 30°C e 70°C tiveram sua atividade máxima em duas horas de incubação (151,7 e 154,7% respectivamente). Contudo, ambas temperaturas possuem quedas após a sua atividade máxima, sendo 37,1% para a temperatura de 30°C, 91,% para de 50°C e 98,2% para 70°C.

As temperaturas de 40 e 60°C possuem perfis similares até o ponto de três horas de incubação, sendo suas atividades máximas em 10 minutos de incubação (95,6 e 94,6% respectivamente), e se mantêm constantes até três horas. Após este ponto, a atividade de Exoglucanase sofre uma queda de atividade, chegando ao valor de 20% de atividade residual. A temperatura de 80°C apresentou um pico de atividade menor do que as demais temperaturas em uma hora de incubação (63,3%)

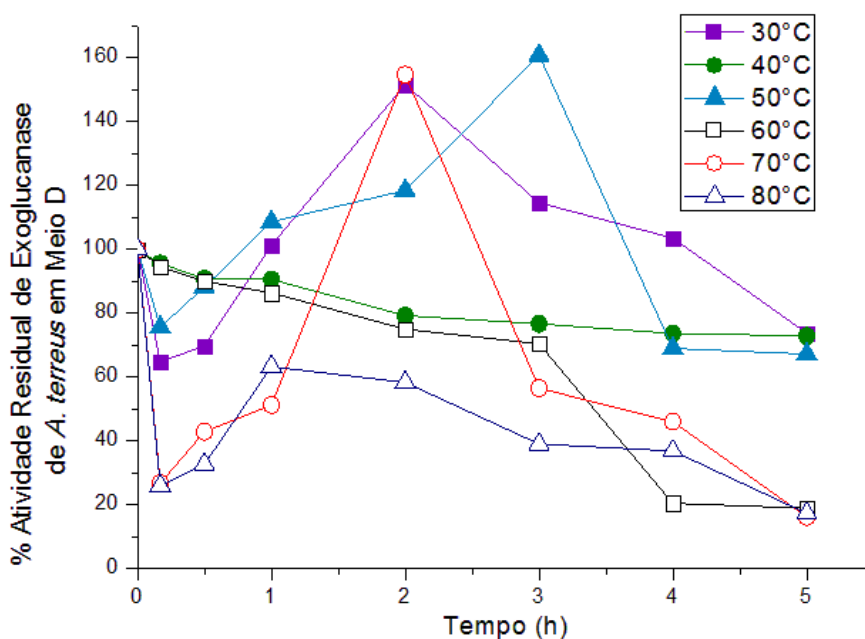


Figura 52. Porcentagem de atividade residual de Exoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função da temperatura.

5.4.6.2.4. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os valores de atividade específica de FPase de *A. terreus* produzida em meio D e a sua atividade residual após a incubação em diferentes temperaturas podem ser visualizadas na Figura 53 e os valores de atividade específica e porcentagem de atividade estão contidos no Anexo I, Tabela 48.

A maior atividade de FPase foi observada no período de 10 minutos de incubação para a temperatura de 50°C (116,8%).

Na temperatura de 40°C a atividade se manteve alta até três horas de incubação, fornecendo a maior atividade residual após 5 horas de incubação. A temperatura de 30°C possui um máximo de atividade enzimática em 30 minutos de incubação, 79,5%, seguida de uma queda acentuada da sua atividade. As temperaturas de 60 e 70°C possuem máximos de atividades em duas horas, sendo 89,9 e 76,3% respectivamente. Na temperatura de 80°C atividade máxima ocorreu após uma hora de incubação (83,3%).

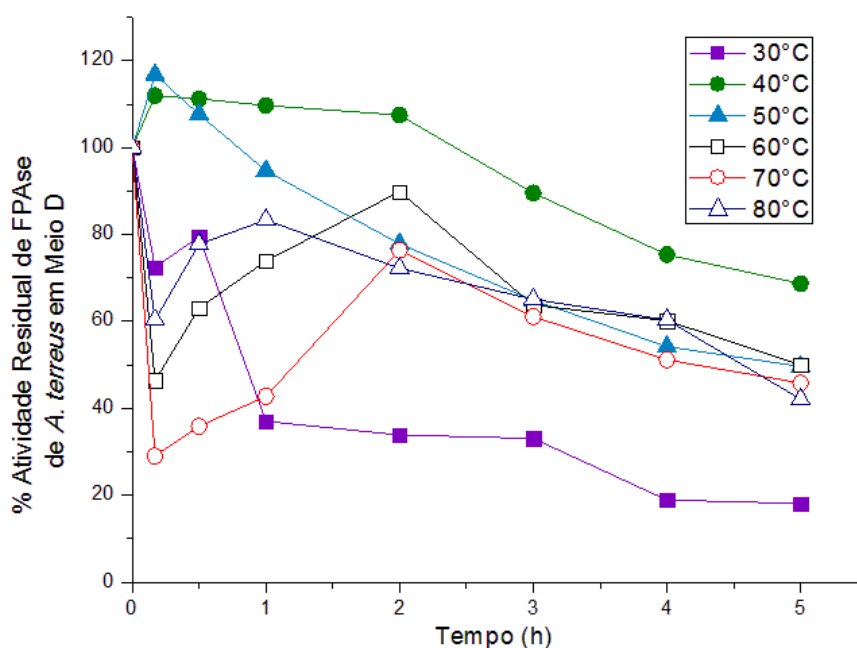


Figura 53. Porcentagem de atividade residual de FPase produzida por *Aspergillus terreus* no Meio D em função da temperatura.

5.5. Perfil de Atividade Enzimática por Tempo de Incubação

As enzimas produzidas no meio de cultura D, contendo o CMC, foi cultivada com sete dias e este extrato enzimático bruto foi utilizado para os testes de cinética enzimática que estão dispostos na Figura 54.

A β -glicosidase foi à única que apresentou um perfil crescente da atividade, não demonstrando decréscimos de atividade após trinta minutos de reação. A endoglucanase teve seu pico de atividade específica no tempo de trinta minutos de ensaio, decaindo em quarenta e cinco minutos e mantendo praticamente constante no tempo de sessenta minutos. A

exoglucanase obteve seu pico de atividade específica em sessenta minutos de reação e decrescendo após esse tempo enquanto que a FPAse teve sua maior atividade específica em cento e vinte minutos de reação decaindo a atividade em cento e cinquenta minutos e se mantendo relativamente constante em cento e oitenta minutos.

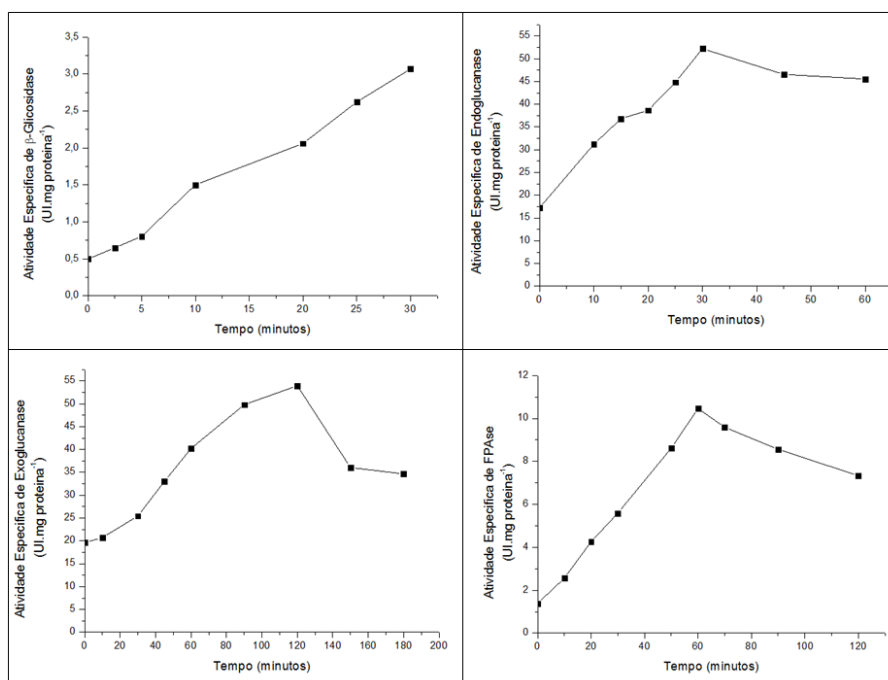


Figura 54. Perfil de Atividade Enzimática por tempo de incubação do Extrato Enzimático Bruto produzido pelo Meio D. (A) β -glicosidase; (B) Endoglucanase; (C) Exoglucanase; (D) FPAse.

5.6. Purificação Parcial

As purificações foram realizadas por métodos de precipitação com solvente (etanol e acetona) e por sal (sulfato de amônio a 75%), entretanto a precipitação com etanol foi realizada de duas maneiras distintas, a precipitação única seguida de ressuspensão no menor volume de tampão citrato de sódio 50mmol pH 5 e uma precipitação tripla, ou seja, precipitando no mesmo recipiente com novas amostras de EEB e precipitando o sobrenadante com proporções 1:3 de etanol gelado. A precipitação com acetona foi em uma etapa única para minimizar o ocorrido com a precipitação do etanol. O extrato enzimático dialisado foi avaliado sem liofilizar assim como o macerado dos sacos de diálise para observação das perdas de enzimas que poderiam ficar retidas na membrana de celulose. Os resultados das

atividades específicas e taxas de recuperação da atividade enzimática podem ser visualizadas na Tabela 9.

Pode-se observar que as atividades enzimáticas de β -glicosidase, exoglucanase e FPase obtidas através de precipitação por solventes foram superiores a precipitação por sulfato de amônio seguida da diálise. Analisando o teor de proteínas, a precipitação por sulfato de amônio foi a que mais reteve proteínas, contudo não manteve a atividade das enzimas, sendo a precipitação por solventes e o macerado da diálise obteve uma quantidade proteica bastante similar. A β -glicosidase teve sua maior porcentagem de recuperação para a metodologia de precipitação por acetona (63,68%) seguida de precipitação única com etanol (57,40%).

Tabela 9. Análise da atividade específica das enzimas celulolíticas após processos de purificação parcial e taxas de recuperação

	Proteína ^a	β -Glicosidase ^b	Endoglucanase ^c	Exoglucanase ^c	FPase ^c
EEB	0,0018	2202,79	116,69	30,57	33,57
Etanol^d	0,0023	1264,33	37,93	11,89	12,60
%^h	127,8110	57,40	32,51	38,91	37,52
Etanol^e	0,0022	122,81	5,86	0,00	0,00
%^h	122,3520	5,57	5,02	0,00	0,00
SAD^f	0,0038	273,76	14,11	7,70	12,69
%^h	211,2540	12,43	12,09	25,18	37,81
MSAD^g	0,0022	0,00	0,00	6,71	0,00
%^h	125,4700	0,00	0,00	21,99	0,00
Acetona	0,0227	1402,76	26,66	43,35	34,98
%^h	1273,2400	63,68	22,84	141,67	104,22

^a mg proteína

^b nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹

^c μ mol.min⁻¹.mg proteína⁻¹

^d Precipitação única

^e Precipitação tripla

^f Sulfato de Amônio e Diálise

^g Macerado Sulfato de Amônio e Diálise

^h Porcentagem de Recuperação

A endoglucanase foi a enzima que apresentou menor porcentagem de recuperação enzimática, sendo que a maior recuperação quando utilizou-se o etanol com precipitação única (32,51%). A β -glicosidase, exoglucanase e FPase obtiveram as maiores atividades residuais na precipitação única por acetona (65,68; 141,67 e 104,22% respectivamente), sendo que as atividades residuais de exoglucanase e FPase ultrapassaram 100%. Pode-se notar que

os melhores métodos de precipitação foram semelhantes em relação às enzimas exceto para endoglucanase. O macerado da membrana de diálise forneceu resultados interessantes quanto à recuperação enzimática, visto que para a β -glicosidase, endoglucanase e FPAse a atividade enzimática e a recuperação foram de 0%. Contudo houve atividade de exoglucanase presente, aproximadamente de 22%. Pode-se inferir que a exoglucanase fica retida na membrana de celulose.

Apesar da perda da atividade, a escolha da purificação parcial foi pela acetona, pois houve uma maior recuperação das duas enzimas, β -glicosidase e exoglucanase e maior recuperação para o complexo celulolítico.

5.7. Eletroforese

O complexo enzimático parcialmente purificado de *A. terreus* por precipitação por acetona foi concentrado a uma concentração proteica de $0,85 \text{ mg.mL}^{-1}$ para aplicação no gel de eletroforese desnaturante. Foi utilizado um padrão de celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma) e peso molecular para proteínas (ColorBurst - Sigma) em um gel de 10% com 10 poços. O resultado da eletroforese corada por solução de Comassie Blue é visualizado na figura 55. O gel foi analisado através do *software* GelAnalyzer que forneceu através do peso molecular do padrão, o peso molecular das celulases de *T. reesei* e das celulases de *A. terreus* parcialmente purificado, foram 40 kDa e 74 kDa respectivamente.

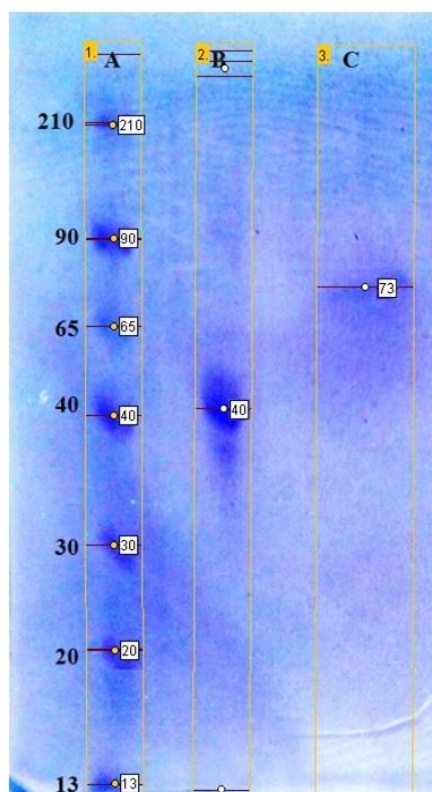


Figura 55. Eletroforese desnaturante em gel de 10%. A) Padrão de peso molecular (10 μ L); B) Padrão de Celulase de *Trichoderma reesei* (30 μ g/mL); C) Complexo enzimático parcialmente purificado de *A. terreus* (35 μ L).

5.8. Biodegradação de bagaço de Cana *in natura* e pré-tratado

A composição química do bagaço *in natura* e do bagaço pré-tratado com sulfito-alcalino foram realizadas pelos alunos do professor Dr. Fernando Masarin conforme descrito no item 4.3.13. e está descrita na tabela 10.

Tabela 10. Composição química de bagaço de cana *in natura* e tratado com sulfito-alcalino.

Amostra Bagaço	Rendimento do Material Tratado (g/100g de Bagaço)	Componentes do Bagaço (g/100 g de Polpa Básica)		Componentes do bagaço (g/100 g de Bagaço Original)	
		Lignina (%)	Celulose (%)	Lignina (%)	Celulose (%)
Não Tratado	100	21.9 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 2.5	21.9 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 2.5
Tratado com Sulfite-alcalino	64.2	8.2 $\pm$ 0.1	52.7 $\pm$ 2.7	5.3 $\pm$ 0.1	33.9 $\pm$ 1.1

Pode-se observar que o pré-tratamento com sulfito-alcálico reduziu cerca de 4,1 vezes a quantidade de lignina presente no bagaço *in natura* em relação ao Bagaço Original e a celulose manteve-se estável.

O cromatograma obtido através de CLAE pode ser visualizado na figura 56. O cromatograma da hidrólise do bagaço de cana com a enzima parcialmente purificada de *A. terreus* pode-se observar picos aos seis e oito minutos que podem ser devido a uma degradação parcial do bagaço de cana gerando celubiose no processo de hidrólise e o pico após os nove minutos é referente à glicose. No cromatograma da hidrólise do bagaço de cana por Cellic Cetec2 o pico próximo de seis minutos negativo referente a água, um pico a partir de nove minutos que é referente à glicose e ,logo após, um pico referenteas as pentoses e hexoses resultantes da degradação da hemicelulose, como xilose. Pode-se inferir, que o complexo de enzimas produzidas por *A. terreus* no meio D e parcialmente purificado por acetona não possui xilanases, pois não há pico de xilose logo após ao pico de glicose.

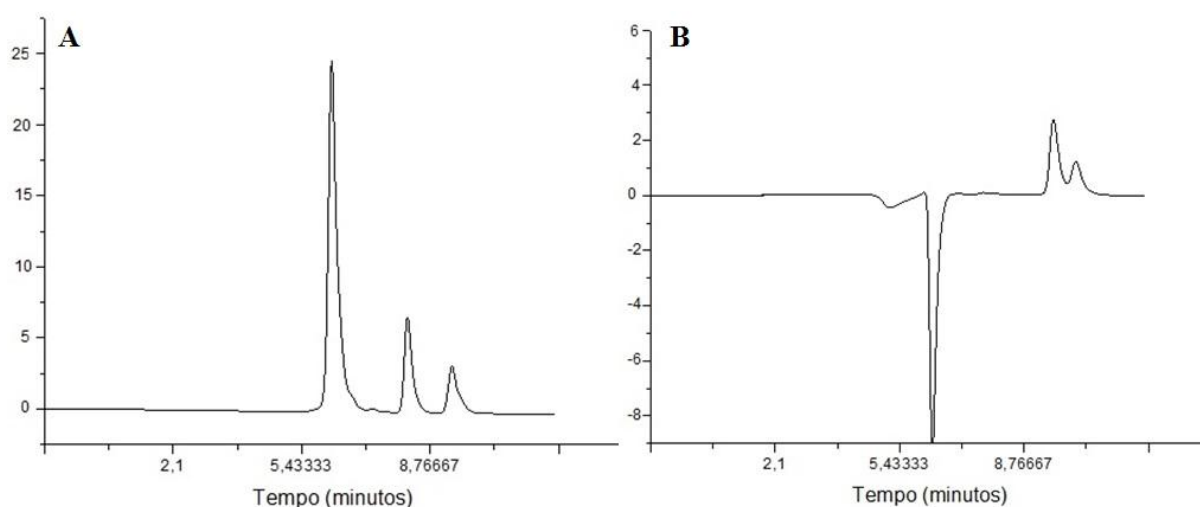


Figura 56. Cromatogramas de CLAE coluna BIORAD AMINEX HPX-87H, com ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ a 85°C, por 12 minutos de corrida. A) Cromatograma da hidrólise por enzima de *A. terreus*; B) Cromatograma da hidrólise por Cellic Cetec2.

