

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

**ALINE BISINELLA IANOSKI**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E PECTINASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS UTILIZANDO APARAS DE PAPEL CONTENDO  
TINTA E BAGAÇO DE UVA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA  
2016**

**ALINE BISINELLA IANOSKI**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E PECTINASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS UTILIZANDO APARAS DE PAPEL CONTENDO  
TINTA E BAGAÇO DE UVA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Giselle Maria Maciel

**CURITIBA  
2016**

**ALINE BISINELLA IANOSKI**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E PECTINASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS UTILIZANDO APARAS DE PAPEL CONTENDO  
TINTA E BAGAÇO DE UVA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1** – PROF. DR. GUSTAVO HENRIQUE COUTO  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

**Membro 2** – PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARLENE SOARES  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

**Orientador** – PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. GISELLE MARIA MACIEL  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

**Coordenador de Curso** – PROF. Me ALESSANDRO FEITOSA MACHADO

Curitiba, 13 de junho de 2016.

*Aos meus pais, Marcos e Dalila, pelo amor, paciência, apoio e dedicação.*

*À minha irmã Lires, por ser meu porto seguro, sempre!*

*À minha "vóvis" Hermínia, pela bondade e pelos preciosos ensinamentos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela presença em cada dia da minha vida, por iluminar os meus caminhos, pelo conforto nos momentos difíceis e por tornar meus sonhos realidade.

Agradecimento especial a Dr<sup>a</sup>. Giselle Maria Maciel, orientadora, pela paciência, disponibilidade e otimismo. Por compartilhar seus conhecimentos com tanta alegria e dedicação. O seu entusiasmo é contagiante. A você, a minha gratidão!

Aos membros da banca, Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares e Dr. Gustavo Couto, pela disposição na avaliação deste projeto e pelas importantes contribuições para o aperfeiçoamento do mesmo.

À querida amiga Aline Cristine Hermann Bonato, por trazer luz nos meus dias de escuridão e paz nos meus dias de caos. Agradeço o imensurável auxílio no desenvolvimento deste projeto. A sua amizade foi fundamental!

Aos colegas do Curso de Tecnologia em Processos Ambientais, pela companhia. Em especial aos amigos Daniel Gonçalves e Gleiceane Libero, pelos preciosos momentos de descontração. Muito obrigada!

À Morgana Kuwaki, pela disposição em auxiliar nas análises, pelo apoio e pelas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Microbiologia e Ecotoxicologia pelo companheirismo durante este ano.

Aos professores do Departamento de Química e Biologia, por compartilhar conhecimentos e dividir experiências no decorrer desta graduação. Muito obrigada!

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pelo apoio institucional no desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

IANOSKI, Aline Bisinella. Produção de celulases e pectinases por fungos filamentosos utilizando aparas de papel contendo tinta e bagaço de uva. 2016. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais – Departamento Acadêmico de Química e Biologia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Nos últimos anos houve um aumento expressivo na geração de resíduos derivados dos setores industriais e agroindustriais no Brasil. No ramo industrial, destaca-se a fabricação de papel e celulose, já no ramo agroindustrial destaca-se a vitivinicultura. Entre os resíduos resultantes destas duas atividades, estão as aparas de papel contendo tinta e o bagaço de uva. Para que estes resíduos tenham um melhor aproveitamento, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem alternativas mais nobres para a sua destinação. Neste contexto, a proposta do presente trabalho foi a utilização das aparas de papel contendo tinta e do bagaço de uva Bordô como substratos para produção de celulases e pectinases, respectivamente, secretadas por fungos filamentosos. Através do isolamento de fungos em placas contendo ágar extrato de malte, foi possível obter sete culturas axênicas, para posterior avaliação do índice enzimático de cada fungo e seleção dos produtores de celulases e pectinases. Para a produção de celulases foi selecionado o fungo *Ganoderma* sp., e para produção de pectinases foi selecionado o fungo isolado LB009. O fungo *Aspergillus niger* foi utilizado como controle para a produção de ambas as enzimas hidrolíticas. A produção enzimática foi realizada em meio de cultivo líquido com diferentes composições. O meio de cultivo que mais induziu a produção de celulases foi o composto por solução salina, peptona e aparas de papel contendo tinta, utilizando como inóculo *Aspergillus niger*, resultando em 59,63 FPU.L<sup>-1</sup>. Para produção de pectinases, o meio de cultivo que apresentou melhor condição foi o composto por glicose, bagaço de uva Bordô e pectina, com inóculo do fungo LB009, apresentando 5268,52 U.L<sup>-1</sup>. Os resultados demonstram que a composição do meio de cultivo, em relação à disponibilidade de nutrientes, como o carbono e nitrogênio, influenciaram na produção enzimática. A utilização das aparas de papel contendo tinta e do bagaço de uva Bordô como substrato no meio de cultivo líquido favoreceu a produção de celulases e pectinases, representando assim, uma alternativa interessante para a destinação dos resíduos oriundos do setor industrial e agroindustrial. Assim como, uma alternativa de baixo custo para a produção de celulases e pectinases por fungos filamentosos.