Assim, na tabela 11 estão presentes as porcentagens de conversão da celulose em glicose por tempo para o bagaço de cana *in natura* e tratado com sulfito-alcálico tanto para as enzimas parcialmente purificadas de *A. terreus* quanto para a enzima comercial Cellic Cetec2. Na figura 57, está apresentada a porcentagem de conversão da celulose.

Tabela 11. Porcentagem de Conversão de Celulose em glicose por tempo de hidrólise.

% Conversão Celulose		Tempo (horas)				
		4	8	24	48	72
Enzima	<i>in Natura</i>	11,35 ± 0,52	10,66 ± 0,21	11,71 ± 0,13	12,20 ± 0,30	13,00 ± 0,49
<i>A. terreus</i>	Tratado	7,69 ± 0,10	8,40 ± 0,28	9,04 ± 0,07	9,47 ± 0,13	9,80 ± 0,26
Cellic	<i>in Natura</i>	5,11 ± 0,35	6,62 ± 0,69	9,03 ± 0,78	11,67 ± 0,19	11,99 ± 0,35
Cetec 2	Tratado	21,37 ± 0,72	31,16 ± 1,34	59,95 ± 1,14	71,25 ± 2,53	77,57 ± 1,53

Pode-se observar que a porcentagem de conversão da enzima comercial Cellic Cetec2 é cerca de 6 vezes superior a da enzima parcialmente purificada de *A. terreus* produzida neste estudo para o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Contudo, quando analisado o bagaço de cana *in natura*, através das médias e desvios padrões, pode-se notar que os valores da enzima parcialmente purificada de *A. terreus* foi superior a da enzima comercial Cellic Cetec2 nos tempos de 4 e 8 horas de hidrólise e mantendo a mesma atividade que a comercial nos demais tempos analisados.

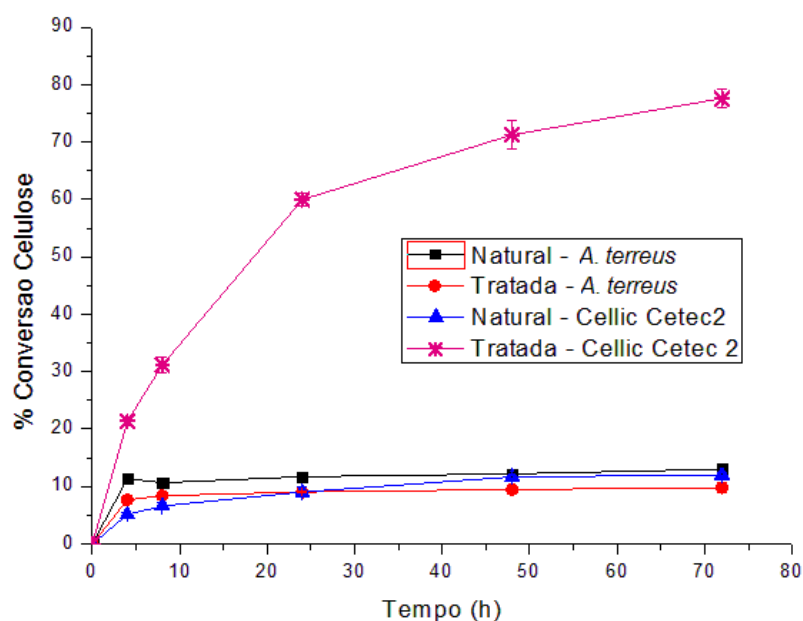


Figura 57. Porcentagem de conversão de celulose em glicose por tempo de hidrólise.

6. DISCUSSÃO

O estudo da influência de diferentes meios de cultura na produção de enzimas é amplamente estudado pela biotecnologia, de forma a determinar as melhores condições para

crescimento fúngico e produção de enzimas ou metabólitos secundários. Juhász et al. (2005) estudaram a produção das enzimas celulolíticas de *T. reesei* RUTC30 em diferentes fontes de carbono pré tratadas com vapor como abeto, salgueiro, palha de milho e celulose Solka Floc. Juhász et al. (2005) observaram para a atividade de FPAse houve uma similaridade entre os substratos utilizados enquanto que para endoglucanase a maior produção foi obtida pelo cultivo com Celulose Solka Floc, seguida de salgueiro. Para exoglucanase, a maior atividade foi observada para o cultivo com salgueiro pré-tratado seguido de abeto e para β -glicosidase a maior atividade obtida no cultivo de abeto pré-tratado por vapor seguido do cultivo com celulose Solka Floc, demonstrando as diferenças que são obtidas pelas diferentes fontes de carbono. Domingues et al. (2000) também estudaram a influencia do meio de cultura na estrutura micelar e na produção de celulasas por *T. reesei* RUTC30. Os diferentes meios continham em sua composição uma fonte de carbono e uma solução de sais. O meio (1) continha lactose; meio (2) continha lactose e metade da concentração de sais; meio (3) possuía lactose e Tween 80; meio (4) continha Tween 80, extrato de levedura, peptona e lactose como fonte de carbono; meio (5) continha Tween 80, extrato de levedura, peptona e celulose Solka Floc como fonte de carbono. O resultado observado por Domingues et al. (2000) demonstrou que a mais atividade de FPAse foi obtida no cultivo do meio 5 seguido do meio 4,1,3 e por fim o meio 2, sendo a atividade obtida do cultivo do meio 5 4,4 vezes maior do que o meio 2, demonstrando assim a importância do estudo da influência do meio de cultura na produção enzimática.

Neste trabalho estudamos a influência do meio de cultura com diferentes fontes de carbono e composição, além da sua curva de produção enzimática a fim de determinar as melhores condições de cultivo, tanto em composição do meio de cultura quanto no dia de maior produção e com estes resultados determinar o fungo com maior capacidade de produção enzimática.

A análise da influência composição do meio pelo delineamento fatorial demonstrou que apesar do meio oito ser promissor a todas as enzimas, β -glicosidase, endoglucanase e exoglucanase, sendo as variantes positivas presentes e as negativas ausentes, os valores de confiança não foram satisfatórios (com $p < 0,05$) para todos os 16 ensaios. Comparando o ensaio de triplicata do ensaio 8 com o ensaio 8 original, a quantidade de proteína obtida na triplicata foi cerca de 10 vezes superior a da original, sendo que a o desvio padrão das triplicatas foi de apenas 0,001, portanto, como a atividade específica é dada pela atividade enzimática dividida pela quantidade de proteína, a variação de proteínas produzidas pelo microrganismo pode ser a causa da baixa confiança. Na literatura, são escassos os artigos de delineamento fatorial de Plackett & Burmann para as enzimas do complexo celulolítico, encontrado apenas o estudo de Youssef & Berekaa (2009) que avaliaram a composição do meio na produção de endoglucanase de *A. terreus* isolado de solo de jardim, com doze variáveis que resultaram em níveis de confiança $p < 0,05$ para sete variáveis estudadas. Contudo, para outras enzimas como xilanase para *A. terreus* isolado de solo estudado por Ghanem et al (1999) no qual apenas duas das sete variáveis obtiveram valores de $p < 0,05$. Assim como o delineamento fatorial do meio de cultura por Plackett & Burman estudado por Li et al (2007) no fungo *Alternaria mali* na produção de xilanase no qual apenas três das dez variáveis estudadas obtiveram valores significativos de confiança. Dessa forma, pode-se perceber que a confiabilidade quando relacionada com enzimas é complexa de atingir pois depende de vários fatores.

A β -glicosidase no meio A teve sua maior atividade para os fungos *A. niger* e *A. terreus* (2,71 UI.mg proteína⁻¹ e 8,10 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente). No meio B, as maiores produções foram observadas para o *A. niger* e *A. terreus* novamente (6,80 UI.mg proteína⁻¹ e 5,47 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente), no meio C, as maiores produções foram do *A. terreus* e *T. reesei* QM9414 (3,85 UI.mg proteína⁻¹ e 2,10 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente). Por fim, no meio D, as maiores produções de β -glicosidase foram obtidas nos fungos *P.*

simplicissimum e *A. terreus* (17,02 UI.mg proteína⁻¹ e 10,79 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente).

Para a enzima endoglucanase, a maior produção enzimática para o meio A foi do *A. niger* (49,59 UI.mg proteína⁻¹) e para os meios B, C e D foi o *A. terreus* (171,69 UI.mg proteína⁻¹; 36,49 UI.mg proteína⁻¹ e 230,65 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente). Para a enzima exoglucanase, a maior produção para o meio A foi do *A. niger* (68,43 UI.mg proteína⁻¹), para o meio B, *T. reesei* QM9414 e *A. terreus* (33,51 UI.mg proteína⁻¹ e 19,54 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente), o meio C foram os microrganismos *P. simplicissimum* e *T. reesei* QM9414 (38,09 UI.mg proteína⁻¹ e 30,47 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente) e finalmente para o meio D, a maior atividade de exoglucanase foram do *Aspergillus* sp e *P. simplicissimum* (78,09 UI.mg proteína⁻¹ e 64,07 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente).

A atividade celulolítica total, FPase, teve os maiores valores no meio A para os fungos *A. terreus* e *T. reesei* QM9414 (40,10 UI.mg proteína⁻¹ e 39,30 UI.mg proteína⁻¹, respectivamente). No meio B, o microrganismo com maior atividade de FPase foi o *A. terreus* no dia 8 (54,51 UI.mg proteína⁻¹). No meio C, a maior atividade foi observada para o cultivo com *P. simplicissimum* (68,98 UI.mg proteína⁻¹) e por fim, no meio D, as maiores atividades foram obtidas para *T. reesei* QM9414 e *A. terreus* (194,14 UI.mg proteína⁻¹ e 180,06 UI.mg proteína⁻¹ respectivamente). Dessa forma, para dar continuidade ao trabalho, foram escolhidos o *A. niger* em meio A, *P. simplicissimum* em meio C, e nos meios B, C e D o *A. terreus*, os quais foram cultivados nos dias de maior produção enzimática e o extrato enzimático bruto obtido foi submetido à análise de estabilidade frente ao pH e a temperatura.

Para o Meio A, as enzimas produzidas quando em contato com o pH 3 possuíam perfil enzimático semelhantes, sendo a maior atividade enzimática em uma hora a β -Glicosidase e enquanto todas as enzimas atingiram 0% de atividade após 24 horas de incubação. Para o pH 4, a endoglucanase, exoglucanase e FPase mostraram perfis similares após duas horas de ensaio. No pH 5, por sua vez, as enzimas exoglucanase e β -glicosidase

apesar de possuírem perfil semelhante de estabilidade, diferem no remanescente da atividade e outro fato a ser observado é que ambas possuem atividade remanescentes após 24 horas de incubação. No pH 6, novamente as enzimas exoglucanase e β -glicosidase se assemelham quanto à estabilidade, mas diferem do pH 5, pois no pH 6 a atividade remanescente maior é da β -glicosidase. Ambas as enzimas possuem atividades remanescentes após 24 horas de incubação em pH 6. Entretanto, outra diferença entre o pH 5 e pH 6 é que neste a atividade de FPAse é mais elevada, superando a exoglucanase a partir de duas horas até a cinco horas de incubação. No pH 7, as enzimas endoglucanase e FPAse possuem similaridades quanto à sua estabilidade, entretanto, como já observado para os demais pHs a FPAse tende a 0% de atividade. No pH 8, o comportamento da endoglucanase, exoglucanase e FPAse foi semelhante quanto à estabilidade. A enzima β -glicosidase, ao contrário, apresenta perfil similar aos pHs 5, 6 e 7, mantendo atividade praticamente constante durante as 24 horas de incubação. Para o *Aspergillus niger* em meio A, a β -glicosidase pode ser comparada quanto à estabilidade frente a diversos pH com a enzima de outras linhagens. Yan & Lin (1997) estudaram uma β -glicosidase glicose tolerante purificada de *Aspergillus niger* CCRC 31494 quanto à atividade e estabilidade em pHs de 2,0 a 9,0. O procedimento foi semelhante ao tempo de 24 horas de incubação realizado neste trabalho e o pH 5 considerado como 100%. Comparando os resultados, o pH 5 apresentou a maior atividade específica. Entretanto, houve divergências no perfil da estabilidade enzimática. Outro artigo que analisa a estabilidade frente ao pH de β -glicosidase é o de Peshin & Mathur (1999) que analisaram a β -glicosidase purificada de *A. niger* 322 sendo o ensaio de estabilidade realizado por apenas trinta minutos nos pHs de 2,0 a 8,5. O pH cuja atividade específica forneceu o maior valor foi considerado o 100% de atividade relativa. Enquanto no pH 3, a enzima de *A. niger* CCRC 31494 apresentou cerca de 20% de atividade remanescente após 24 horas, e no fungo por nós estudado a atividade foi de 0%. Para os pHs 5, 6 e 7 foram bem similares, porém para o pH 4 e 8 o *A. niger* CCT 7687 aqui estudado mostrou resultados superiores. Ainda podemos notar

que nos pHs 3, 4, 5 e 5,5 os valores na cepa de *A. niger* 322 foram de 100% e houve decaimento nos pHs subsequentes. A cepa *A. niger* CCT 7687 por nós estudada para os pHs 5, 6 e 7 possui atividades remanescentes muito semelhantes, apenas diferindo nos pHs 3 e 4. Podemos ressaltar que pH no 8, o *Aspergillus niger* estudado por nós teve atividades remanescentes 1,5 e 1,36 vezes maior que os artigos citados.

A endoglucanase estudada neste trabalho, *Aspergillus niger* CCT 7687, foi comparada quanto a sua estabilidade frente ao pH com a endoglucanase provenientes de diferentes cepas de *A. niger*. Chinedu et al. (2011) , que estudaram endoglucanase purificada parcialmente de *Aspergillus niger* ANL301 frente a diferentes pHs numa faixa de 3,0 a 9,0, sendo considerado 100% a atividade obtida em pH 5,5. Comparando com *A. niger* CCT 7687 aqui estudado, o pH máximo foi o de 6, muito próximo ao do *A. niger* ANL301. Nos pHs 3 e 4, a atividade residual da endoglucanase parcialmente purificada de *A. niger* ANL 301 foi similar ao do nosso estudo. Quay et al. (2011) analisaram a enzima endoglucanase do *Aspergillus niger* ATCC 10574, expressa em levedura *Pichia pastoris* e purificada em pH na faixa de 2 a 8. Neste ensaio, a enzima foi incubada na ausência do substrato por 30 minutos apenas e depois retornada às condições normais para a medida da atividade residual. O máximo de atividade foi considerado o pH cuja atividade residual forneceu o maior valor, que neste caso se manteve em 100% nos pHs 3, 4 e 5, enquanto para uma hora de incubação do *A. niger* CCT 7687 estudado por nós a maior atividade foi no pH 5. Todas as atividades remanescentes de Quay et al. (2011) foram superiores ao do nosso trabalho, exceto no pH 8 no qual a endoglucanase de *A. niger* CCT 7687 manteve uma atividade residual 1,7 vezes maior.

Quanto à estabilidade térmica da β -glicosidases produzidas em Meio A pelo *Aspergillus niger* CCT 7687 incubada a 70°C demonstrou a menor atividade remanescente quando comparada às demais temperaturas, enquanto que na temperatura de 40°C foi 53,4 vezes maior e também nas temperaturas de 30°C e 50°C foram muito superiores (31,4 e 31,8 vezes maior) que a atividade encontrada em 70°C. O mesmo fato aconteceu para

exoglucanase que na temperatura de 80°C forneceu a menor atividade remanescente, sendo as temperaturas de 40°C, 50°C e 70°C superiores (2,5; 2,4 e 3,2 vezes maior). Analisando o complexo enzimático nas diferentes temperaturas para *A. niger* cultivado em meio A, a temperatura de 40°C mostrou picos de atividade para exoglucanase e FPase em duas horas e para β -glicosidase em uma hora de incubação, enquanto que a endoglucanase possui um perfil de decaimento acentuado. Na temperatura de 50°C ficou demonstrado que a exoglucanase e FPase produziram o máximo de atividade em duas horas e a endoglucanase e β -glicosidase em uma hora. Na temperatura de 60°C as atividades máximas para exoglucanase e FPase ocorreram em 30 minutos, enquanto a β -glicosidase e endoglucanase decaem rapidamente a partir de 10 minutos e mantêm-se baixas durante todo ensaio. Para 70°C houve um pico de atividade remanescente de exoglucanase ultrapassando os 100% enquanto as demais enzimas sofreram queda acentuada em 10 minutos e mantiveram-se durante todo período restante. Podemos sugerir que a β -glicosidase produzida por *A. niger* CCT 7687 em meio A é altamente sensível a temperatura de 80°C, a qual é quase totalmente eliminada após cinco horas (2,5% de atividade residual).

A endoglucanase produzida por *A. niger* CCT 7687 no meio A é comparada quanto à sua estabilidade térmica à enzima endoglucanase de *Trichoderma reesei* expressa em *Aspergillus niger* D15 e purificada por Rose et al. (2002) que analisaram temperaturas nas faixas entre 40 a 80°C durante 180 minutos. A enzima clonada e produzida em *Aspergillus niger* D15 manteve-se superior quanto à atividade remanescente nas temperaturas de 40 a 70°C, porém na temperatura de 80°C a endoglucanase de *A. niger* CCT 7687 produzida em meio A demonstrou atividade residual semelhante no período de uma hora de incubação, e uma atividade remanescente superior durante a segunda e terceira hora de ensaio, sendo 3,26 e 2,1 vezes maior, mostrando uma maior termoestabilidade.

A exoglucanase de *Aspergillus niger* CCT 7687 produzida em meio A pode ser comparada a exoglucanase purificada de *Aspergillus niger* AS-101 estudada por Singh et al.

(1990) e a exoglucanase purificada de *Aspergillus niger* A20 estudada por Abdel-Fattah et al. (1997). Singh et al. (1990) estudaram a atividade residual em uma faixa de 50 a 70°C por 100 minutos de incubação enquanto que Abdel-Fattah et al. (1997) estudaram a faixa de 55 a 75°C pelo tempo de 75 minutos. Para as temperaturas de 50°C a atividade da cepa AS-101 foi mais estável que a estudada por nós, porém a cepa por nós estudada se mostrou mais termooestável que a de Abdel-Fattah et al.(1997). Na temperatura de 60°C após trinta minutos de ensaio a cepa de *A. niger* por nós estudada demonstrou a atividade enzimática remanescente superior às outras cepas. Todavia, nas temperaturas de 70°C, a exoglucanase de *A. niger* CCT 7687 possui atividade remanescente similar a do *A. niger* AS-101 após trinta minutos e superior e cepa A20 e em uma hora de ensaio, a atividade residual da cepa por nós estudada (CCT 7687) é 4,45 vezes maior que a AS-101 (Singh et al., 1990) e 44,45 vezes maior que a A-20 estudada por Abdel-Fattah et al (1997).

O *Aspergillus terreus* CCT 7693 cultivado em meio B demonstrou que no pH 4, as enzimas endoglucanase, exoglucanase, FPase e β -glicosidase tem um comportamento similar diferindo apenas da quantidade de atividade remanescente, sendo a exoglucanase com maior atividade residual em até cinco horas de incubação. No pH 5, a enzimas endoglucanase e FPase possuem uma queda de cerca de 42% em uma hora de incubação e as enzimas β -glicosidase e exoglucanase mantém atividades residuais até em 24 horas, sendo a atividade residual de exoglucanase maior. Nos demais pHs não há similaridades nos perfis enzimáticos. Quanto à estabilidade térmica do complexo enzimático, nas temperaturas de 30, 40 e 50°C não há similaridades de perfil de atividade residual. Na temperatura de 60°C, endoglucanase e FPase apresentaram pico de atividade máxima em quatro horas de atividade. Em 70°C a exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase apresentaram picos de atividade em três horas enquanto para a FPase ocorreu em duas horas, ressaltando que a exoglucanase ultrapassou 100% de atividade. Na temperatura de 80°C a exoglucanase apresentou atividade máxima em 30 minutos de ensaio, ultrapassando os 100% de atividade residual enquanto que a β -

glicosidase sofreu queda acentuada no decorrer da incubação, revelando que esta enzima não é estável à temperatura. A endoglucanase demonstrou queda de aproximadamente 41% durante o período de incubação.

O complexo celulolítico produzido em meio C pela fermentação do *Aspergillus terreus* CCT 7693 avaliado frente ao pH 3 demonstrou que endoglucanase, exoglucanase, FPase e β -glicosidase possuem semelhanças no decaimento da atividade residual, pois a partir de três horas não houve atividade exceto para a exoglucanase que apresentou ainda em três horas valores de atividade remanescentes. No pH 4, a β -glicosidase demonstrou maior valor para o ponto de uma hora de ensaio, seguida da endoglucanase e exoglucanase e manteve atividade residual após 24 horas de ensaio enquanto que as demais não. No pH 5, endoglucanase, exoglucanase e FPase obtiveram valores próximos após uma hora de ensaio (98,0%; 95,2% e 93,3% respectivamente). A β -glicosidase apresentou 70,84% de atividade residual em uma hora, porém após 24 horas de incubação as enzimas exoglucanase e β -glicosidase são as que apresentaram atividade residual de 27,7% e 31,5% respectivamente. No pH 6, a maior atividade residual foi encontrada para exoglucanase em uma hora de ensaio (88,3%), muito próximas às atividades residuais de β -glicosidase e FPase, 83,3% e 81,1% respectivamente, enquanto a endoglucanase demonstrou menor atividade em relação às demais enzimas. No pH 7, a maior atividade em uma hora de incubação foi a da atividade celulolítica total, FPase (73,6%), seguido de β -glicosidase (64,5%), enquanto as atividades de endoglucanase e exoglucanase foram semelhantes, 59,1% e 56,8% respectivamente. A estabilidade após 24 horas, novamente foi de β -glicosidase (24,2%), enquanto exoglucanase e FPase apresentaram baixa atividade residual (8,4% e 7,4% respectivamente). endoglucanase atingiu 0% de atividade. Para o pH 8, as três enzimas possuem valores próximos após a primeira hora de incubação, sendo a Exoglucanase a maior, seguida de β -glicosidase e endoglucanase (62,3%; 60,4% e 57,1% respectivamente), enquanto FPase forneceu a menor atividade neste período (44,8%). Após 24 horas de incubação, a β -glicosidase exibiu a maior

estabilidade (22,9%), enquanto exoglucanase e FPase demonstraram baixos níveis (2,5% e 2,4% respectivamente) e a endoglucanase não apresentou atividade enzimática residual. O efeito da temperatura afetou diferentemente as enzimas de *Aspergillus terreus* cultivados em Meio C na temperatura de 30°C. Na temperatura de 40°C maior atividade residual foi a da FPase em uma hora de ensaio (128,5%). As enzimas exoglucanase e endoglucanase demonstraram sua atividade máxima em 10 minutos de reação, 96,4% e 60,6%, respectivamente. Ainda na temperatura de 40°C a β -glicosidase apresentou máxima atividade em uma hora de incubação. A alta de atividade de FPase pode ser devido à atividade de endoglucanase e exoglucanase que fornecem grande quantidade de oligossacarídeos nos primeiros 30 minutos de ensaio, fazendo com que, quando a β -glicosidase está em seu máximo de atividade, libere quantidades elevadas de glicose. Na temperatura de 50°C a atividade máxima ocorreu para a exoglucanase em três horas de incubação (125,3%). A FPase β -glicosidase exibiram suas maiores atividades residuais em uma hora de incubação, enquanto a endoglucanase teve sua atividade máxima em apenas 10 minutos de incubação. Para as demais enzimas a temperatura de 60°C foi bastante eficiente na redução da atividade enzimática em todos os tempos de incubação. Na temperatura de 70°C a maior atividade foi a da FPase em duas horas de incubação. Novamente, como observado para a temperatura de 60°C, nesta temperatura também houve redução acentuada dos níveis das atividades para as demais enzimas. Na temperatura de 80°C a atividade de FPase foi maior em todos os tempos de incubação. Todas as enzimas nesta temperatura foram fortemente afetadas em suas atividades no decorrer do tempo de incubação.

O complexo celulolítico de *Aspergillus terreus* CCT 7693 incubado no meio D sofreu quedas acentuadas no pH 3 e todas as enzimas atingiram 0% de atividade no período de cinco horas. No pH 4, a enzima com maior atividade após uma hora de incubação foi a exoglucanase. A endoglucanase apresentou as menores atividades residuais comparada com as demais e após as 24 horas de incubação, a β -glicosidase manteve sua atividade em 25,4%

enquanto as demais chegaram a 0%. No pH 5, as atividades residuais das diferentes enzimas durante a primeira hora de incubação foram altas, mas a endoglucanase, novamente, mostrou os menores valores de atividade. A estabilidade ao pH após 24 horas de incubação foi maior para a exoglucanase, seguida da β -glicosidase e da FPase, enquanto a endoglucanase mostrou apenas 1,8% de atividade residual. Nos pH 6 e 7, os perfis das enzimas foram bem distintos e maior atividade enzimática residual foi da β -glicosidase que se manteve elevada durante todo o tempo de ensaio, enquanto a endoglucanase, novamente, apresentou as menores atividade. Enfim, no pH 8, novamente a β -glicosidase obteve as maiores atividades residuais na primeira hora e manteve-se estável após as 24 horas de incubação.

A estabilidade térmica das enzimas produzidas por *Aspergillus terreus* CCT 7693 em meio D, na temperatura de 30°C apresentou a maior atividade para a exoglucanase. A endoglucanase e FPase tem seus perfis enzimáticos muito parecidos, porém a enzima endoglucanase teve uma atividade maior que a da FPase na temperatura de 30°C. Para a temperatura de 40°C, a FPase teve maiores atividades residuais com seu pico de atividade em dez minutos de incubação, mantendo-se constante até duas horas. Esta temperatura afetou diferentemente as enzimas que apresentaram máximas atividades residuais em diferentes tempo de incubação e que após 24 horas ainda apresentaram bons níveis enzimáticos. Na temperatura de 50°C, a maior atividade enzimática residual foi observada para exoglucanase em três horas de ensaio, que foi maior que 100%, assim como as enzimas endoglucanase e FPase que ultrapassaram os 100% e tiveram suas atividades máximas em dez minutos de incubação, contudo, a atividade de β -glicosidase apresentou sua máxima atividade residual somente em uma hora. A maior atividade enzimática residual na temperatura de 60°C foi da exoglucanase em apenas 10 minutos, enquanto β -glicosidase apresentou um pico de máximo de atividade em 30 minutos, FPase em duas horas e endoglucanase em três horas. Na temperatura de 70°C, a exoglucanase foi à enzima com maior atividade residual em duas horas de ensaio, atingindo 154,7%, enquanto a FPase e endoglucanase apresentaram máxima

atividade residual em duas e três horas, respectivamente, e a β -glicosidase, em apenas 10 minutos. Nesta temperatura, todas as enzimas apresentaram níveis altos após 2h de incubação. Por fim, temperatura de 80°C a maior atividade máxima para a enzima endoglucanase ocorreu em três horas de incubação, enquanto as maiores atividades de exoglucanase e FPAse foram obtidas em uma hora de incubação e a β -glicosidase em duas horas de incubação.

As atividades remanescentes de *Aspergillus terreus* CCT 7693 produzida nos três meios de cultura (B, C e D) podem ser comparadas com um trabalho que estudou a estabilidade de β -glicosidase e endoglucanase purificadas de *Aspergillus terreus* M11 frente ao pH (GAO et al, 2008). Podemos observar que os resultados deste estudo em cinco horas foram superiores ao do CCT 7693, já que nestes pHs o fungo por nós estudado não possuiu atividade em qualquer um dos meios de cultivo, tanto para endoglucanase quanto para β -glicosidase. No pH 5 após cinco horas de incubação, as atividades residuais do *A. terreus* M11 foram superiores aos do CCT 7693, contudo após 24 horas de incubação, a enzima β -glicosidase produzida por *A. terreus* CCT 7693 no meio C forneceu uma atividade residual 4,5 vezes maior do que a encontrada para *A. terreus* M11. Por fim, no pH 7, a endoglucanase do *A. terreus* M11 foi superior (GAO et al, 2008), contudo a β -glicosidase de *A. terreus* CCT 7693 produzida nos meios B e C foi superior no tempo de 6h e para o tempo de 24 horas, as β -glicosidases produzidas em meio B, C e D mantiveram suas atividades (9,6%; 24,2% e 11,6%, respectivamente) enquanto que a β -glicosidase do *A. terreus* M11 atingiu 0%.

Outro estudo realizado por Elshafei et al (2011) avaliou a estabilidade térmica de β -glicosidase purificada de *Aspergillus terreus* NRRL 265 e verificou que nas temperaturas de 50 e 60°C, as atividades encontradas por foram superiores as de *A. terreus* CCT 7693 por nós estudado em todos os meios de cultura. Contudo, para a temperatura de 70°C as β -glicosidases produzidas nos meios B e D foram superiores àquelas encontradas para o NRRL 265, que chegou a 0% após 30 minutos de ensaio, enquanto a β -glicosidase produzida no meio B ainda mantinha 20% e a do meio D, após duas horas, manteve atividade de 52%.

A estabilidade térmica de endoglucanase de *Aspergillus terreus* RWY estudada por Sharma et al (2014) que verificou que nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C a atividade remanescente da endoglucanase foi superior a da linhagem alvo do nosso estudo (CCT 7693) em todos os meios de cultura, exceto a temperatura de 70°C, na qual o *A. terreus* RWY após três horas de ensaio possui 60% (SHARMA et al, 2014), enquanto que a enzima endoglucanase de *A. terreus* CCT 7693 produzida em meio B apresentou 71% e ressaltando que aquela produzida em meio D apresentou uma atividade residual de 96%, ou seja 1,6 vezes maior. Porém, para a temperatura de 80°C, as enzimas de *A. terreus* CCT 7693 obtiveram valores superiores de atividade remanescente que a do termofílico estudado por Sharma et al (2014), como observado para três horas de incubação, que a cepa RWY apresentou 15% de atividade, enquanto que a endoglucanase produzida meio B manteve 48%, no meio C, 19% e no meio D, 103%, ou seja, 6,9 vezes maior. Desta forma, podemos sugerir que o meio de cultura influenciou na estabilidade da atividade enzimática para os diversos meios, pois o mesmo microrganismo no meio C exibiu os menores resultados de atividade remanescente quando comparado aos meios B e D.

O complexo enzimático produzido por *Penicillium simplicissimum* CCT 7686 em meio C, no pH 3, tanto para os cultivos de 4 dias quanto para os cultivos de 13 dias, apresentaram perfis semelhantes entre a Exoglucanase e FPAse. Contudo, todas as enzimas não possuíram atividade enzimática a partir de cinco horas de incubação. Após as 24 de incubação, todas as enzimas tem sua atividade de 0%. Para o cultivo de 4 dias de *P. simplicissimum* CCT 7686 o pH 5 parece influenciar a atividade de endoglucanase após cinco horas de incubação, enquanto que para o pH 4, após quatro, já havia uma redução acentuada da atividade. Porém, para o cultivo de 13 dias com *P. simplicissimum* CCT 7686 em Meio C, pH 5, endoglucanase, exoglucanase e a atividade de celulolítica total possuem perfis similares até às três horas de incubação. A única enzima que apresentou 0% de atividade residual após as 24 horas de incubação foi a Endoglucanase. No pH 6, a atividade de

endoglucanase forneceu a maior atividade comparando às enzimas exoglucanase e FPase, para os dois períodos de cultivo. Contudo, para o período de 13 dias, a FPase possui perfil similar a exoglucanase, enquanto que para as enzimas produzidas com 4 dias de cultivo, a FPase possui valores menores que a endoglucanase e exoglucanase. No pH 7, não houve similaridades entre os períodos de cultivo, pois para o *P. simplicissimum* CCT 7686 cultivado por 4 dias a maior atividade foi da exoglucanase seguida da endoglucanase enquanto para 13 dias de cultivo, a endoglucanase que possuiu a maior atividade. No pH 8, foram obtidas similaridades entre os dias de cultivo pois para ambos a maior atividade foi da endoglucanase e ambas sofreram uma queda considerável de atividade residual chegando próximo a 0% no período de 24 horas.

Quanto à estabilidade térmica de *P. simplicissimum*, a temperatura de 30°C não há similaridades nos perfis enzimáticos das enzimas tanto para 4 dias quanto para 13 dias de cultivo. Para a temperatura de 40°C, as enzimas com maiores atividade para 4 dias de cultivo a exoglucanase (212,1%) e para 13 dias a FPase. Na temperatura de 50°C, ambos os períodos de cultivo apresentaram exoglucanase como maior atividade residual, diferindo apenas nos picos de atividade máxima, sendo uma hora para 4 dias de cultivo e duas horas para 13 dias, ressaltando também que são os picos de atividade máxima para a FPase. Para 60°C, ocorreu o mesmo fenômeno descrito para a temperatura de 50°C, contudo, para as enzimas produzidas em 13 dias, essa temperatura afetou a atividade enzimática de endoglucanase e FPase desde os primeiros minutos de incubação. A temperatura de 70°C afetou significativamente todas as atividades de todas as enzimas durante todo o período de incubação para ambos os dias de cultivo. Por fim, para a temperatura de 80°C, a maior atividade residual para 4 dias de cultivo foi da exoglucanase em apenas trinta minutos enquanto que para 13 dias de cultivo, a maior atividade foi de FPase em dez minutos. A FPase produzida em 4 dias de cultivo também teve seu pico de atividade residual em dez minutos.

A literatura sobre enzimas celulolíticas de *Penicillium simplicissimum* escassa, sendo a xilanase a principal enzima estudada. Dois trabalhos desenvolvidos por Bai et al (2013), estudaram a β -glicosidase e endoglucanase da cepa de *P. simplicissimum* H11 contudo a cepa por nós estudada apresentou atividade de β -glicosidase nas condições de cultivo.