**Palavras-chave:** Papel e Celulose. Vitivinicultura. Enzimas Microbianas. *Ganoderma* sp. *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

IANOSKI, Aline Bisinella. Cellulase and pectinase production by filamentous fungi using shavings of paper containing ink and grape pomace. 2016. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais – Departamento Acadêmico de Química e Biologia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

In recent years there has been a significant increase in the generation of waste derived from industrial and agro-industrial sectors in Brazil. In the industrial sector, the production of paper and pulp is highlighted, however in the agro-industrial sector the viticulture is highlighted. Among the waste resulting from these two activities, are the shavings of paper containing ink and grape pomace. In order to have a better use from the waste, the development of studies to evaluate nobler alternative to its destination is required. In this context, the purpose of this study is the use of shavings of paper containing ink and grape pomace Bordô as substrates for the production of cellulases and pectinases, respectively, secreted by filamentous fungi. By isolating the fungi on plates containing malt extract agar, it was possible to get seven axenic cultures, for later evaluation of the enzyme production of each fungus and selection of producers of cellulases and pectinases. For the production of cellulases, the fungus *Ganoderma* sp. has been selected, and for the production of pectinase the fungus isolated LB009 was selected. The fungus *Aspergillus niger* was used as a control for both the production of hydrolytic enzymes. The enzyme production was performed in liquid culture with different compositions. The culture medium that induced the production of more cellulases was composed of saline solution, peptone and shavings of paper containing ink, using as *Aspergillus niger*, inoculum resulting in 59,63 FPU.L<sup>-1</sup>. For production of pectinases, the culture medium that has the best condition was composed of glucose, grape pomace Bordô and pectin, with inoculum LB009 fungus, presenting 5268.52 U.L<sup>-1</sup>. The results demonstrated that the composition of the culture medium, in relation to availability of nutrients, such as carbon and nitrogen, influenced enzyme production. The use of shavings of paper containing ink and grape pomace Bordô as a substrate in the liquid system favored the production of cellulases and pectinases, thus representing an interesting alternative for the disposal of waste from the industrial and agro-industrial sector, as well as a low cost alternative for the production of cellulases and pectinases for filamentous fungi.

**Keywords:** Paper and Pulp. Viticulture. Microbial Enzymes. *Ganoderma* sp. *Aspergillus niger*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma simplificado da reciclagem das aparas de papel.....	15
Figura 2 - Fluxograma da produção de vinho e os principais resíduos gerados. ....	17
Figura 3 - Esquema da parede celular dos vegetais e a molécula de celulose.....	22
Figura 4 - Esquema da parede celular dos vegetais e a molécula de pectina.....	23
Figura 5 - Etapas envolvidas na realização do projeto de pesquisa.....	26
Figura 6 - Inóculo de <i>Ganoderma</i> sp.....	30
Figura 7 - Halos de degradação com Vermelho do Congo 1% (A) e Lugol de Gram (B) em cultivo de <i>Ganoderma</i> sp. em meio sólido para celulasas, após 4 dias a 28°C .....	40
Figura 8 - Microrganismos selecionados para produção enzimática.....	41
Figura 9 - Fungo LB009 observado em microscópio óptico com.....	41
Figura 10 - Curvas analíticas de glicose para a metodologia em microplacas (A) e para metodologia em tubos de ensaio (B).....	42
Figura 11 - Curva analítica de ácido D-galacturônico.....	46



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Microrganismos produtores de celulases e pectinases.....	20
Quadro 2- Enzimas celulolíticas e seus principais mecanismos de degradação.....	22
Quadro 3 - Enzimas despolimerantes e seus principais mecanismos de degradação. .....	24
Quadro 4 - Enzimas protopectinases e desmetoxilantes e seus principais mecanismos de degradação. ....	25
Quadro 5 - Culturas axênicas obtidas na etapa de isolamento dos fungos filamentosos.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Meios de cultivo para produção de celulases por <i>Ganoderma</i> sp.....	31
Tabela 2 - Meios de cultivo para produção de celulases por <i>Aspergillus niger</i> . ....	32
Tabela 3 - Meios de cultivo para produção de pectinases a partir da suspensão de esporos de <i>Aspergillus niger</i> e LB009.....	33
Tabela 4 - Índice enzimático obtido no meio sólido para celulase e no meio sólido para pectinases medido após 7 dias de incubação a 28°C, utilizando Lugol de Gram como solução reveladora. ....	38
Tabela 5 - Índice enzimático obtido no meio sólido para celulase e no meio sólido para pectinases medido após 4 dias de incubação a 28°C, utilizando Lugol de Gram e Vermelho do Congo 1% como solução reveladora. ....	39
Tabela 6 - Produção de celulases por <i>Ganoderma</i> sp. ....	43
Tabela 7 - Produção de celulases por <i>Aspergillus niger</i> .....	44
Tabela 8 - Produção de pectinases a partir da suspensão de esporos de <i>Aspergillus niger</i> e LB009.....	46