A comparação das enzimas em todos os pH nos diferentes meios de cultura, permite visualizar o quanto a variação do meio de cultura é capaz de alterar a estabilidade enzimática. Para as enzimas endoglucanase, exoglucanase e FPAse os perfis enzimáticos em todos os pHs para todos os meios foram muito similares, principalmente para o pH 3, que afeta negativamente todas as enzimas. No pH 6, para a endoglucanase, o *Penicillium simplicissimum* cultivado por 13 dias com as maiores atividades enquanto o *Aspergillus terreus* em meio B, a menor. No pH 5, para a exoglucanase, os perfis foram similares para a enzima produzida por *A. terreus* no meio B e D, *P. simplicissimum* no meio C, contudo, a exoglucanase produzida no meio A por *A. niger* teve uma estabilidade mais elevada que os demais, permanecendo após as 24 horas de incubação enquanto a exoglucanase produzida por *A. terreus* em meio D a menor estabilidade. Para a FPAse, o perfil excludente dos similares ocorreu no pH 6, no qual a atividade celulolítica total produzida por *A. terreus* no meio B e por *P. simplicissimum* no meio C com 4 dias de cultivo, mostraram os valores menores que os demais microrganismos nos demais meios. A β -glicosidase teve o perfil semelhante apenas no pH 3, e para os demais pHs foram similares até o ponto de cinco horas de ensaio, exceto a β -glicosidase produzida pelo *A. niger* em meio A. Nos pH 4, 5, 7 e 8 a β -glicosidase produzida por *A. niger* em meio A obteve as maiores atividades enzimáticas residuais, sendo que em pH 6, foi à enzima β -glicosidase produzida por *A. terreus* no meio C. Os menores valores de atividade residual após 24 horas foram para as β -glicosidases produzidas por *A. terreus* nos meios B e D.

O efeito da temperatura em diferentes meios de cultura mostrou para a β -glicosidase, na temperatura de 30°C, que perfil entre os meios B, C e D, cultivados com *A. terreus*, foram

similares, mas a β -glicosidase produzida por *A. niger* em meio A apresentou valores superiores que os demais. Na temperatura de 40°C todas as β -glicosidases apresentaram um pico de atividade residual máxima em uma hora de ensaio, sendo a β -glicosidase de *A. niger* produzida em meio A, o maior. Na temperatura de 50°C a maior atividade de β -glicosidase foi de *A. terreus* no meio D seguida da β -glicosidase *A. niger* do meio A. Nas temperaturas de 60°C, 70°C e 80°C as maiores atividades residuais foram obtidas para β -glicosidase produzida por *A. terreus* em meio D e as menores foram a de *A. niger* em meio B. Para a endoglucanase, todos os meios de cultura foram similares na temperatura de 30°C, exceto a produzida no meio A por *A. niger*. Nas temperaturas de 40 e 50°C as maiores atividades residuais foram de endoglucanases produzidas nos meios B por *A. terreus* e as menores foram às produzidas por *Penicillium simplicissimum* em Meio C com 13 dias de cultivo e *A. terreus* em meio C, respectivamente. Nas temperaturas de 60 e 70°C, as maiores atividades foram obtidos nos meios B e D, enquanto as menores atividades foram obtidas do *Penicillium simplicissimum* em meio C cultivado por 13 dias. Na temperatura de 80°C, a atividade residual de endoglucanase produzida por *A. terreus* no meio D foi superior a todas as endoglucanases produzidas nos demais meios. As atividades de exoglucanases foram distintas entre os meios de cultura para cada temperatura, onde foram obtidas para as temperatura de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C as maiores atividades residuais de *P. simplicissimum* cultivada em meio C por 4 dias e todos os picos de máximo de atividade foram em uma hora de incubação. Na temperatura de 30°C, os demais meios de cultura mostraram perfis similares e muito menores que a exoglucanase de *P. simplicissimum* cultivada em meio C por 4 dias. Na temperatura de 40 °C a menor atividade de exoglucanase foi à obtida em *A. terreus* no meio C. Na temperatura de 50°C, os perfis foram similares para as exoglucanases produzidas em *A. niger* (meio A), *P. simplicissimum* (meio C por 13 dias) e *A. terreus* (Meio B) com picos em duas horas de ensaio e também houve similaridades entre as exoglucanases produzidas por *A. terreus* nos meios C e D, sendo estas as menores, e com picos de atividade máxima em três

horas de ensaio. Nas temperaturas de 60°C e 70°C, as menores atividades foram observadas para a exoglucanase produzida por *A. terreus* em meio C, contudo, para 70°C, as maiores atividades foram para as exoglucanases produzidas por *A. niger* (meio A) e *A. terreus* (meio D). Na temperatura de 80°C, as maiores atividades enzimáticas residuais para exoglucanase foram observadas para *A. terreus* (meio B) e *P. simplicissimum* (meio C por 4 dias) cujos picos foram em dez minutos de ensaio e a menor atividade, novamente, foi para a exoglucanase produzida por *A. terreus* no meio C.

Para a atividade celulolítica total (FPase) na temperatura de 30°C as atividades que forneceram maiores atividades residuais foram às obtidas por *P. simplicissimum* (Meio C por 13 dias) e *A. niger* (Meio A) e os demais meios de cultura tiveram atividades similares e menores que os citados. Para a temperatura de 40°C, as maiores atividades foram observadas para *A. terreus* (Meio C) e para *P. simplicissimum* (meio C por 4 dias) contudo, a atividade residual de *A. terreus* em meio D mostrou uma maior termoestabilidade, ou seja, seu perfil de queda não foi acentuado como os demais. Todos os meios de cultura mostraram um perfil de queda similares, inclusive os citados como maiores atividades enzimáticas, atingindo valores residuais baixos para a temperatura de 40°C. A FPase nas temperaturas de 50°C e 60°C não mostrou similaridades nos perfis enzimáticos, enquanto na temperatura de 70°C, as atividades foram semelhantes, porém a produzida por *P. simplicissimum* em meio C cultivada por 13 dias exibiu um pico de atividade residual em dez minutos de incubação que ultrapassou os 100%. Por fim, na temperatura de 80°C, os perfis de queda de atividade enzimática são similares, mas para as FPases produzidas em por *P. simplicissimum* (meio C por 13 dias) e *A. niger* (meio A) os picos de atividade enzimática remanescente que ultrapassaram os 100% nos tempos de trinta minutos e uma hora, respectivamente.

A cinética enzimática realizada na forma da atividade enzimática e doseada em tempos distintos forneceu uma atividade crescente a enzima β -glicosidase em relação ao tempo, obtendo valor de 3,1 UI.mg proteína⁻¹ no último tempo de trinta minutos. A endoglucanase

teve seu pico de atividade máxima com trinta minutos de ensaio e após uma queda manteve-se constante até uma hora de ensaio, a FPAse teve seu pico de atividade em uma hora de reação e decaiu sua atividade até o final dos 120 minutos de reação, e por fim, a exoglucanase obteve sua atividade máxima em 120 minutos e teve uma queda considerável da atividade enzimática. Um estudo feito com *A. terreus* NRRL 265 feito por Elshafei et al (2011) sobre a atividade em função do tempo da β -glicosidase purificada e obteve o pico de atividade enzimática em trinta minutos de reação, sendo de aproximadamente $10\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹ e se mantendo constante até sessenta minutos. Comparando com a β -glicosidase estudada por nós, a atividade máxima da enzima não foi demonstrada no tempo de incubação proposto, contudo em trinta minutos a atividade foi 3 vezes menor do que a purificada o que pode significar um potencial da enzima.

A purificação realizada por três diferentes técnicas de precipitação demonstrou que a enzima β -glicosidase teve sua melhor porcentagem de recuperação para a precipitação com acetona seguida da precipitação única com etanol. A endoglucanase por sua vez foi a enzima que teve a menor taxa de recuperação para todos as metodologias aplicadas, sendo a melhor em etanol por precipitação única. A exoglucanase foi a enzima com melhor recuperação das três que compõem o complexo celulolítica, obtendo 141,67% de recuperação na precipitação por acetona, seguida da FPAse com recuperação de 104,22%. Um estudo realizado por Gao et al (2007) na purificação da endoglucanase de *A. terreus* termoacidófilo M11 mostrou que na etapa de precipitação por sulfato de amônio o rendimento foi de 65% e a atividade enzimática específica era de $8\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹ e apesar de recuperar apenas 12,09% a atividade enzimática específica após a precipitação com sulfato de amônio foi de $14,11\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹, cerca de 1,8 vezes superior que a analisada por Gao et al (2007).

O complexo enzimático produzido e parcialmente purificado de *A. terreus* demonstrou ter peso molecular superior ao complexo comercial de *Trichoderma reesei* da Sigma, com peso de 73 kDa enquanto o comercial, 40 kDa. Uma linhagem de *Aspergillus terreus* D34 foi

estudada por Kumar et al (2015) no qual o peso molecular do complexo celulolítico foi de aproximadamente 98 kDa, demonstrando uma tendência de aumento de peso molecular no complexo.

A conversão de celulose e glicose através da hidrólise enzimática de bagaço de cana *in natura* e tratado com sulfito alcalino demonstrou que o extrato comercial de Cellic Cetec2 foi superior ao complexo enzimático parcialmente purificado de *A. terreus*, cerca de 6 vezes. Para o bagaço *in natura*, considerando as médias e dos desvios padrões, as enzimas de *A. terreus* foram superiores que a enzima comercial Cellic Cetec2 para todos os tempos de hidrólise. Mendes et al (2011) estudaram a conversão de celulose em glicose utilizando tratamento de sulfito-alcalino e *in natura* e as enzimas utilizadas foram uma mistura de preparações enzimáticas comerciais, Celluclast e Novozym 188 (Novozymes) e obtiveram uma porcentagem de conversão após 72h de hidrólise de aproximadamente 80% para o bagaço pré-tratado com sulfito-alcalino e próximo de 10% para o bagaço de cana *in natura*. Valores similares aos obtidos para a enzima comercial Cellic Cetec2 (77,57 e 11,99%, respectivamente), comparando com a enzima parcialmente purificada de *A. terreus*, sendo a hidrólise do bagaço *in natura* também foi similar após 72 h, 13,00%. Outro estudo sobre conversão de celulose em glicose foi realizado por Zhao et al (2007) no qual eles compararam diversos pré-tratamentos do bagaço de cana, dentre eles o alcalino e *in natura*, utilizando para a hidrólise Cellulase R-10, uma enzima comercial. Os resultados obtidos por Zhao et al (2007) demonstraram que até 60h de incubação para o tratamento alcalino a porcentagem de conversão de celulose foi de aproximadamente 55% e menor que 5% para o bagaço *in natura*. Desta forma, pode-se notar que para o bagaço *in natura* a porcentagem de conversão do complexo parcialmente purificado de *A. terreus* deste estudo foi superior, 13,00% após 72h.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados e das discussões podemos concluir:

- O *Aspergillus terreus* apresentou os melhores valores de produção de enzimas celulolíticas
- O meio D foi o meio que forneceu as maiores produções de celulasas.
- A composição do meio de cultura A não influenciou na produção das enzimas do complexo celulolítico analisadas através do delineamento fatorial Plackett & Burman.
- O pH 3 influencia negativamente a atividade enzimática de todas as enzimas que compõem o complexo celulolítico.
- Não houve diferenças de perfil de atividade enzimática quanto à estabilidade das enzimas produzidas por *P. simplicissimum* em meio C nos diferentes dias, tanto para pH quanto para temperatura
- As enzimas do complexo celulolítico produzidas por *A. terreus* em meio C apresentou uma baixa termoestabilidade em comparação com as enzimas produzidas por *A. terreus* em meio B e D.
- Não houve diferenças de perfil de atividade enzimática quanto à estabilidade ao pH das enzimas endoglucanase e FPAse produzidas por *A. terreus* nos meios B, C e D.
- A enzima exoglucanase é única enzima do complexo enzimático a ficar retida na membrana de celulose utilizada na diálise.
- O peso molecular das celulasas produzidas por *A. terreus* em meio D é de 73 kDa.
- A porcentagem de conversão de celulose em glicose no bagaço de cana *in natura* através da hidrólise com *A. terreus* foi superior a enzima comercial Cellic Cetec 2 para os tempos de 4 e 8 horas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, A. F.; OSMAN, M. Y. ADEL-NABY, M. A.; Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. **Chemical Engineering Journal**. v. 68, p. 189-196, 1997.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Thichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**. v.100, p.5979-5987, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, R.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for na efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. Vol. 101, 4851-4861p., 2010;

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-Industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 7, p. 163-173, 2014.

BEILEN, J.B.V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p.338-344, 2002

BELDMAN, G.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. F.; ROMBOOTS, F. M.; VORAGEM, F. G. J. The cellulose of *Trichoderma viride*: Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidases. **European Journal of Biochemistry**. v. 146, p. 301-308, 1985.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in Biotechnology. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 355-383, 2000.

BHIKHABHAI, R.; JOHANSSONM, G.; PETTERSSON, G. Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM9414. **The Journal of Applied Biochemistry**. v. 6, p. 336-345, 1984.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.

- BROWNING, B. L. **The Chemistry of Wood**. New York: Interscience Publishers, 1963.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresourse Technology**. v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- CASTRO, A.M.; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 181-188p, 2010.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an uptade. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 14, p. 438-443, 2003.
- CHIRICO, W. J.; BROWN, R. D. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**. v. 165, p.333-341, 1987.
- CHINEDU, S. N.; NWINYI, O. C.; OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; Kinetic Study and Characterization of 1,4- β -Endoglucanase of *Aspergillus niger* ANL301. **Dynamic Biochemistru, Process Biotechnology and Molecular Biology**. v. 5, p. 41-46, 2001
- CLARK, N.; STOKES, K.; MUGABE, J. Biotechnologu and development: threats and promises for the 21st century. **Futures**. v. 34, p. 785-806, 2002.
- DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W.; Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnbology**. v.30, n.4, p. 302-309. DOI: 10.3109/07388551.2010.490938. Epub 2010 Sep 24.
- DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon Forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**. v. 37, p. 243-252, 2012.
- DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, G. An Assay for Selective Determination of Exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic Enzymes. **Analytical Biochemistry**. v. 138, p. 481-487, 1984

DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 26, 394-401p.; 2000.

ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; MORSI, N. M.; ELGHONAMY, D. H.; Purification and some kinetic properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 19556-19569, 2011.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A.; HAYN, M. Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. **Bioresource Technology**. v. 36, p. 51-65, 1991.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin; New York, N.Y.: Walter de Gruyter, 1989.

GAO, J.; WENG, H.; XI, Y.; ZHU, D.; HAN, S. Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. **Biotechnology Letters**. v. 30, p. 323-327, 2008.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y.; Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 7623-7629, 2007.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**. Vol. 59, 618-628p., 2002.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**. v. 73, p. 113-121, 2000.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of Fungal Cellulases. **Bioresource Technology**. v. 36, p. 37-50, 1991.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances** v. 30, p. 1207-1218, 2012.

HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VEIT, C.; SCHULEIN, M. Synergism of cellulase from *Trichoderma reesei* in degradation of cellulose. **Biotechnology**. v. 3, p. 722-760, 1985.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A.; Modern taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. **Advances in Applied Microbiology**. v. 86, Chapter 4, p. 200-241, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>

JOUDIER, E.; BEM CHAABANE, F.; POUGHON, L.; LARROCHE, C.; MONOT, F. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p.313-218, 2012.

JUDICE, V.M.M. Competências em Internacionalização e inovação em Biotecnologia no Brasil. **Journal of Technology Management & Innovation**. v. 1, p. 95-106, 2006.

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

KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 54, p. 679-689, 2013.

KUMAR, A. K.; PARIKH, B. S.; SINGH, S. P.; SHAH, D. Use of combined UV and chemical mutagenesis treatment of *Aspergillus terreus* D34 for hyper-production of cellulose-degrading enzymes and enzymatic hydrolysis of mild-alkali pretreated rice straw. **Bioresources and Bioprocessing**. v. 2, Article 35, about 11p., 2015.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; BUFFON, J.G.; FURLONG, E. B. Endoglucanase and Total cellulase from newly Isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production,

Characterization and Thermal Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 172, p.458-468, 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, Y.; LIU, Z.; C, F.; LIU, Z.; ZHAO, H. Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 77, p. 285-291, 2007.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology economic, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**. v. 21, p. 403-465, 1996.

MARCHAND, C.; DISNAR, J.; LALLIER-VERGÈR, E.; LOTTIER, N. Early diagenesis of carbohydrates and lignin in mangrove sediments subject to variable redox conditions. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 69, p. 131-143, 2005.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic Hydrolysis of Chemithermomechanically Pretreated Sugarcane Bagasse and Samples with reduced Initial Lignin Content. **Biotechnology Progress**. v. 27, p.395-401, 2011.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; MUSSATTO, S. I. Na approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 85, p.1092-1098, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. Vol. 21, 426-428p., 1959.

MIILER Jr, J.A.; NAGARAJAN, V. The impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century. **Trends in Biotechnology**. v. 18, p.190-191, 2000.

NIKU-PÄÄVOLA, M. L.; LAPPALAINEN, A.; ENARI, T.M.; RONNIO, V. A new appraisal of the endoglucanases of the fungus *Trichoderma reesei*. **Biochemical Journal**. v. 231, p.75-81, 1985.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, p.69-80, 2000.

PESHIN, A; MATHUR, J. M. S.; Purification and Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. **Letters in Applied Microbiology**. v. 28, p. 401-404, 1999.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane bagasse Using Enzyme Extract and whole solid-state Fermentation médium of two newly Isolated Strains of *Aspergillus Oryzae*. **Chemical Engineering Transactions**. v. 38, p. 259-264, 2014.

QUAY, D. H. X.; BAKAR, F. D. A.; RABU, A.; SAID, M.; ILLIAS, R. M.; MAHADI, N. M.; HASSAN, O.; MURAD, A. M. A.; Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EgIA, in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 2101-2111, 2011.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**. v. 126, p. 249-257, 2014.

RECZEY, K.; SZENGYEK, Zs.; EKLUND, R.; ZACCHI, G. Cellulase Production by *T. reesei*. **Bioresource Technology**. v. 57, 25-30, 1996.

RODRIGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**. v. 21, p. 411-422, 1988.

ROSE, S. H.; ZYL, W. Hv.; Constitutive expression of the *Trichoderma reesei* β -1,4-xylanase gene (xyn)2 and the β -1,4-endoglucanase gene (egl) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58, p. 461-468, 2002.