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
3.1	ASPECTOS DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE .....	14
3.1.1	Aparas de Papel Contendo Tinta.....	14
3.2	ASPECTOS DA VITIVINICULTURA.....	16
3.2.1	Processo de Produção de Vinho Tinto .....	17
3.2.2	O Bagaço de Uva .....	18
3.3	FUNGOS FILAMENTOSOS .....	19
3.3.1	Microrganismos de Interesse.....	19
3.4	ENZIMAS .....	20
3.4.1	Celulases.....	21
3.4.2	Pectinases .....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
4.1	ETAPAS DO PROJETO DE PESQUISA.....	26
4.1.1	Etapa 1 – Isolamento dos Fungos Filamentosos.....	26
4.1.2	Etapa 2 – Seleção dos Microrganismos de Interesse.....	27
4.1.3	Etapa 3 – Produção dos Extratos Enzimáticos.....	28
4.1.3.1	Produção do inóculo.....	29
4.1.3.2	Produção do extrato enzimático de celulases e pectinases .....	30
4.1.3.2.1	<i>Produção do extrato enzimático de celulases .....</i>	<i>30</i>
4.1.3.2.2	<i>Produção do extrato enzimático de pectinases .....</i>	<i>33</i>
4.1.3.3	Avaliação da atividade enzimática.....	33
4.1.3.3.1	<i>Avaliação da atividade das celulases totais .....</i>	<i>34</i>
4.1.3.3.2	<i>Avaliação da atividade das pectinases.....</i>	<i>35</i>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS .....	37
5.2	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS DE INTERESSE .....	38
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CELULASES TOTAIS .....	42
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS PECTINASES.....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os setores industriais e agroindustriais, que cresceram no Brasil nos últimos anos, está a indústria de papel e celulose e a vitivinicultura. O crescimento destas duas atividades não é por acaso. O papel faz parte do nosso cotidiano, sendo difícil imaginar um mundo sem ele. Utilizamos o papel para embalagens, para impressão, higiene, entre outras aplicações. E a vitivinicultura também está cada vez mais presente no nosso dia a dia, seja pela colonização europeia que trouxe consigo as primeiras cultivares, quanto pelas recentes pesquisas que apresentam as propriedades benéficas da ingestão da uva e seus derivados.

Em 2013, foram produzidas 15 milhões de toneladas de celulose e 10 milhões de toneladas de papel no Brasil (BRACELPA, 2014). No ano de 2014, foram produzidas no Brasil 606 toneladas de uvas (UVIBRA, 2014). O desenvolvimento industrial e agroindustrial de um país é desejável e traz benefícios, porém também traz consigo fatores indesejáveis, como a expressiva geração de resíduos derivados destas atividades.

A indústria de papel e celulose gera significativas quantidades de aparas de papel durante o seu processo de fabricação, e continua gerando após o descarte pelo consumidor final. Estas aparas podem ser incorporadas novamente ao processo, através da reciclagem, porém a qualidade da polpa de celulose produzida nem sempre é satisfatória, devido à presença de contaminantes como colas e tintas, que devem ser completamente removidas. Esta remoção é alcançada através da utilização de produtos químicos (SOUSA, 2002).

Na vitivinicultura, o maior resíduo gerado é o bagaço de uva. Este resíduo é frequentemente subexplorado, sendo destinado principalmente para a adubação dos vinhedos e ração animal. Quando os resíduos destes dois ramos de atividade são descartados inadequadamente podem se tornar um problema ambiental (STAFUSSA, 2014).

Neste contexto, existe a necessidade de desenvolver novas aplicações para estes resíduos, a fim de minimizar os danos causados pela sua destinação incorreta ou utilização ineficiente. Uma possibilidade seria usá-los com substrato para produção de enzimas microbianas, como as celulases e as pectinases, através de

fungos filamentosos. As enzimas são capazes de aumentar a velocidade em que reações químicas e biológicas acontecem, em condições reacionais mais brandas que as das catálises químicas, além de possuir especificidade enzimática, o que proporciona um controle maior sobre as características do produto final (FELLOWS, 2006). Esta alternativa se torna ainda mais interessante, uma vez que estas enzimas podem ser aplicadas não só na indústria de papel e celulose e na vitivinicultura, mas também em outros setores industriais, como o alimentício e o têxtil. A utilização de resíduos oriundos de processos industriais e agroindustriais como substrato para a produção de enzimas e sua posterior aplicação dentro do processo produtivo da indústria pode vir a representar uma alternativa de baixo custo para este setor. Além disto, as enzimas representam uma opção menos agressiva ao meio ambiente, já que podem substituir ou minimizar a utilização de produtos químicos nas etapas dos processos industriais para obter as características desejadas no produto final.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir as enzimas celulasas e pectinases com fungos filamentosos utilizando os papéis impressos contendo tinta e o bagaço da uva Bordô como substratos, respectivamente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos filamentosos a partir de amostras do solo, de madeira, de uva e de outras frutas e vegetais;
- Selecionar microrganismos quanto à produção de celulasas e pectinases em meios sólidos em placas de Petri;
- Avaliar a produção de celulasas utilizando o papel contendo tinta como substrato;
- Avaliar a produção de pectinases utilizando o bagaço de uva Bordô como substrato.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ASPECTOS DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