ROYER, J. C.; MADDEN, K. T.; NORMAN, T.C.; LOBUGLIO, K. F.; Penicillium Genomics. **Applied Mycology & Biotechnology**. v. 4, p. 285-293, 2004.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, n.2, p. 205-211, 2004.

SALES, M.R.; MOURA, R.B.; PORTO, T.S.; MACEDO, G.R.; PORTO, A.L.F.; Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanases por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, p. 1290-1296, 2010.

SALICRUP, L. A.; FEDORKOVÁ, L. Challenges and opportunities for enhancing biotechnology and transfer in developing countries. **Biotechnology Advances**. v. 24, p. 69-79, 2006.

SALOHEIMO, M.; LEHTOVAARA, P.; PENTTILÄ, M.; TEERI, T. T.; STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETERSSON, G.; CLACYSESSENS, M.; TOMEI, O.; KNOWLES, J. K. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: The characterization of both gene and enzyme. **Gene**. v. 63, p. 11-21, 1988.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C.; Phylogeny, Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 141-173, 2014.

SHARMA, R.; KOCHER, G. S.; BHOGAL, R. S.; OBEROI, H. S.; Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. **Journal of Basic Microbiology**. v. 54, p. 1367-1377, 2014.

SHOEMAKER, S.; WATT, K.; TSITOVSKY, G; COX, R. Characterization and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27. **Biotechnology**. v. 1, p. 687-690, 1983.

SINGH, A.; AGRAWAL, A. K.; ABIDI, A. B.; DARMWAL, N. S.; Properties of Exoglucanase from *Aspergillus niger*. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 36, p. 245-253, 1990.

SOCOL, C.R.; VANDERBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. C.; BUCJERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and Perspectives. v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**. Vol. 83, 1-11p., 2002.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 1621-1651, 2008.

THEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, p. 777-780, 1982.

THEVENOT, M.; DIGNAC, M. F.; RUMPEL, C. Fate of lignin in soils: A review. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 42, p. 1200-1211, 2010.

VELKOVSKA, S.; MARTEN, M. R.; OLLIS, D. F.; Kinetic model for batch cellulose production by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of Biotechnology**. v. 54, p. 83-94, 1997.

VERMA, A. S.; AGRAHARI, S.; RASTOGI, S.; SINGH, A. Biotechnology in the Realm of History. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 3, p. 321-323, 2011.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A.; Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 343-371, 2014.

YAN, T.; LIN, C. Purification and Characterization of a Glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31491. **Biscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 61, p. 965-970, 1997.

YOON, J.H.; PARK, J.E.; SUH, D.Y.; HONG, S.B.; KO, S.J.; KIM, S.H. Comparison of Dyes for Easy detection of Extracellular Cellulases in Fungi. **The Korean Society of Mycology**. v. 21, p. 21-24, 2007.

YOUSSEF, G. A.; BEREKAA, M. M. Improved Production of Endoglucanase Enzyme by *Aspergillus terreus*: Application of Plackett-Burman Design for Optimization of Process Parameters. **Biotechnology**. v. 8, p. 212-219, 2009.

ZHAO, X.B.; WANG, L.; LIU, D.H. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 82, p. 1115-1121, 2007.

Anexo I

Lista de Tabelas das Curvas de Atividades Enzimáticas Específicas por Meio de Cultura

Tabela 1. Atividade Enzimática Específica dos fungos cultivados em Meio A por 15 dias

Enzimas	Tempo (Dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-Glicosidase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,05	0,80	1,40	0,68	0,51	0,40	0,41	0,19	0,27
<i>T. reesei</i> QM9414	0,02	0,11	0,13	0,49	0,26	0,48	1,78	0,14	0,03	0,02	0,01	0,05	0,04	0,01	0,02
<i>T. reesei</i> RUTC30	0,00	0,26	0,66	0,85	0,06	0,04	0,02	0,01	0,02	0,07	0,02	0,02	0,04	0,07	0,08
<i>A. niger</i>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,77	0,83	0,84	0,80	1,57	1,00	0,95	0,91	0,02	0,86	2,71
<i>Aspergillus sp</i>	0,00	0,00	0,12	0,96	0,30	0,18	0,31	0,72	0,22	0,23	0,29	0,73	0,53	0,45	0,16
<i>A. terreus</i>	0,00	0,57	1,40	3,31	1,97	4,69	7,98	0,51	2,01	8,10	0,88	1,84	0,91	0,49	1,12
Endoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	2,59	88,81	44,32	36,18	0,82	1,85	0,15	0,21	2,60	1,12	4,31	1,61	2,12	1,08	1,51
<i>T. reesei</i> QM9414	120,24	7,83	5,53	6,26	43,82	53,05	51,96	1,91	1,89	1,40	0,21	0,52	0,63	0,66	0,41
<i>T. reesei</i> RUTC30	170,31	9,89	5,98	1,94	0,42	0,33	0,42	2,45	0,66	1,24	2,41	1,61	2,70	2,94	1,85
<i>A. niger</i>	160,95	23,51	15,49	37,18	16,91	3,81	3,26	23,80	19,30	15,01	30,24	49,59	0,45	28,34	39,89
<i>Aspergillus sp</i>	289,49	14,50	13,16	11,03	0,05	0,44	1,06	2,18	1,88	2,23	3,36	2,14	1,25	1,75	1,13
<i>A. terreus</i>	338,32	32,91	5,75	6,61	4,47	13,43	35,95	6,91	4,17	35,32	6,12	5,91	2,41	2,62	6,34
Exoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	4,23	47,10	36,86	18,82	0,02	0,47	0,07	0,41	0,36	0,54	0,19	0,05	0,01	0,03	0,15
<i>T. reesei</i> QM9414	203,84	5,29	2,70	5,46	1,86	1,38	0,05	0,28	0,40	0,40	0,10	0,08	0,05	0,03	0,01
<i>T. reesei</i> RUTC30	80,46	5,24	3,48	2,67	0,49	0,70	1,26	0,59	0,06	0,19	0,05	0,09	0,17	0,19	0,74
<i>A. niger</i>	48,85	11,04	7,74	19,15	42,05	68,45	52,21	27,21	20,82	24,91	8,21	0,69	0,02	1,33	0,09
<i>Aspergillus sp</i>	119,44	6,74	5,36	4,95	1,17	1,72	1,88	1,92	3,70	4,02	0,79	0,30	0,06	0,20	0,06
<i>A. terreus</i>	79,46	16,71	4,36	0,89	15,65	9,60	7,10	1,42	2,09	12,37	1,20	1,27	0,24	0,11	0,13
FPase															
<i>P. simplicissimum</i>	8,11	190,80	54,60	69,06	0,02	0,74	0,12	3,60	0,07	0,01	0,44	0,16	0,16	0,15	3,06
<i>T. reesei</i> QM9414	445,71	14,10	26,33	13,75	26,47	39,30	27,80	0,78	0,28	0,14	0,26	0,96	0,56	0,71	0,55
<i>T. reesei</i> RUTC30	246,74	5,47	0,00	27,05	0,00	0,17	0,28	0,51	0,16	0,20	0,23	0,47	0,56	1,17	1,17
<i>A. niger</i>	113,33	5,98	3,32	6,82	0,15	1,57	1,70	1,75	1,47	1,00	7,93	46,73	0,25	8,98	20,08
<i>Aspergillus sp</i>	286,02	5,35	3,75	7,30	0,63	0,51	0,54	0,84	0,08	3,03	0,74	0,73	0,62	0,63	0,35
<i>A. terreus</i>	0,00	23,42	14,13	12,74	40,10	28,50	15,06	1,03	1,37	9,78	1,56	1,45	1,11	1,04	1,74

Atividade Enzimática UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$

Tabela 2. Atividade Enzimática Específica dos fungos cultivados em Meio B por 15 dias

Enzimas	Tempo (Dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-Glicosidase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,21	1,89	0,04	1,99	0,40	0,48	0,25	0,41	0,03
<i>T. reesei</i> QM9414	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	2,05	2,37	0,20	0,07	0,65	0,26	0,14	0,10	0,02
<i>T. reesei</i> RUTC30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,86	0,04	0,00	0,03	0,05	0,25	0,02	0,03	0,02
<i>A. niger</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	2,76	6,80	0,43	0,11	0,19	0,01	0,18	0,06	0,11	0,01
<i>Aspergillus</i> sp	0,00	0,00	0,17	0,24	0,08	0,03	1,08	1,20	0,65	0,18	0,20	1,19	0,29	0,33	0,03
<i>A. terreus</i>	0,00	0,00	0,35	0,23	0,04	0,86	1,00	0,81	0,04	1,11	1,29	0,55	1,93	0,61	0,03
Endoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	574,65	177,17	4,14	3,77	4,45	2,00	12,80	9,29	4,87	5,21	3,64	2,32	1,40	1,50	0,99
<i>T. reesei</i> QM9414	46,02	64,48	1,54	3,89	0,85	0,09	18,14	31,61	7,89	16,46	31,35	4,23	1,72	1,49	1,67
<i>T. reesei</i> RUTC30	532,41	20,01	5,07	6,84	0,05	1,45	5,80	2,36	1,34	5,12	2,77	15,02	1,44	1,40	8,21
<i>A. niger</i>	553,64	148,35	1,70	5,67	4,21	12,25	20,21	11,29	2,87	34,84	15,61	2,14	3,98	2,36	44,87
<i>Aspergillus</i> sp	610,44	329,36	3,11	40,74	28,17	21,01	53,80	51,12	50,63	62,27	41,87	19,84	5,67	3,14	14,10
<i>A. terreus</i>	886,59	25,81	30,11	60,05	22,93	52,56	115,02	148,63	19,50	171,69	84,55	106,34	45,05	60,62	8,29
Exoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	120,20	41,56	11,82	17,33	0,59	1,98	15,94	1,47	0,99	1,08	0,77	0,71	0,34	0,56	0,39
<i>T. reesei</i> QM9414	18,00	18,26	33,51	20,04	0,25	2,15	0,17	4,61	0,83	4,93	23,34	0,70	0,40	0,60	0,37
<i>T. reesei</i> RUTC30	215,45	10,34	13,57	20,62	0,11	4,05	1,51	0,45	0,20	1,77	,	2,81	0,24	0,79	0,31
<i>A. niger</i>	160,09	139,44	12,92	22,06	0,72	0,47	3,91	1,23	2,83	16,46	7,13	1,60	1,71	3,31	1,34
<i>Aspergillus</i> sp	201,95	38,09	17,75	31,20	2,11	3,46	0,21	0,04	2,73	5,04	8,34	2,03	0,78	0,90	0,31
<i>A. terreus</i>	186,63	44,47	32,01	17,51	6,09	5,30	4,86	2,43	1,61	19,54	16,59	7,05	3,01	7,93	2,20
FPase															
<i>P. simplicissimum</i>	191,55	93,21	1,51	5,03	2,89	1,11	0,25	3,37	0,34	1,76	1,60	1,20	1,03	0,49	0,28
<i>T. reesei</i> QM9414	15,34	87,40	12,97	3,09	1,20	2,19	5,45	12,91	1,82	2,34	7,46	0,83	0,74	0,37	0,21
<i>T. reesei</i> RUTC30	106,48	8,87	0,14	5,38	0,52	2,37	2,53	0,94	0,65	0,72	1,00	6,47	1,01	0,34	0,22
<i>A. niger</i>	184,55	3,92	1,23	2,32	0,94	5,86	4,69	16,16	0,00	10,56	3,43	2,00	4,62	3,12	1,05
<i>Aspergillus</i> sp	155,66	96,80	9,08	11,44	6,84	8,72	13,23	10,62	7,32	12,34	7,66	3,63	3,06	0,70	0,55
<i>A. terreus</i>	116,93	6,80	18,13	26,53	3,89	19,68	44,40	50,29	8,71	54,51	24,97	23,58	22,42	21,38	2,76

Atividade Enzimática UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 3. Atividade Enzimática Específica dos fungos cultivados em Meio C por 15 dias

Enzimas	Tempo (Dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-Glicosidase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,55	1,28	1,26	0,00	0,00	0,00
<i>T. reesei</i> QM9414	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	2,10	0,40	0,04	0,02	0,48	0,96	0,00	0,00	0,00
<i>T. reesei</i> RUTC30	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,25	0,51	0,03	0,03	0,33	0,58	0,00	0,00	0,00
<i>A. niger</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,42	0,08	0,30	0,15	0,23	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus sp</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	1,11	0,16	0,05	0,81	1,40	1,65	0,00	0,00	0,00
<i>A. terreus</i>	0,00	0,00	0,54	0,42	0,00	0,47	3,72	2,38	0,30	1,30	1,39	3,85	1,14	1,74	0,64
Endoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,77	0,40	16,96	7,92	6,76	7,66	17,99	4,87	12,33	12,50	0,00	15,71	0,00	0,00
<i>T. reesei</i> QM9414	5,56	1,97	3,66	16,01	7,55	11,24	8,62	30,37	4,05	10,75	11,58	0,00	17,70	0,00	0,00
<i>T. reesei</i> RUTC30	2,42	2,85	4,96	21,87	7,72	8,28	2,03	16,07	6,75	12,11	1,63	0,00	12,91	0,00	0,00
<i>A. niger</i>	0,00	4,77	6,81	17,54	4,67	14,37	5,73	18,17	3,96	14,72	12,13	0,00	11,02	0,00	0,00
<i>Aspergillus sp</i>	0,00	0,54	1,69	15,17	6,82	12,11	4,06	6,31	4,10	12,86	10,71	0,00	13,44	2,41	3,62
<i>A. terreus</i>	0,00	2,00	3,01	22,70	0,01	13,71	7,87	24,07	24,15	24,14	17,33	36,49	27,81	10,12	3,90
Exoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	15,73	8,85	9,26	21,08	7,85	2,45	19,15	11,32	7,30	9,68	10,61	19,09	15,40	38,09	19,20
<i>T. reesei</i> QM9414	35,14	11,20	5,83	24,72	17,09	0,69	22,93	7,74	3,21	10,38	12,11	21,08	16,09	30,47	6,10
<i>T. reesei</i> RUTC30	5,57	7,98	8,87	18,64	10,66	1,31	12,69	13,20	5,41	8,89	10,44	8,34	8,55	23,51	9,31
<i>A. niger</i>	14,33	4,90	1,18	19,66	10,07	3,65	14,43	12,02	11,24	15,39	15,39	16,90	7,10	17,51	8,95
<i>Aspergillus sp</i>	8,28	2,55	13,39	17,86	8,27	2,91	12,10	4,43	10,32	14,92	17,51	9,47	7,82	23,24	7,04
<i>A. terreus</i>	7,90	3,00	11,08	15,94	0,01	2,89	18,32	4,20	10,32	11,71	9,57	11,21	15,01	25,99	4,55
FPase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,00	0,00	68,98	3,13	4,80	3,64	15,27	3,91	3,33	0,00	4,61	7,50	14,63	1,79
<i>T. reesei</i> QM9414	2,79	0,95	1,91	7,01	4,95	4,53	8,34	19,10	2,24	0,90	0,61	5,71	23,49	19,33	5,19
<i>T. reesei</i> RUTC30	1,29	2,28	0,33	5,73	4,61	5,15	4,07	9,26	6,37	0,25	2,25	4,11	16,46	31,15	4,46
<i>A. niger</i>	0,00	1,06	4,44	7,24	4,63	11,93	1,32	2,65	6,13	5,21	3,20	5,00	9,39	11,74	3,77
<i>Aspergillus sp</i>	0,00	0,00	0,00	3,02	4,63	3,32	0,63	2,24	2,12	3,60	0,25	6,09	6,98	13,57	0,97
<i>A. terreus</i>	0,73	0,00	0,00	7,52	0,00	5,28	3,44	6,35	5,90	0,32	0,83	0,48	16,47	10,06	0,71

Atividade Enzimática UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 4. Atividade Enzimática Específica dos fungos cultivados em Meio D por 15 dias

Enzimas	Tempo (Dias)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-Glicosidase															
<i>P. simplicissimum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,54	0,39	2,27	17,02	5,41	2,52	6,44	10,48
<i>T. reesei</i> QM9414	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,15	0,40	0,37	0,99	8,95	1,80	4,85	4,50	3,51
<i>T. reesei</i> RUTC30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	0,89	0,16	1,80	3,76	8,67	9,81	1,10	2,66
<i>A. niger</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,35	0,06	0,55	0,73	0,53	0,29	0,75	0,27
<i>Aspergillus sp</i>	0,00	0,00	0,07	0,26	0,17	0,23	0,38	0,04	0,16	0,27	1,18	0,97	1,80	0,83	0,71
<i>A. terreus</i>	0,00	0,00	0,37	0,51	0,18	0,69	10,79	3,95	0,34	3,02	3,99	8,13	4,66	0,68	0,74
Endoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	426,98	170,58	119,99	0,00	0,00	40,90	118,93	92,89	84,65	136,54	80,39	81,54	96,61	28,46	40,45
<i>T. reesei</i> QM9414	418,50	150,32	23,05	0,00	0,00	88,98	142,48	39,58	5,67	58,45	150,78	29,79	77,13	67,85	53,33
<i>T. reesei</i> RUTC30	681,96	270,50	110,67	0,00	0,00	9,48	58,53	34,34	3,57	101,02	16,45	86,38	130,51	39,73	28,49
<i>A. niger</i>	182,84	174,07	138,93	79,75	0,00	12,55	0,00	25,00	0,00	8,24	1,11	17,49	36,74	27,10	7,60
<i>Aspergillus sp</i>	432,05	226,13	66,40	191,09	35,58	79,25	87,84	41,19	70,56	70,64	18,58	20,27	46,99	15,18	15,40
<i>A. terreus</i>	0,28	261,87	91,98	13,33	0,00	50,63	230,65	64,23	4,34	101,71	104,55	103,24	98,32	60,42	22,31
Exoglucanase															
<i>P. simplicissimum</i>	263,75	175,39	47,24	34,11	14,49	41,67	9,08	64,07	22,34	25,67	19,44	22,55	52,00	30,85	19,20
<i>T. reesei</i> QM9414	709,07	125,47	2,67	12,64	11,39	31,28	64,06	57,02	8,70	39,65	46,00	49,22	38,61	28,87	11,54
<i>T. reesei</i> RUTC30	66,38	41,17	41,29	30,65	13,66	17,15	9,15	48,92	8,09	17,16	19,66	12,50	22,13	28,97	16,51
<i>A. niger</i>	175,91	100,71	85,91	76,61	50,49	24,73	2,42	33,32	5,62	6,98	7,73	12,95	7,04	17,61	13,60
<i>Aspergillus sp</i>	232,59	104,29	33,80	78,09	49,10	19,35	33,71	20,23	29,68	24,05	13,37	13,25	20,56	20,98	14,20
<i>A. terreus</i>	178,20	76,56	20,46	12,69	0,01	19,27	57,79	32,14	20,63	20,08	15,62	37,15	42,99	38,41	28,78
FPase															
<i>P. simplicissimum</i>	270,65	90,47	0,00	46,25	29,71	56,21	11,09	70,34	33,79	87,20	21,99	16,92	76,96	10,95	2,94
<i>T. reesei</i> QM9414	323,56	123,15	151,86	10,13	6,36	62,45	194,14	3787,00	17,18	124,81	67,05	18,70	41,54	53,82	47,79
<i>T. reesei</i> RUTC30	373,29	132,20	201,44	44,59	16,95	23,66	6,23	23,32	3,07	53,21	7,56	13,33	83,97	7,86	6,11
<i>A. niger</i>	281,11	264,43	133,09	104,37	24,69	2,17	16,53	3,60	3,38	6,86	6,77	2,20	28,65	18,64	11,94
<i>Aspergillus sp</i>	595,93	154,23	33,93	123,89	68,39	83,62	47,26	19,16	13,26	31,57	0,17	5,64	58,27	12,57	13,71
<i>A. terreus</i>	0,16	180,06	62,07	10,28	28,48	21,21	7,83	50,27	17,36	48,76	25,67	20,03	68,60	35,24	26,73

Atividade Enzimática UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Nas Tabelas 1, 2 e 4, nos primeiros dias há valores elevados de atividade enzimática específica, contudo essas leituras se referem a glicose constituinte do meio de cultura que ainda não havia sido consumida pelos microrganismo e que interferiu no doseamento através do DNS.

Lista de Tabelas de Estabilidade ao pH e a Temperatura das enzimas produzidas nos diferentes meios

Tabela 5. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *A. niger* em Meio A por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	0,46	0,23	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	49,56	9,59	3,02	0,98	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	0,50	0,26	0,25	0,25	0,24	0,24	0,23
	% Atividade Residual	100,00	51,29	50,62	50,00	48,67	47,71	45,38
pH 5	Atividade Específica	0,50	0,35	0,31	0,27	0,27	0,26	0,24
	% Atividade Residual	100,00	69,88	61,82	53,81	53,24	51,84	47,93
pH 6	Atividade Específica	0,51	0,29	0,29	0,26	0,26	0,25	0,22
	% Atividade Residual	100,00	56,87	56,83	52,17	51,94	49,31	42,91
pH 7	Atividade Específica	0,59	0,27	0,25	0,24	0,24	0,23	0,20
	% Atividade Residual	100,00	45,22	43,44	41,09	40,92	39,63	33,66
pH 8	Atividade Específica	0,58	0,31	0,29	0,27	0,27	0,26	0,21
	% Atividade Residual	100,00	53,55	49,39	47,50	46,92	44,94	37,08

* Atividade Específica U = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 6. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *A. niger* em Meio A por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	4,82	1,16	0,53	0,18	0,53	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	24,08	11,07	3,69	11,07	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	4,82	2,49	1,36	0,93	0,52	0,31	0,00
	% Atividade Residual	100,00	51,67	28,30	19,24	10,81	6,33	0,00
pH 5	Atividade Específica	5,14	3,34	2,70	1,76	0,97	0,42	0,24
	% Atividade Residual	100,00	64,96	52,60	34,30	18,88	8,41	4,70
pH 6	Atividade Específica	7,27	3,72	2,65	2,20	1,26	0,55	0,12
	% Atividade Residual	100,00	51,20	36,43	30,21	17,36	7,57	1,70
pH 7	Atividade Específica	7,13	2,59	2,24	1,55	0,70	0,40	0,05
	% Atividade Residual	100,00	36,25	31,40	21,78	9,80	5,56	0,69
pH 8	Atividade Específica	7,11	2,54	2,15	1,29	0,80	0,28	0,02
	% Atividade Residual	100,00	35,77	30,20	18,10	11,23	3,92	0,26

* Atividade Específica U = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 7. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *A. niger* em Meio A por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,05	0,08	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	7,26	1,21	0,00	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	0,96	0,93	0,19	0,14	0,09	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	96,90	20,90	15,04	9,29	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	0,96	0,81	0,79	0,75	0,72	0,70	0,64
	% Atividade Residual	100,00	86,10	83,86	79,37	76,68	73,54	67,71
pH 6	Atividade Específica	1,46	1,43	0,66	0,65	0,56	0,45	0,41
	% Atividade Residual	100,00	97,67	45,24	44,40	38,48	30,87	27,91
pH 7	Atividade Específica	1,34	1,24	0,80	0,54	0,39	0,30	0,24
	% Atividade Residual	100,00	92,59	60,19	40,74	29,17	22,22	17,59
pH 8	Atividade Específica	1,67	0,93	0,86	0,83	0,58	0,32	0,12
	% Atividade Residual	100,00	55,45	51,39	49,54	34,38	19,22	7,39

* Atividade Específica U = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 8. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *A. niger* em Meio A por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	0,45	0,18	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	38,75	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	0,51	0,28	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	53,85	12,64	0,00	0,00	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	0,50	0,43	0,36	0,34	0,32	0,12	0,00
	% Atividade Residual	100,00	85,96	71,91	67,41	64,05	23,60	0,00
pH 6	Atividade Específica	0,72	0,53	0,46	0,40	0,38	0,31	0,00
	% Atividade Residual	100,00	73,14	63,43	56,00	52,57	43,43	0,00
pH 7	Atividade Específica	0,75	0,45	0,36	0,36	0,32	0,18	0,00
	% Atividade Residual	100,00	59,02	47,54	47,54	42,62	24,04	0,00
pH 8	Atividade Específica	0,71	0,37	0,35	0,33	0,28	0,20	0,00
	% Atividade Residual	100,00	52,05	49,12	46,20	40,35	28,66	0,00

* Atividade Específica U = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 9. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *A. niger* em Meio A em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	0,91	0,64	0,71	0,61	0,60	0,51	0,50	0,48
	% Atividade Residual	100	70,81	78,74	67,09	66,75	56,01	55,28	52,57
40°C	Atividade Específica	0,87	0,53	0,67	1,16	0,74	0,35	0,44	0,43
	% Atividade Residual	100	60,22	77	133,46	65,89	40,27	50,38	49,32
50°C	Atividade Específica	0,89	0,51	0,31	0,71	0,22	0,23	0,17	0,17
	% Atividade Residual	100	39,7	34,5	79,56	24,41	26,13	19,31	19,05
60°C	Atividade Específica	0,90	0,13	0,14	0,06	0,05	0,02	0,02	0,02
	% Atividade Residual	100	14,52	15,69	6,52	5,37	1,97	2,45	1,93
70°C	Atividade Específica	0,90	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
	% Atividade Residual	100	2,48	2,44	2,01	2,38	1,91	1,88	1,2
80°C	Atividade Específica	0,88	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01
	% Atividade Residual	100	4,18	2,16	1,85	3,61	1,31	1,24	1,08

* Atividade Específica U = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 10. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *A. niger* em Meio A em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	1,86	1,58	1,78	1,68	1,54	1,66	1,61	1,48
	% Atividade Residual	100,00	84,72	95,35	90,37	82,42	89,37	86,38	79,73
40°C	Atividade Específica	1,89	1,29	0,78	0,62	0,41	0,51	0,56	0,66
	% Atividade Residual	100,00	68,30	38,89	32,68	21,57	26,80	29,41	34,97
50°C	Atividade Específica	1,91	1,31	0,74	1,25	0,04	0,51	0,49	0,66
	% Atividade Residual	100,00	68,29	38,84	65,37	22,65	26,86	25,89	34,30
60°C	Atividade Específica	1,83	0,51	0,50	0,48	0,58	0,59	0,54	0,64
	% Atividade Residual	100,00	28,14	27,46	26,44	31,86	32,20	29,49	34,92
70°C	Atividade Específica	1,30	0,41	0,32	0,42	0,55	0,49	0,64	0,41
	% Atividade Residual	100,00	31,82	24,35	32,14	42,53	37,34	49,35	31,82
80°C	Atividade Específica	1,27	0,41	0,22	0,43	0,21	0,22	0,28	0,19
	% Atividade Residual	100,00	32,33	17,33	34,00	16,33	17,33	22,33	14,67

* Atividade Específica = $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 11. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *A. niger* Meio A em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	1,02	0,87	1,00	1,18	1,18	0,79	0,96	0,87
	% Atividade Residual	100,00	84,59	97,89	115,71	114,80	77,04	93,66	84,59
40°C	Atividade Específica	1,07	0,63	0,87	0,64	0,16	0,79	0,55	0,42
	% Atividade Residual	100,00	58,84	81,74	60,00	151,88	73,91	51,88	39,30
50°C	Atividade Específica	1,04	0,57	0,63	0,82	1,48	0,83	0,70	0,63
	% Atividade Residual	100,00	54,30	60,83	78,34	142,43	79,53	67,06	60,24
60°C	Atividade Específica	1,06	0,45	0,28	0,51	0,83	0,41	0,32	0,41
	% Atividade Residual	100,00	42,40	26,90	47,95	78,36	38,30	29,83	38,54
70°C	Atividade Específica	0,71	0,13	0,34	0,63	1,37	0,47	0,24	0,11
	% Atividade Residual	100,00	18,86	47,90	88,92	194,01	65,87	33,53	15,57
80°C	Atividade Específica	0,72	0,27	0,17	0,18	0,43	0,35	0,09	0,24
	% Atividade Residual	100,00	38,17	23,37	24,85	60,06	49,41	13,02	33,73

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 12. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *A. niger* Meio A em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	0,64	0,26	0,42	0,17	0,24	0,57	0,35	0,28
	% Atividade Residual	100,00	41,29	65,16	25,81	31,42	88,39	54,19	43,23
40°C	Atividade Específica	0,66	0,52	0,42	0,56	0,71	0,44	0,42	0,40
	% Atividade Residual	100,00	78,70	63,13	85,00	106,86	66,25	63,75	61,25
50°C	Atividade Específica	0,65	0,49	0,38	0,31	0,61	0,36	0,36	0,31
	% Atividade Residual	100,00	75,95	58,22	46,84	94,30	55,70	55,70	47,47
60°C	Atividade Específica	0,64	0,22	0,30	0,24	0,28	0,26	0,28	0,29
	% Atividade Residual	100,00	34,84	47,10	38,07	44,52	40,00	43,87	45,81
70°C	Atividade Específica	0,46	0,25	0,21	0,17	0,26	0,21	0,19	0,22
	% Atividade Residual	100,00	52,47	46,30	37,65	56,17	46,30	41,36	47,53
80°C	Atividade Específica	0,44	0,34	0,42	0,32	0,29	0,30	0,31	0,31
	% Atividade Residual	100,00	77,42	96,13	72,90	67,10	69,03	71,31	71,10

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 13. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *A. terreus* em Meio B por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	0,43	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	13,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	0,46	0,28	0,12	0,07	0,05	0,02	0,01
	% Atividade Residual	100,00	59,88	25,48	14,35	9,96	4,98	2,34
pH 5	Atividade Específica	0,44	0,30	0,22	0,17	0,11	0,07	0,07
	% Atividade Residual	100,00	68,50	50,61	38,69	24,01	16,21	12,84
pH 6	Atividade Específica	0,47	0,31	0,31	0,29	0,29	0,18	0,12
	% Atividade Residual	100,00	66,86	65,71	61,84	60,83	37,30	25,82
pH 7	Atividade Específica	0,46	0,25	0,20	0,19	0,12	0,04	0,02
	% Atividade Residual	100,00	54,00	43,23	40,18	25,33	14,99	9,61
pH 8	Atividade Específica	0,46	0,26	0,24	0,17	0,07	0,06	0,03
	% Atividade Residual	100,00	56,03	53,38	36,18	16,32	13,82	5,59

* Atividade Específica: $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 14. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *A. terreus* em Meio B por Tempo em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	24,82	5,43	2,50	0,43	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	21,90	10,08	1,74	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	26,33	9,19	4,38	1,20	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	34,89	16,32	4,57	0,00	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	26,62	11,30	5,53	4,18	3,03	2,07	0,58
	% Atividade Residual	100,00	42,46	20,78	15,72	11,38	7,77	2,17
pH 6	Atividade Específica	36,61	12,50	2,95	1,47	1,33	1,05	0,84
	% Atividade Residual	100,00	34,13	8,05	4,03	3,64	2,88	2,30
pH 7	Atividade Específica	37,84	10,81	5,90	4,35	1,61	0,70	0,00
	% Atividade Residual	100,00	28,57	15,58	11,50	4,27	1,86	0,00
pH 8	Atividade Específica	36,19	7,30	6,39	5,12	3,16	0,56	0,00
	% Atividade Residual	100,00	20,18	17,65	14,16	8,73	1,55	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 15. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *A. terreus* em Meio B por Tempo em diferentes pHs

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	6,27	1,92	0,75	0,19	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	30,65	11,88	3,07	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	6,41	5,68	4,49	3,39	3,17	1,22	0,28
	% Atividade Residual	100,00	88,56	73,17	52,91	49,53	19,14	4,32
pH 5	Atividade Específica	7,02	6,28	4,28	3,92	3,80	3,34	2,96
	% Atividade Residual	100,00	89,38	60,96	55,82	54,11	47,60	42,12
pH 6	Atividade Específica	10,55	7,62	5,93	3,93	2,84	2,63	2,49
	% Atividade Residual	100,00	72,21	56,24	36,37	26,96	24,96	23,63
pH 7	Atividade Específica	10,21	8,42	6,32	3,55	2,60	1,58	0,98
	% Atividade Residual	100,00	82,47	61,86	34,71	24,43	15,46	9,62
pH 8	Atividade Específica	9,02	7,23	4,23	3,97	3,16	2,39	1,58
	% Atividade Residual	100,00	80,16	46,89	43,97	35,02	26,46	17,51

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 16. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *A. terreus* em Meio B em diferentes pHs

	Tempo de Incubação (h)	0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	8,67	3,46	1,57	0,42	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	39,93	18,12	4,81	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	7,61	0,96	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	12,63	4,63	0,00	0,00	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	8,51	3,62	1,80	0,93	0,38	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	42,56	21,09	10,92	4,52	0,00	0,00
pH 6	Atividade Específica	11,77	4,17	3,65	2,99	2,62	2,22	0,00
	% Atividade Residual	100,00	35,39	31,01	25,45	22,27	18,89	0,00
pH 7	Atividade Específica	11,70	4,26	3,46	3,51	3,42	3,18	3,04
	% Atividade Residual	100,00	36,40	29,60	30,00	29,20	27,20	26,00
pH 8	Atividade Específica	11,54	2,95	2,57	1,97	1,83	1,26	0,00
	% Atividade Residual	100,00	25,56	22,31	17,04	15,82	10,95	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 17. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *A. terreus* em Meio B em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	0,78	0,49	0,49	0,57	0,54	0,48	0,45	0,35
	% Atividade Residual	100,00	62,61	63,13	72,54	69,78	61,40	57,77	45,16
40°C	Atividade Específica	0,90	0,35	0,36	0,46	0,28	0,27	0,13	0,1
	% Atividade Residual	100,00	38,94	40,06	51,42	31,32	30,12	14,05	13,00
50°C	Atividade Específica	0,85	0,24	0,23	0,49	0,20	0,23	0,51	0,29
	% Atividade Residual	100,00	28,30	27,66	57,71	23,85	27,42	59,57	33,94
60°C	Atividade Específica	0,88	0,32	0,23	0,25	0,40	0,26	0,23	0,23
	% Atividade Residual	100,00	36,88	26,17	28,48	45,88	30,10	26,33	25,48
70°C	Atividade Específica	0,81	0,22	0,14	0,14	0,15	0,37	0,15	0,11
	% Atividade Residual	100,00	27,33	17,42	17,58	18,25	46,00	18,33	13,42
80°C	Atividade Específica	0,79	0,19	0,11	0,13	0,18	0,19	0,14	0,12
	% Atividade Residual	100,00	24,61	13,55	17,15	22,47	24,27	17,41	15,01