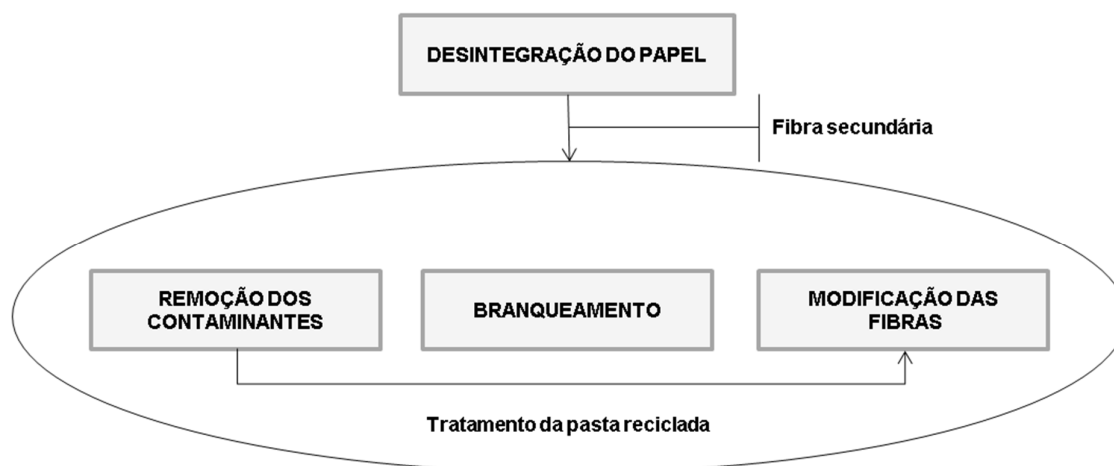
A demanda por papel faz parte do nosso cotidiano, sendo utilizado na indústria, nos domicílios e no comércio. O papel é utilizado para impressões, para embalagens, para fabricação de cédulas, para armazenamento e para inúmeras outras finalidades (SANTOS, 2010). Portanto, é de se esperar que a indústria de papel e celulose apresente um crescimento significativo a cada ano que passa.

O Brasil já é o 9º maior produtor de papel e o 4º maior produtor de celulose do mundo. No ano de 2013, o Brasil produziu 15 milhões de toneladas de celulose e 10 milhões de toneladas de papel (BRACELPA, 2014). Como consequência do crescimento deste setor está o aumento no volume dos resíduos gerados durante todo o processo, entre eles destacam-se as aparas de papel contendo tinta ou não, a geração de efluentes e a extração contínua de matéria-prima. Neste sentido, a reciclagem de papel significa uma boa alternativa ao processo tradicional, pois gera empregos, diminui o impacto ambiental da extração da matéria-prima, o montante de lixo destinado aos aterros e reduz os gastos com água e energia (SANTOS, 2010). Segundo dados da BRACELPA (2014), a taxa de recuperação das aparas no Brasil é de 45,5%. Porém, as etapas de reciclagem também têm efeitos danosos ao meio ambiente, pois geram uma significativa carga de poluentes ao final do processo, devido ao uso de reagentes químicos para obtenção das características desejáveis à polpa de celulose. Essa carga de poluentes pode ser minimizada pela incorporação de enzimas em algumas etapas do processo, destacando-se enzimas hidrolíticas como as celulases, por exemplo (SOUSA, 2002).

##### 3.1.1 Aparas de Papel Contendo Tinta

Dentre todos os resíduos oriundos da indústria de papel e celulose, destacam-se as aparas de papel geradas durante a fabricação do produto e aquelas contendo

tinta, descartadas pelo consumidor final. Estas aparas podem ser incorporadas novamente ao processo, como fibras secundária na polpa de celulose (Figura 1). Para que isto seja possível, é necessário que as fibras sejam modificadas e a tinta removida (SOUSA, 2002).



**Figura 1- Fluxograma simplificado da reciclagem das aparas de papel.**  
**Fonte: Adaptado de SOUSA (2002).**

Antes da desintegração do papel, os grampos, cliques, plásticos e alguns outros materiais são removidos do processo (SANTOS, 2010). A desintegração do papel resulta na fibra secundária, que apresenta algumas limitações, pois já teve as suas fibras modificadas anteriormente. Então, é necessário manipular as fibras e remover a tinta para que seja possível obter uma polpa de celulose de boa qualidade. É na etapa de remoção dos contaminantes que substâncias como colas e tintas são removidas. Este objetivo é alcançado através do uso de hidróxidos de metais alcalinos, detergentes e agentes dispersantes, porém o uso destes produtos acarreta em efluentes com altas cargas de poluentes (SOUSA, 2002). De acordo com KHANDELWAL *et al.* (2011), existe a possibilidade de aplicar enzimas ao processo de reciclagem, pois elas são capazes de modificar as fibras secundárias e remover a tinta de maneira eficiente, sem prejudicar a qualidade do produto final. A utilização de enzimas se apresenta como uma alternativa para a redução do uso de produtos químicos no processo de fabricação da polpa de celulose e, conseqüentemente, na geração de efluentes com elevadas cargas de poluentes (SOUSA, 2002). A metodologia enzimática permite que as aparas de papel contendo tinta atuem como substrato para a produção de celulases que podem ser



utilizadas na própria indústria de papel e celulose ou destinadas para outros ramos industriais.

### 3.2 ASPECTOS DA VITIVINICULTURA

O amplo território brasileiro e o seu clima favorável para a agricultura, fizeram do agronegócio a base para a economia do país. O aumento da demanda populacional por estes produtos fez com que a agroindústria ganhasse ainda mais força no território nacional, como consequência a geração de resíduos oriundos desta atividade também aumentou de maneira significativa (PEREIRA e GAMEIRO, 2008; MELO, 2010).