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 18. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *A. terreus* em Meio B em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	10,95	9,90	12,53	9,69	6,81	5,30	5,12	4,91
	% Atividade Residual	100,00	90,39	114,42	88,46	62,18	48,40	46,80	44,87
40°C	Atividade Específica	10,25	10,46	6,11	4,88	3,93	5,51	5,34	4,21
	% Atividade Residual	100,00	102,06	59,59	47,60	38,36	53,77	52,06	41,10
50°C	Atividade Específica	10,53	9,34	7,27	5,65	4,91	5,76	5,72	6,39
	% Atividade Residual	100,00	88,67	69,00	53,67	46,67	54,67	54,33	60,67
60°C	Atividade Específica	10,35	4,67	5,09	4,14	4,95	4,95	7,16	5,83
	% Atividade Residual	100,00	45,09	48,48	40,00	47,80	47,80	69,15	56,27
70°C	Atividade Específica	7,23	2,74	3,29	2,76	2,88	5,12	4,59	2,98
	% Atividade Residual	100,00	37,87	45,52	38,21	39,87	70,76	63,46	41,20
80°C	Atividade Específica	7,21	2,55	2,45	2,98	2,71	3,44	3,22	3,17
	% Atividade Residual	100,00	35,33	34,00	41,33	37,67	47,67	44,67	44,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 19. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *A. terreus* em Meio B em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	9,83	7,07	4,07	5,79	13,44	4,98	5,62	3,72
	% Atividade Residual	100,00	71,96	41,43	58,93	136,79	50,71	57,14	37,86
40°C	Atividade Específica	10,06	7,14	5,69	2,84	7,95	4,09	2,02	3,67
	% Atividade Residual	100,00	71,03	56,55	28,27	79,06	40,66	20,07	36,48
50°C	Atividade Específica	9,99	3,07	3,00	5,14	12,85	2,49	3,58	3,88
	% Atividade Residual	100,00	30,76	30,05	51,49	128,65	24,65	35,85	38,84
60°C	Atividade Específica	9,86	1,09	6,55	6,32	3,44	2,79	2,65	2,31
	% Atividade Residual	100,00	11,03	66,37	64,06	34,87	28,29	26,87	23,45
70°C	Atividade Específica	6,85	0,85	2,01	1,54	2,22	7,40	1,77	1,84
	% Atividade Residual	100,00	12,46	29,30	22,46	32,46	108,07	25,79	26,84
80°C	Atividade Específica	6,77	1,35	7,24	2,23	2,08	2,10	1,01	1,45
	% Atividade Residual	100,00	19,86	106,92	32,98	30,67	31,03	14,89	21,45

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 20. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *A. terreus* em Meio B em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	5,34	3,07	3,79	1,92	2,11	3,35	2,04	1,76
	% Atividade Residual	100,00	57,46	71,05	35,97	39,47	62,72	38,16	32,90
40°C	Atividade Específica	5,38	4,05	3,58	3,79	2,62	2,36	2,15	3,60
	% Atividade Residual	100,00	75,22	66,52	70,44	48,70	43,92	40,00	68,96
50°C	Atividade Específica	5,27	7,09	3,84	2,67	2,69	3,44	3,14	2,46
	% Atividade Residual	100,00	134,67	72,89	50,67	51,11	65,33	59,56	46,67
60°C	Atividade Específica	5,36	2,29	2,53	1,83	2,41	2,90	3,07	1,78
	% Atividade Residual	100,00	42,80	47,16	34,06	44,98	54,15	57,21	33,19
70°C	Atividade Específica	3,70	1,76	1,44	1,19	2,29	1,79	1,50	2,10
	% Atividade Residual	100,00	47,62	38,96	32,04	61,91	48,49	10,69	56,70
80°C	Atividade Específica	3,65	3,19	2,85	3,01	2,34	2,91	3,20	2,34
	% Atividade Residual	100,00	87,28	78,07	82,46	64,04	79,83	87,72	64,04

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 21. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *A. terreus* em Meio C em diferentes pHs.

	Tempo de Incubação (h)	0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,98	0,39	0,08	0,02	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	19,43	4,05	1,01	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	2,56	1,81	1,46	1,44	1,24	0,88	0,54
	% Atividade Residual	100,00	70,84	57,14	56,36	48,62	34,34	21,23
pH 5	Atividade Específica	2,74	1,81	1,46	1,44	1,24	0,88	0,54
	% Atividade Residual	100,00	70,84	57,14	56,36	48,62	34,34	21,23
pH 6	Atividade Específica	2,51	2,09	2,01	1,84	1,68	1,21	1,17
	% Atividade Residual	100,00	83,27	79,87	73,00	66,80	48,13	46,60
pH 7	Atividade Específica	2,33	1,51	1,02	1,01	0,98	0,82	0,56
	% Atividade Residual	100,00	64,54	43,72	43,36	41,78	34,96	24,19
pH 8	Atividade Específica	2,24	1,36	1,31	1,18	1,07	0,80	0,51
	% Atividade Residual	100,00	60,42	58,55	52,50	47,80	35,55	22,93

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 22. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *A. terreus* em Meio C *Aspergillus terreus* diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH	Atividade Específica*	8,25	2,75	1,08	0,12	0,00	0,00	0,00
3	% Atividade Residual	100,00	33,33	13,04	1,45	0,00	0,00	0,00
pH	Atividade Específica	11,36	7,53	5,38	3,47	1,32	0,60	0,00
4	% Atividade Residual	100,00	66,32	47,37	30,53	11,58	5,26	0,00
pH	Atividade Específica	9,15	8,97	5,86	4,06	2,75	0,84	0,30
5	% Atividade Residual	100,00	98,04	64,05	44,44	30,07	9,15	3,27
pH	Atividade Específica	15,09	10,73	8,38	7,68	4,97	3,14	2,09
6	% Atividade Residual	100,00	71,10	55,49	50,87	32,95	20,81	13,87
pH	Atividade Específica	15,79	9,34	78,07	6,02	2,60	1,22	0,00
7	% Atividade Residual	100,00	59,12	44,75	38,12	14,92	7,74	0,00
pH	Atividade Específica	14,22	8,11	6,19	2,09	1,66	0,44	0,00
8	% Atividade Residual	100,00	57,06	43,56	14,72	11,66	3,07	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 23. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *A. terreus* em Meio C em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH	Atividade Específica*	5,44	2,66	0,96	0,33	0,00	0,00	0,00
3	% Atividade Residual	100,00	48,90	17,58	6,04	0,00	0,00	0,00
pH	Atividade Específica	10,52	6,60	3,32	1,79	0,54	0,18	0,00
4	% Atividade Residual	100,00	62,78	31,53	17,05	5,11	1,71	0,00
pH	Atividade Específica	9,29	8,85	7,65	6,69	5,32	3,88	2,57
5	% Atividade Residual	100,00	95,18	82,32	72,03	57,24	41,80	27,65
pH	Atividade Específica	12,69	11,21	7,42	4,36	3,71	3,45	3,01
6	% Atividade Residual	100,00	88,32	58,42	34,36	29,21	27,15	23,71
pH	Atividade Específica	11,91	6,76	5,93	4,97	4,40	2,57	1,00
7	% Atividade Residual	100,00	56,78	49,82	41,76	37,00	21,61	8,43
pH	Atividade Específica	12,39	7,72	5,50	4,14	1,40	0,83	0,31
8	% Atividade Residual	100,00	63,32	44,37	33,45	11,27	6,69	2,47

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 24. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *A. terreus* em Meio C em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH	Atividade Específica*	6,69	2,43	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00
3	% Atividade Residual	100,00	36,31	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00
pH	Atividade Específica	6,73	2,87	1,37	0,80	0,00	0,00	0,00
4	% Atividade Residual	100,00	42,60	24,85	11,83	0,00	0,00	0,00
pH	Atividade Específica	6,10	6,06	5,02	3,03	2,39	1,00	0,36
5	% Atividade Residual	100,00	99,35	82,35	49,67	39,22	16,34	5,88
pH	Atividade Específica	9,25	7,50	7,27	6,34	4,01	1,45	0,52
6	% Atividade Residual	100,00	81,13	78,62	68,55	43,40	15,72	5,66
pH	Atividade Específica	9,48	6,98	5,82	4,54	2,38	1,63	0,70
7	% Atividade Residual	100,00	73,62	61,35	47,85	25,15	17,18	7,36
pH	Atividade Específica	9,60	4,30	3,14	2,91	2,68	1,63	0,23
8	% Atividade Residual	100,00	44,85	32,73	30,30	27,88	16,97	2,42

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 25. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *Aspergillus terreus* em Meio C em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	29,08	18,94	17,63	19,28	17,31	15,48	14,67	14,18
	% Atividade Residual	100,0	65,1	60,6	66,3	59,5	53,3	50,4	48,8
40°C	Atividade Específica	27,54	13,38	14,72	2,41	8,26	7,51	6,60	6,44
	% Atividade Residual	100,0	48,6	53,4	87,6	30,0	27,3	24,0	23,4
50°C	Atividade Específica	28,53	11,06	12,47	20,11	5,85	5,68	5,23	2,33
	% Atividade Residual	100,0	38,8	43,7	70,5	20,5	19,9	18,3	8,2
60°C	Atividade Específica	27,74	2,35	3,44	10,01	2,65	1,84	1,84	1,26
	% Atividade Residual	100,0	8,5	12,4	36,3	9,5	6,6	6,6	4,5
70°C	Atividade Específica	28,68	0,74	0,94	0,44	0,35	0,15	0,07	0,02
	% Atividade Residual	100,0	2,6	3,3	1,5	1,2	0,5	0,2	0,1
80°C	Atividade Específica	28,12	0,87	0,33	5,95	2,31	0,97	0,79	0,34
	% Atividade Residual	100,0	3,1	11,6	21,2	8,2	3,5	2,8	1,2

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 26. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio C em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	21,64	14,13	12,83	14,22	10,82	8,81	8,38	5,85
	% Atividade Residual	100,00	65,32	59,27	65,73	50,00	40,73	38,71	27,02
40°C	Atividade Específica	20,15	12,21	11,69	8,99	3,40	2,70	2,27	2,18
	% Atividade Residual	100,00	60,61	58,01	44,59	16,88	13,42	11,26	10,82
50°C	Atividade Específica	19,37	11,69	3,66	4,54	2,53	2,27	1,83	1,83
	% Atividade Residual	100,00	60,36	18,92	23,42	13,06	11,70	9,46	9,46
60°C	Atividade Específica	17,54	2,36	2,44	2,53	2,61	5,32	3,49	2,88
	% Atividade Residual	100,00	13,43	13,93	14,42	14,92	30,35	19,90	16,42
70°C	Atividade Específica	12,72	1,49	1,43	2,39	2,15	1,73	1,55	1,02
	% Atividade Residual	100,00	11,74	11,27	18,78	16,90	13,62	12,01	7,98
80°C	Atividade Específica	12,00	72,00	3,05	2,63	2,39	2,33	2,30	1,07
	% Atividade Residual	100,00	5,97	25,37	21,89	19,90	19,40	16,92	8,96

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 27. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio C em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	20,24	2,88	8,42	9,47	21,90	12,17	3,97	3,32
	% Atividade Residual	100,00	14,22	41,60	46,77	108,19	60,13	19,61	16,98
40°C	Atividade Específica	20,64	19,89	12,70	11,91	7,90	5,41	2,75	0,65
	% Atividade Residual	100,00	94,41	61,52	57,72	38,27	26,22	13,32	3,17
50°C	Atividade Específica	19,85	4,45	4,87	9,65	16,93	24,87	7,50	2,49
	% Atividade Residual	100,00	22,42	24,62	48,57	85,26	125,28	37,80	12,53
60°C	Atividade Específica	20,11	3,49	0,10	7,77	5,41	0,51	3,32	3,45
	% Atividade Residual	100,00	17,35	4,95	38,61	26,90	2,52	16,49	17,14
70°C	Atividade Específica	14,24	1,04	1,94	8,90	2,18	1,85	1,43	1,07
	% Atividade Residual	100,00	7,34	13,63	62,47	15,30	13,00	10,06	7,55
80°C	Atividade Específica	13,73	1,91	2,15	3,58	2,60	2,84	1,85	0,99
	% Atividade Residual	100,00	13,91	15,65	26,09	18,91	20,65	13,48	7,17

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 28. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Aspergillus terreus* em Meio C em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	6,81	3,60	4,07	4,60	4,54	3,72	1,63	0,64
	% Atividade Residual	100,00	52,99	59,83	67,52	66,67	54,70	23,93	9,40
40°C	Atividade Específica	7,15	1,22	1,98	9,19	3,02	3,02	2,56	1,51
	% Atividade Residual	100,00	17,07	27,64	128,46	42,28	42,28	35,77	21,14
50°C	Atividade Específica	6,51	1,92	2,21	6,28	4,01	1,16	1,10	105,00
	% Atividade Residual	100,00	29,46	33,93	96,43	61,61	17,86	16,96	16,07
60°C	Atividade Específica	5,93	2,38	5,35	4,48	3,55	2,27	1,75	1,57
	% Atividade Residual	100,00	40,20	90,20	75,49	59,80	38,24	29,41	26,47
70°C	Atividade Específica	3,94	0,72	1,27	2,79	2,39	1,27	1,19	1,07
	% Atividade Residual	100,00	18,18	32,32	70,71	60,61	32,32	30,30	27,27
80°C	Atividade Específica	4,42	3,58	3,62	3,78	3,50	2,47	2,19	1,63
	% Atividade Residual	100,00	81,08	81,98	85,89	79,28	55,86	49,55	36,94

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 29. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,23	0,54	0,18	0,09	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	43,90	14,63	7,32	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	1,56	0,96	0,54	0,15	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	64,54	34,62	9,62	0,00	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	1,60	1,26	0,85	0,46	0,19	0,09	0,00
	% Atividade Residual	100,00	78,51	53,27	28,97	12,15	5,61	0,00
pH 6	Atividade Específica	1,97	1,38	1,27	0,74	0,50	0,35	0,09
	% Atividade Residual	100,00	70,00	64,44	37,78	25,56	17,78	4,44
pH 7	Atividade Específica	2,08	1,38	1,22	0,59	0,28	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	66,32	58,95	28,42	13,68	0,00	0,00
pH 8	Atividade Específica	1,95	1,18	0,48	0,31	0,07	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	60,67	24,72	15,73	3,37	0,00	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 30. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	2,74	1,06	0,43	0,15	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	38,80	15,85	5,46	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	2,43	1,84	1,20	0,82	0,70	0,38	0,00
	% Atividade Residual	100,00	75,69	49,23	33,85	28,92	15,69	0,00
pH 5	Atividade Específica	2,53	2,07	1,80	1,54	1,21	0,79	0,48
	% Atividade Residual	100,00	81,66	71,01	60,95	47,93	31,36	18,94
pH 6	Atividade Específica	4,15	2,83	1,87	1,15	0,58	0,39	0,10
	% Atividade Residual	100,00	68,16	45,00	27,63	13,95	9,47	2,37
pH 7	Atividade Específica	3,96	2,81	1,38	1,30	1,04	0,46	0,24
	% Atividade Residual	100,00	70,99	34,81	32,87	26,24	11,60	6,08
pH 8	Atividade Específica	3,54	1,85	1,50	1,08	0,78	0,58	0,19
	% Atividade Residual	100,00	42,16	42,28	30,56	21,91	16,36	5,25

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 31. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	4,61	2,28	0,66	0,18	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	49,35	14,29	3,90	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	4,72	2,60	1,48	1,11	0,67	0,34	0,15
	% Atividade Residual	100,00	54,97	31,29	23,47	14,38	7,19	3,17
pH 5	Atividade Específica	4,98	3,65	1,68	1,44	0,60	0,28	0,10
	% Atividade Residual	100,00	73,35	33,67	28,86	12,02	5,61	2,00
pH 6	Atividade Específica	6,82	4,77	1,89	1,69	1,40	1,28	0,60
	% Atividade Residual	100,00	68,87	27,78	24,79	20,51	18,80	8,76
pH 7	Atividade Específica	6,57	2,24	1,66	1,40	1,22	0,90	0,47
	% Atividade Residual	100,00	34,15	25,28	21,29	18,63	13,75	7,10
pH 8	Atividade Específica	6,66	1,49	1,25	1,31	1,14	0,96	0,47
	% Atividade Residual	100,00	22,32	18,82	19,69	17,07	14,44	7,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 32. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	2,73	0,90	2,03	1,55	1,11	1,04	1,01	0,87
	% Atividade Residual	100,00	32,80	74,40	56,80	40,80	38,40	36,80	32,00
40°C	Atividade Específica	2,84	2,73	1,84	1,33	1,25	0,72	0,50	0,50
	% Atividade Residual	100,00	96,15	64,62	46,92	43,85	25,39	17,69	17,69
50°C	Atividade Específica	2,89	2,97	3,26	1,14	1,05	0,68	0,66	0,52
	% Atividade Residual	100,00	103,03	112,88	39,39	36,36	23,48	22,73	18,18
60°C	Atividade Específica	2,58	0,85	0,85	0,85	1,53	1,05	1,03	0,85
	% Atividade Residual	100,00	33,05	33,05	33,05	59,32	4068,00	39,83	33,05
70°C	Atividade Específica	1,68	0,67	0,48	0,64	0,43	0,42	0,34	0,31
	% Atividade Residual	100,00	40,17	28,57	38,39	25,89	25,00	20,54	18,75
80°C	Atividade Específica	1,75	0,25	0,37	0,52	0,70	0,60	0,25	0,18
	% Atividade Residual	100,00	14,53	21,37	29,92	40,17	34,19	14,53	10,26

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 33. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	2,19	0,62	0,28	7,74	5,73	2,19	1,48	1,10
	% Atividade Residual	100,00	28,50	12,80	354,00	262,00	100,00	67,50	50,50
40°C	Atividade Específica	2,45	1,85	1,41	5,19	1,89	1,18	0,70	1,18
	% Atividade Residual	100,00	75,45	57,59	212,05	77,12	48,21	28,57	48,21
50°C	Atividade Específica	2,53	1,41	1,96	6,12	2,94	1,67	0,94	0,31
	% Atividade Residual	100,00	55,84	77,49	242,42	116,45	66,23	37,23	12,12
60°C	Atividade Específica	2,16	1,01	2,04	2,74	2,04	1,44	0,87	0,30
	% Atividade Residual	100,00	46,46	94,44	126,77	94,44	66,67	40,40	13,64
70°C	Atividade Específica	1,40	0,54	0,60	0,68	0,61	0,50	0,47	0,22
	% Atividade Residual	100,00	38,50	42,78	48,66	43,32	35,83	33,69	15,51
80°C	Atividade Específica	1,51	0,43	1,56	0,95	0,64	0,45	0,29	0,25
	% Atividade Residual	100,00	28,22	102,97	62,87	42,57	29,70	19,31	16,34

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 34. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 4 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	1,82	0,36	1,20	1,40	0,83	0,55	0,16	0,10
	% Atividade Residual	100,00	20,00	65,60	76,80	45,60	30,40	8,80	5,60
40°C	Atividade Específica	1,49	0,42	0,80	1,55	0,90	0,83	0,80	0,61
	% Atividade Residual	100,00	28,43	53,92	103,92	60,78	55,88	53,92	41,18
50°C	Atividade Específica	1,53	0,54	0,66	1,92	0,47	0,39	0,31	0,23
	% Atividade Residual	100,00	35,24	42,86	124,71	30,48	25,71	20,00	15,24
60°C	Atividade Específica	1,18	0,47	0,55	0,67	0,66	0,61	0,48	0,39
	% Atividade Residual	100,00	39,51	46,91	56,79	55,56	51,85	40,74	33,33
70°C	Atividade Específica	0,91	0,20	0,30	0,34	0,35	0,28	0,22	0,18
	% Atividade Residual	100,00	30,77	32,97	37,36	38,46	30,77	24,18	19,78
80°C	Atividade Específica	1,17	1,13	1,01	0,94	0,75	0,87	0,79	0,77
	% Atividade Residual	100,00	97,44	86,33	80,64	64,10	74,36	67,52	65,81

Tabela 35. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,31	0,69	0,47	0,21	0,06	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	52,31	36,15	16,15	4,62	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	1,41	1,32	0,83	0,36	0,10	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	93,57	58,57	25,71	7,14	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	1,46	1,40	1,05	0,76	0,29	0,10	0,00
	% Atividade Residual	100,00	95,86	71,72	51,72	20,00	6,90	0,00
pH 6	Atividade Específica	2,14	2,04	1,83	1,73	1,22	0,46	0,03
	% Atividade Residual	100,00	95,17	85,52	80,69	57,24	21,38	1,38
pH 7	Atividade Específica	2,11	1,56	1,42	1,18	0,91	0,49	0,16
	% Atividade Residual	100,00	74,13	67,13	55,94	43,36	23,08	7,69
pH 8	Atividade Específica	2,09	1,43	1,08	0,72	0,34	0,15	0,00
	% Atividade Residual	100,00	68,31	51,41	34,51	16,20	7,04	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 36. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,54	0,49	0,19	0,06	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	31,80	12,13	3,93	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	2,02	1,11	0,86	0,81	0,35	0,03	0,00
	% Atividade Residual	100,00	55,14	42,61	40,10	17,54	1,50	0,00
pH 5	Atividade Específica	1,68	1,45	1,15	1,02	0,95	0,71	0,32
	% Atividade Residual	100,00	86,75	68,67	60,84	56,63	42,77	19,28
pH 6	Atividade Específica	2,70	2,29	1,80	1,67	1,46	0,75	0,58
	% Atividade Residual	100,00	84,70	66,67	61,75	54,10	27,87	21,31
pH 7	Atividade Específica	2,45	1,46	1,11	0,87	0,75	0,29	0,20
	% Atividade Residual	100,00	59,64	45,48	35,54	30,72	11,75	8,13
pH 8	Atividade Específica	2,74	1,31	1,22	0,91	0,80	0,49	0,18
	% Atividade Residual	100,00	47,71	44,74	33,15	29,38	18,06	6,74

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 37. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,44	0,58	0,15	0,07	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	40,19	10,28	4,67	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	1,65	0,73	0,37	0,23	0,14	0,05	0,00
	% Atividade Residual	100,00	44,08	22,45	13,88	8,57	3,27	0,00
pH 5	Atividade Específica	1,68	1,52	1,04	0,66	0,52	0,40	0,24
	% Atividade Residual	100,00	90,40	62,00	39,20	31,20	24,00	14,40
pH 6	Atividade Específica	2,35	203,00	1,85	1,44	1,21	0,94	0,20
	% Atividade Residual	100,00	86,19	78,66	61,09	51,46	40,17	8,37
pH 7	Atividade Específica	2,27	1,54	1,32	1,18	1,03	0,83	0,32
	% Atividade Residual	100,00	67,97	58,01	51,95	45,46	36,36	14,29
pH 8	Atividade Específica	2,23	1,12	1,08	0,93	0,46	0,35	0,02
	% Atividade Residual	100,00	50,22	48,45	41,85	20,71	15,86	0,88

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 38. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	3,66	2,39	2,17	1,80	1,58	1,40	1,15	0,99
	% Atividade Residual	100,00	65,32	59,27	49,19	43,15	38,31	31,45	27,02
40°C	Atividade Específica	3,41	2,06	1,98	1,52	0,58	0,46	0,38	0,37
	% Atividade Residual	100,00	60,61	58,01	44,59	16,88	13,42	11,26	10,82
50°C	Atividade Específica	3,27	1,98	2,27	1,89	1,11	0,96	0,71	0,31
	% Atividade Residual	100,00	60,36	69,37	57,66	33,78	29,28	21,62	9,46
60°C	Atividade Específica	2,96	0,40	0,41	0,43	0,44	0,90	0,59	0,49
	% Atividade Residual	100,00	13,43	13,93	13,43	14,93	30,35	19,90	16,42
70°C	Atividade Específica	2,15	0,18	0,24	0,40	0,36	0,29	0,26	0,17
	% Atividade Residual	100,00	8,45	11,27	18,78	16,90	13,62	12,21	7,98
80°C	Atividade Específica	2,03	0,12	0,51	0,44	0,40	0,39	0,34	0,18
	% Atividade Residual	100,00	5,97	25,37	21,89	19,90	19,40	16,92	8,96

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 39. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	2,43	2,77	2,29	1,58	3,34	2,85	1,23	0,49
	% Atividade Residual	100,00	113,94	94,24	64,85	137,58	117,27	50,61	20,30
40°C	Atividade Específica	2,48	1,50	0,83	0,77	2,50	1,69	0,52	0,47
	% Atividade Residual	100,00	60,53	33,23	30,86	100,59	67,95	21,07	18,99
50°C	Atividade Específica	2,39	0,37	0,39	0,91	3,41	0,85	0,82	0,42
	% Atividade Residual	100,00	15,43	28,70	37,96	142,90	35,49	34,26	17,59
60°C	Atividade Específica	2,31	0,36	1,48	0,66	2,16	0,93	0,83	0,38
	% Atividade Residual	100,00	15,61	64,01	28,66	93,31	40,13	35,67	16,56
70°C	Atividade Específica	1,69	0,18	0,27	0,40	0,45	0,61	0,39	0,22
	% Atividade Residual	100,00	10,48	16,17	23,99	26,65	36,23	13,35	12,87
80°C	Atividade Específica	1,65	0,32	0,43	0,46	0,67	0,31	0,31	0,18
	% Atividade Residual	100,00	19,32	26,07	28,22	40,80	18,71	18,71	10,74

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 40. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Penicillium simplicissimum* em Meio C em 13 dias de incubação em diferentes temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	1,22	0,20	0,43	0,61	0,84	1,50	0,22	0,05
	% Atividade Residual	100,00	16,13	35,48	50,00	68,55	123,39	17,74	4,03
40°C	Atividade Específica	1,14	0,49	0,59	1,00	1,33	0,65	0,38	0,35
	% Atividade Residual	100,00	25,98	37,01	81,10	110,24	54,33	37,01	23,62
50°C	Atividade Específica	1,17	0,34	0,17	0,84	0,55	0,53	0,36	0,33
	% Atividade Residual	100,00	29,41	14,71	71,43	47,06	45,38	31,09	28,57
60°C	Atividade Específica	1,17	0,34	0,17	0,84	0,55	0,53	0,36	0,33
	% Atividade Residual	100,00	29,41	14,71	71,43	47,06	45,38	31,1	28,57
70°C	Atividade Específica	0,81	1,27	0,39	0,24	0,22	0,22	0,17	0,14
	% Atividade Residual	100,00	156,20	47,93	29,75	26,45	26,45	21,49	17,36
80°C	Atividade Específica	0,85	0,77	1,23	0,91	0,81	0,62	0,59	0,50
	% Atividade Residual	100,00	89,76	144,09	106,30	95,28	72,44	69,29	58,27

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 41. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -glicosidase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	1,61	0,39	0,11	0,03	0,01	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	24,26	6,69	2,10	0,57	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	1,60	1,28	0,63	0,53	0,45	0,43	0,41
	% Atividade Residual	100,00	79,54	39,39	32,85	27,95	26,61	25,36
pH 5	Atividade Específica	1,58	1,46	1,00	0,49	0,41	0,28	0,15
	% Atividade Residual	100,00	92,59	63,35	30,99	26,12	13,74	9,75
pH 6	Atividade Específica	1,57	1,35	1,21	0,99	0,65	0,61	0,20
	% Atividade Residual	100,00	85,88	77,06	62,94	41,28	38,92	12,75
pH 7	Atividade Específica	1,61	1,32	1,22	0,83	0,77	0,37	0,19
	% Atividade Residual	100,00	81,68	75,57	51,15	47,90	53,09	11,64
pH 8	Atividade Específica	1,62	1,23	0,77	0,47	0,44	0,30	0,16
	% Atividade Residual	100,00	76,17	47,57	29,17	27,36	18,49	9,63

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 42. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	28,91	10,61	5,66	2,47	0,27	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	36,69	19,58	8,56	0,95	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	32,70	18,03	9,01	5,61	3,63	2,03	0,71
	% Atividade Residual	100,00	55,13	27,56	17,14	11,09	6,22	2,19
pH 5	Atividade Específica	37,10	31,33	17,59	8,96	4,07	1,81	0,66
	% Atividade Residual	100,00	84,44	47,41	24,15	10,96	4,89	1,78
pH 6	Atividade Específica	49,98	17,81	13,64	6,58	4,33	2,09	1,12
	% Atividade Residual	100,00	35,63	27,29	13,16	8,67	4,17	2,25
pH 7	Atividade Específica	48,45	20,06	15,24	5,78	2,24	0,48	0,00
	% Atividade Residual	100,00	41,39	31,46	11,92	4,64	1,00	0,00
pH 8	Atividade Específica	49,34	16,37	13,00	4,97	3,37	2,09	0,00
	% Atividade Residual	100,00	33,17	26,34	10,08	6,83	4,23	0,00

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 43. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica*	18,77	5,50	2,42	0,93	0,27	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	29,28	12,88	4,98	1,46	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	20,14	17,75	6,92	5,39	2,91	1,02	0,16
	% Atividade Residual	100,00	88,13	34,38	26,74	14,46	5,05	0,82
pH 5	Atividade Específica	19,32	18,96	8,24	7,58	6,21	5,11	3,90
	% Atividade Residual	100,00	98,15	42,67	39,26	32,15	26,46	20,20
pH 6	Atividade Específica	27,88	21,30	14,24	11,63	5,50	3,77	2,77
	% Atividade Residual	100,00	76,40	51,08	41,73	19,71	13,53	9,93
pH 7	Atividade Específica	28,28	14,20	7,30	4,61	3,89	2,73	1,36
	% Atividade Residual	100,00	50,21	25,82	16,31	13,76	9,45	4,82
pH 8	Atividade Específica	28,12	8,82	6,66	4,13	2,17	1,20	0,40
	% Atividade Residual	100,00	31,38	23,68	14,69	7,70	4,28	1,48

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 44. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes pHs.

Tempo de Incubação (h)		0	1	2	3	4	5	24
pH 3	Atividade Específica *	3,30	1,14	0,40	0,15	0,00	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	34,44	12,22	4,44	0,00	0,00	0,00
pH 4	Atividade Específica	3,37	1,83	1,32	0,66	0,22	0,00	0,00
	% Atividade Residual	100,00	54,35	39,13	19,57	6,52	0,00	0,00
pH 5	Atividade Específica	4,40	4,10	2,67	183,00	1,17	0,92	0,48
	% Atividade Residual	100,00	93,33	60,83	41,67	26,67	20,83	10,83
pH 6	Atividade Específica	4,97	3,85	3,58	0,57	1,71	1,18	0,53
	% Atividade Residual	100,00	77,42	72,04	51,61	34,41	23,66	10,75
pH 7	Atividade Específica	5,94	4,33	2,78	1,98	1,18	0,70	0,11
	% Atividade Residual	100,00	72,97	46,85	33,33	19,82	11,71	1,80
pH 8	Atividade Específica	5,72	3,80	3,05	2,62	1,44	0,64	0,21
	% Atividade Residual	100,00	66,36	53,28	45,79	25,23	11,21	3,74

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 45. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de β -Glicosidase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes Temperaturas.

Tempo de Incubação (h)		0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	0,93	0,50	0,85	0,83	0,81	0,77	0,68	0,43
	% Atividade Residual	100,00	53,57	91,21	89,22	86,90	83,25	73,13	45,77
40°C	Atividade Específica	0,91	0,47	0,89	0,90	0,38	0,34	0,22	0,22
	% Atividade Residual	100,00	51,78	64,47	99,32	41,62	37,39	24,03	23,69
50°C	Atividade Específica	0,90	0,29	0,45	0,75	0,46	0,34	0,21	0,14
	% Atividade Residual	100,00	31,91	49,31	83,28	51,20	38,06	22,87	15,87
60°C	Atividade Específica	0,91	0,54	0,72	0,65	0,56	0,49	0,42	0,30
	% Atividade Residual	100,00	59,76	79,8	71,31	61,97	53,65	46,18	33,28
70°C	Atividade Específica	0,93	0,59	0,24	0,33	0,49	0,45	0,25	0,20
	% Atividade Residual	100,00	63,12	26,08	35,38	52,82	48,01	26,91	21,60
80°C	Atividade Específica	0,91	0,18	0,27	0,43	0,61	0,29	0,22	0,12
	% Atividade Residual	100,00	19,76	28,90	47,30	66,39	31,25	23,65	13,51

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Tabela 46. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Endoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	15,48	13,88	15,00	8,26	6,66	5,94	3,93	2,81
	% Atividade Residual	100,00	89,64	96,89	53,37	43,01	38,34	25,38	18,14
40°C	Atividade Específica	16,28	17,81	8,90	7,46	6,82	5,62	4,89	4,09
	% Atividade Residual	100,00	109,36	54,68	45,81	41,87	34,48	30,05	25,12
50°C	Atividade Específica	15,80	21,50	9,79	6,90	6,02	6,02	4,97	3,85
	% Atividade Residual	100,00	136,04	61,93	43,66	38,07	38,07	31,47	24,67
60°C	Atividade Específica	16,04	5,37	5,46	5,62	7,94	11,07	9,63	8,5
	% Atividade Residual	100,00	35,50	34,00	35,00	49,50	69,00	60,00	53,00
70°C	Atividade Específica	10,43	2,96	4,67	5,33	6,15	9,99	5,76	4,01
	% Atividade Residual	100,00	28,42	44,74	51,05	58,95	95,79	55,26	38,42
80°C	Atividade Específica	11,20	6,42	6,92	8,67	8,95	11,58	8,18	6,48
	% Atividade Residual	100,00	57,35	61,77	77,45	79,90	103,43	73,04	57,84

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 47. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de Exoglucanase de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	19,25	12,47	13,44	19,49	29,20	22,06	19,94	14,20
	% Atividade Residual	100,00	64,79	69,79	101,15	151,67	114,58	103,54	73,75
40°C	Atividade Específica	20,14	19,25	18,29	18,25	15,96	15,44	14,84	14,68
	% Atividade Residual	100,00	95,62	90,84	90,64	79,28	76,69	73,71	72,91
50°C	Atividade Específica	20,46	15,48	18,05	22,22	24,23	32,89	14,12	13,78
	% Atividade Residual	100,00	75,69	88,24	108,63	118,43	160,78	69,02	67,26
60°C	Atividade Específica	20,9	19,76	18,81	18,05	15,68	14,72	4,29	3,97
	% Atividade Residual	100,00	94,63	90,02	86,37	75,05	70,44	20,54	19,00
70°C	Atividade Específica	13,70	3,68	5,87	7,03	21,19	7,74	6,31	2,22
	% Atividade Residual	100,00	26,85	42,89	51,30	154,71	56,51	46,09	16,23
80°C	Atividade Específica	13,92	3,62	4,56	8,81	8,13	5,44	5,13	2,42
	% Atividade Residual	100,00	26,04	32,74	63,31	58,38	39,05	36,88	17,36

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ Tabela 48. Atividade Enzimática Específica e Porcentagem de Atividade Residual de FPAse de *Aspergillus terreus* em Meio D em diferentes Temperaturas.

	Tempo de Incubação (h)	0	0,17	0,5	1	2	3	4	5
30°C	Atividade Específica*	6,79	4,92	5,40	2,51	2,30	2,24	1,28	1,23
	% Atividade Residual	100,00	72,44	79,53	37,01	33,86	33,07	18,90	18,11
40°C	Atividade Específica	7,17	8,02	7,97	7,86	7,70	6,42	5,40	4,92
	% Atividade Residual	100,00	111,94	111,19	109,70	107,46	89,55	75,37	68,66
50°C	Atividade Específica	7,01	8,18	7,54	6,63	5,46	4,55	3,80	3,48
	% Atividade Residual	100,00	116,79	107,63	94,66	77,86	64,89	54,20	49,62
60°C	Atividade Específica	7,38	3,42	4,65	5,46	6,63	4,71	4,42	3,69
	% Atividade Residual	100,00	46,38	63,04	73,91	89,86	63,78	60,15	50,00
70°C	Atividade Específica	4,79	1,39	1,72	2,05	3,66	2,93	2,45	2,20
	% Atividade Residual	100,00	29,01	35,88	42,75	786,34	61,07	51,15	45,80
80°C	Atividade Específica	4,61	2,78	3,59	3,84	3,33	3,00	2,78	1,94
	% Atividade Residual	100,00	60,32	77,78	83,33	72,22	65,08	60,32	42,06

* Atividade Específica: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$