Uma das culturas agrícolas que vem ganhando força mundialmente nos últimos anos é a vitivinicultura, que engloba uvas de duas origens distintas, são elas: a *Vitis vinifera*, de origem européia e a *Vitis labrusca*, de origem americana. A *Vitis labrusca* por se adaptar mais facilmente ao clima do Brasil é a mais produzida no país, sendo utilizada tanto para a produção de vinhos, como para produção de sucos e derivados. Um dos exemplos de *Vitis labrusca* cultivada com sucesso no Brasil é a uva tinta Bordô, também conhecida como uva Terceira (STAFUSSA, 2014).

Segundo MELLO (2012), houve aumento mundial da produtividade média anual de uva. Em 1990 eram produzidas 59,74 milhões de toneladas, já no ano de 2010 foram produzidas 68,31 milhões de toneladas de uvas no mundo. Neste mesmo ano, o Brasil ocupou a 14ª posição de maior produtor de uvas do mundo. E no ano de 2014, foram produzidas no Brasil 606 toneladas de uvas (UVIBRA, 2014).

Além dos estados do sul, outros estados também participam da produção de uvas no país, entre eles estão os estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (MELLO, 2013). O crescimento da vitivinicultura e do processamento da uva tem como consequência um aumento na geração de resíduos derivados deste setor. Estes resíduos podem ser destinados para adubação, geralmente dos vinhedos, para a nutrição animal na elaboração de rações, porém com baixo teor nutricional ou podem ser descartados no meio ambiente podendo acarretar em sérios danos ambientais (STAFUSSA, 2014). Porém existe a possibilidade de uma

utilização mais interessante destes rejeitos, e que deve ser otimizada e explorada a fim de agregar maior valor econômico a estes resíduos. O bagaço de uva é rico em compostos orgânicos e uma das alternativas seria utilizá-lo como substrato para produção de enzimas de interesse industrial, como as pectinases.

### 3.2.1 Processo de Produção de Vinho Tinto

O processo de produção do vinho compreende várias etapas e cada uma interfere nas características e qualidade do produto final. A figura 2 representa o fluxograma da produção do vinho.

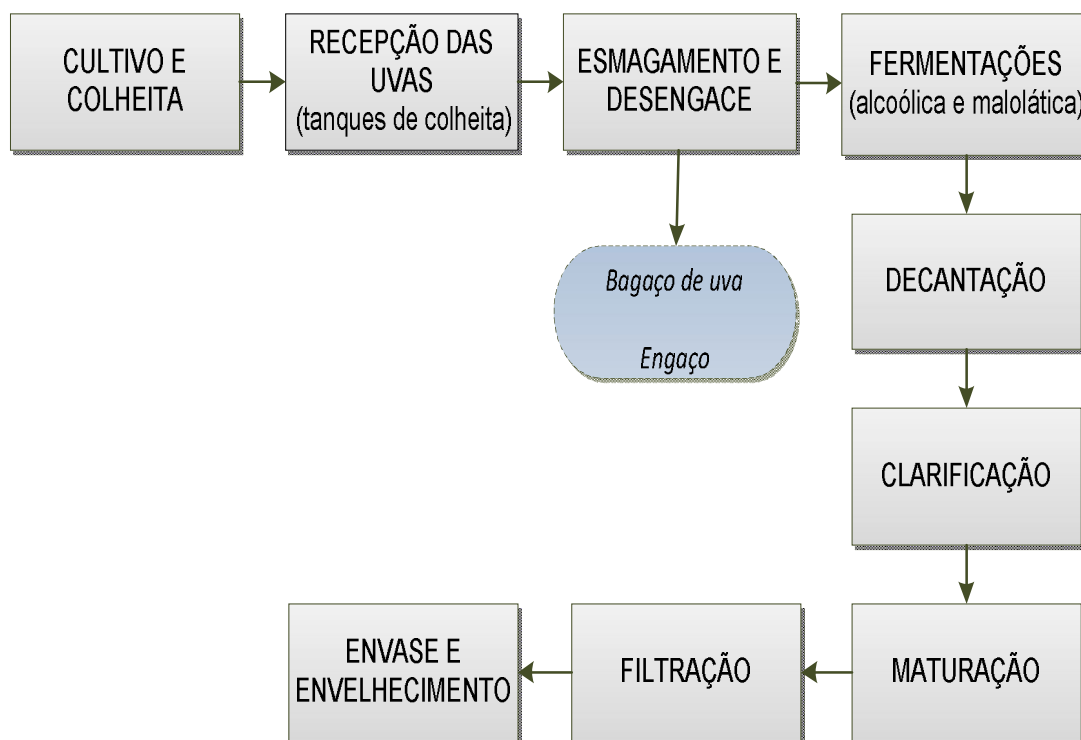


Figura 2 - Fluxograma da produção de vinho e os principais resíduos gerados.  
Fonte: Adaptado de STAFUSSA (2014).

A primeira etapa do processo de produção do vinho compreende o cultivo e a colheita da uva, que deve acontecer no tempo certo de maturação da fruta. Na recepção das uvas é necessário certificar-se das condições higiênicas dos tanques de colheita e do controle de produção. Após o esmagamento das bagas é necessário que o engaço seja retirado do processo para não alterar as características do produto final. O mosto resultante do esmagamento das bagas sofre duas fermentações, a alcoólica e a malolática para produção de álcool e redução da acidez, respectivamente. Na decantação ocorre a sedimentação da borra resultante do processo de fermentação do mosto, denominada borra de fermentação (MELO, 2010; STAFUSSA, 2014). A clarificação é a retirada das substâncias indesejáveis, tanto em suspensão quanto em dissolução no vinho bruto. Para a maturação do vinho ele é acondicionado em barris de carvalho ou em tanques de aço inóx. Após esta etapa, o vinho deve ser filtrado para remoção das partículas que ainda estão em suspensão no produto.

As últimas etapas do processo de fabricação do vinho são o envase e o envelhecimento do produto, que deve ocorrer em caves climatizadas e em tempos variáveis. Cada etapa do processo de produção do vinho deve ser desenvolvida de acordo com as características que se espera obter no produto final (STAFUSSA, 2014).

### 3.2.2 O Bagaço de Uva

No processo de produção do vinho o principal resíduo é composto por 20% de engaços, 58% de cascas e 22% de sementes. Segundo STAFUSSA (2014), 20% do peso da uva é representado pelo bagaço, que é formado pelas cascas e sementes do fruto.

De acordo com MELO (2010), uma parte deste resíduo pode ser destinado para produção de outra bebida alcoólica, denominada grappa, mas ainda assim o montante residual descartado é muito grande.

### 3.3 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são capazes de degradar a matéria orgânica, portanto são decompositores. Esta degradação é consequência da forma de nutrição destes microrganismos, que acontece através de um mecanismo denominado digestão extracelular. Este mecanismo de alimentação consiste na secreção de diversas enzimas, que são capazes de degradar o alimento, tornando disponíveis os nutrientes de interesse para que os microrganismos façam a sua absorção (RAMOS, 2012; TORTORA *et al.*, 2005). Esta capacidade, de produzir um conjunto de enzimas capazes de metabolizar completamente diversas substâncias, torna os fungos microrganismos altamente interessantes para a área biotecnológica. Neste contexto, destacam-se os fungos filamentosos que, segundo GUIMARÃES *et al.*(2006), são os mais interessantes para este fim, pois apresentam alta eficiência na produção de diversas enzimas e são facilmente cultiváveis.

#### 3.3.1 Microrganismos de Interesse

Os fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas hidrolíticas, dentre elas as celulasas e pectinases, sendo frequentemente pesquisados quanto à sua eficiência nesta tarefa, conforme quadro 1. Estes microrganismos são encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição, como troncos de árvores e frutas. Os fungos filamentosos podem secretar enzimas como as celulasas e as pectinases em diferentes substratos provenientes de resíduos agroindustriais, como casca de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de uva (SÁNCHEZ, 2014; SILVA, 2008; VALADARES, 2013). Desta forma, tornam-se microrganismos interessantes tanto pela possibilidade de agregar valor econômico a um resíduo agroindustrial, que pode atuar como substrato para a obtenção da enzima por estes fungos, quanto do ponto de vista de outros setores industriais, que podem utilizá-lo nos seus processos de fabricação, tratamento ou degradação de determinado produto.

<b>Microrganismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referência</b>
<i>Agaricus brasilienses</i>	Celulases e Pectinases	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus flavus</i>	Celulases e Pectinases	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus fumigatos</i>	Celulases	Grigorevski-Lima <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus japonicus</i>	Pectinases	Bezerra <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Celulases e Pectinases	Farinas <i>et al.</i> , 2010 Rodríguez-Fernández <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus niveus</i>	Pectinases	Maller <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium glandicola</i>	Pectinases	Bezerra <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium echinulatum</i>	Celulases	Sehnem <i>et al.</i> , 2006
<i>Penicillium viridicatum</i>	Pectinases	Ferreira <i>et al.</i> , 2010
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Celulases e Pectinases	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Pectinases	Martins <i>et al.</i> , 2007
<i>Trichoderma harzianum</i>	Celulases	Castro <i>et al.</i> , 2010

**Quadro 1 - Microrganismos produtores de celulases e pectinases.**  
**Fonte: Adaptado de VALENCIA (2013).**

### 3.4 ENZIMAS

Enzimas são proteínas capazes de catalisar reações químicas, ou seja, aumentar consideravelmente a velocidade em que elas acontecem. A catálise enzimática usualmente ocorre na presença de co-fatores no sítio ativo das enzimas, como íons metálicos ou moléculas orgânicas (coenzimas), e em determinadas condições de pH e temperatura. Cada enzima possui uma organização estrutural específica, que geralmente combina com um único substrato (reagente) (MARZZOCO e TORRES, 1999; VOET *et al.*, 2008). A presença de inúmeras substâncias em um meio dificulta o controle de quais reações são importantes para

determinado momento, mas a especificidade enzimática permite definir quais reações irão ou não acontecer dentro de um sistema.

Existe uma classificação adotada pela União Internacional de Bioquímica (IUMB) para evitar a ocorrência de homônimos, que classifica as enzimas em seis classes são elas: oxidoreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Além das classes, as enzimas ainda são classificadas de acordo com a subclasse, subsubclasse e número de série, sempre precedidas da sigla “EC” (*Enzyme Commission*) (VOET *et al.*, 2008).

As enzimas podem ser produzidas por animais, vegetais e por microrganismos, sendo que as enzimas produzidas por este último grupo são utilizadas em diversos ramos industriais (FERNANDES, 2009). Uma grande vantagem da sua utilização na indústria é a especificidade enzimática, já que a adição de enzimas a um processo torna possível atingir os resultados desejados em condições mais amenas de pH e temperatura, quando comparada às modificações químicas de um sistema (FELLOWS, 2006). Elas podem ser aplicadas na indústria de alimentos, na indústria têxtil e no tratamento de águas residuárias. Dentre as enzimas hidrolíticas destinadas à indústria, destacam-se as pectinases e as celulasas.

### 3.4.1 Celulasas

A celulose está presente na parede celular dos vegetais e faz parte da biomassa lignocelulósica, juntamente com lignina, a hemicelulose e a pectina. A composição da parede celular varia de organismo para organismo, consequentemente as quantidades de celulose variam também. Contudo ela está presente em maiores proporções na parede celular quando comparada aos outros componentes desta estrutura. A molécula de celulose (Figura 3) é formada por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e está estruturalmente ligada às outras substâncias que compõem a parede celular, formando uma rede complexa que dificulta o acesso a este substrato. Contudo apesar da forma cristalina da celulose ser insolúvel, a parte amorfa é solúvel (CASTRO e JÚNIOR, 2010; MAYRINK, 2010).

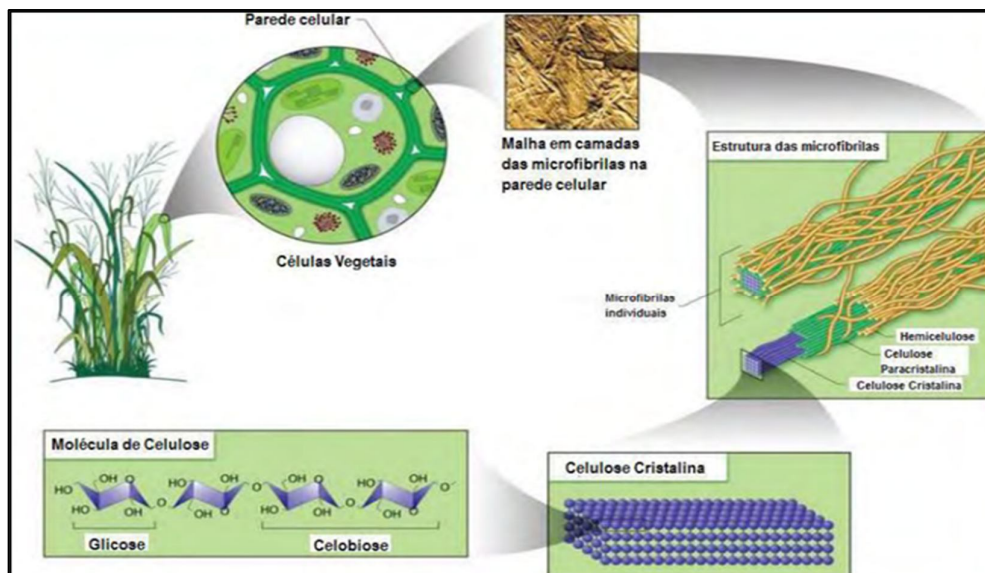


Figura 3 - Esquema da parede celular dos vegetais e a molécula de celulose.  
Fonte: SANTOS (2012).

As enzimas que degradam a celulose são chamadas de celulasas e dividem-se em 3 grupos: as endoglucanases, as exoglucanases, que compreende outros dois tipos de enzimas, e as  $\beta$  – glicosidases (CASTRO e JÚNIOR, 2010; JURUTU e WU, 2014). A ação sinérgica destes três grupos é capaz de promover a hidrólise total da celulose, conforme o quadro 2.

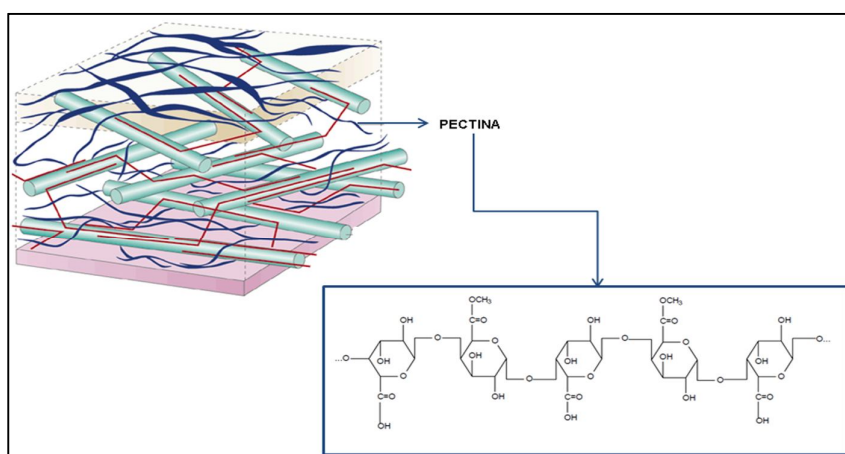
EC	NOME (SIGLA)	MECANISMO DE DEGRADAÇÃO
3.2.1.4	Endoglucanases (EnG)	Hidrólise - clivagem das ligações internas da fibra celulósica, liberação de oligossacarídeos de variáveis graus de polimerização.
-	Exoglucanases (ExG)	Hidrólise - clivagem das ligações externas da fibra celulósica, liberação de celobiose e glicose.
3.2.1.91	<i>Celobiohidrolase (CBH): tipo I (CBH I) e tipo II (CBH II)</i>	
3.2.1.74	<i>Glucano-hidrolase (GH)</i>	
3.2.1.21	$\beta$ - glicosidases (BG)	Hidrólise - hidrólise da celobiose e dos oligossacarídeos solúveis, liberação de glicose.

Quadro 2- Enzimas celulolíticas e seus principais mecanismos de degradação.  
Fonte: Adaptado de CASTRO e JÚNIOR (2010).

A produção e a aplicação destas enzimas na indústria já acontece há alguns anos. As celulasas podem ser utilizadas como aditivos de rações animais para melhorar a digestibilidade, na indústria têxtil e de lavanderia para remoção de manchas, na indústria de papel e celulose para remoção de tintas e modificação das fibras da polpa celulósica, na indústria de alimentos para melhorar a filtração de extratos, amaciar e extrair compostos aromáticos das hortaliças, para clarificar sucos e vinhos e na hidrólise de biomassa para produção de etanol (FELLOWS, 2006; SILVA, 2008; CASTRO e JÚNIOR, 2010; JURUTU e WU, 2014).

### 3.4.2 Pectinases

A pectina é uma substância que faz parte da lamela média da parede celular das células vegetais, sendo constituída por ácidos galacturônicos unidos através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (Figura 4), e também pode apresentar na sua estrutura alguns açúcares neutros, como a ramnose, a arabinose e a xilose, por exemplo. A pectina é uma molécula de cadeia longa e de massa molecular definida (COELHO, 2008; UENOJO e PASTORE, 2007; WANG *et al.*, 2015).



**Figura 4 - Esquema da parede celular dos vegetais e a molécula de pectina.**  
Fonte: SMITH (2001); BOBBIO e BOBBIO<sup>1</sup> (1989) apud COELHO (2008).

<sup>1</sup> BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Introdução à Química de Alimentos. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 231p, 1989.



As enzimas que degradam a pectina são denominadas enzimas pectinolíticas e compreendem três grupos: as despolimerantes (Quadro 3), as protopectinases e as desmetoxilantes (Quadro 4). Estas enzimas degradam a pectina em diversos dos seus sítios ativos (JAYANI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2015). Estas enzimas podem ser produzidas por plantas e microrganismos, sendo que para a produção comercial utilizam-se com mais frequência os fungos, como *Aspergillus* sp. e o *Penicillium* sp., por exemplo (UENOJO e PASTORE, 2007).

A ação das enzimas pectinolíticas varia de acordo com a diversidade das substâncias pécticas presentes na célula vegetal para serem degradadas. Esta diversidade dita qual será o tipo de substrato, o mecanismo de ação e onde ocorrerá a quebra da ligação na molécula de pectina (FELLOWS, 2006; SANDRI, 2010).

EC	NOME (SIGLA)	MECANISMO DE DEGRADAÇÃO
<b>DESPOLIMERANTES</b>		
<b>Hidrolases</b>		
	Poligalacturonase (PG)	Hidrólise - hidrolise das ligações $\alpha$ - 1,4 do ácido poligalacturônico
3.2.1.15	<i>Endo poligalacturonase (endo - PG)</i>	
3.2.1.67	<i>Exo poligalacturonase 1 (exo - PG 1)</i>	
3.2.1.82	<i>Exo poligalacturonase 2 (exo - PG 2)</i>	
	Polimetilgalacturonase (PMG)	Hidrólise - hidrolise de polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos e oligogalacturonatos.
-	<i>Endo polimetilgalacturonase (endo - PMG)</i>	
-	<i>Exo polimetilgalacturonase (exo - PMG)</i>	
<b>Liases</b>		
	Poligalacturonato liase (PGL)	Trans-eliminação - clivagem da ligação $\alpha$ - 1,4 do ácido péctico
4.2.2.2	<i>Endo poligalacturonase liase (endo - PGL)</i>	
4.2.2.9	<i>Exo poligalacturonase liase (exo - PGL)</i>	
	Polimetilgalacturonato liase (PMGL)	Trans-eliminação - clivagem da ligações glicosíticas entre dois resíduos de ácido galacturônico e ácido péctico.
4.2.2.10	<i>Endo polimetilgalacturonato liase (endo - PMGL)</i>	
-	<i>Exo polimetilgalacturonato liase (exo - PMGL)</i>	

**Quadro 3 - Enzimas despolimerantes e seus principais mecanismos de degradação.**

Fonte: Adaptado de JAYANI *et al.* (2005).

EC	NOME (SIGLA)	MECANISMO DE DEGRADAÇÃO
<b>PROTOPECTINASES</b>		
-	Protopectinase tipo A (PPase-A)	Hidrólise - solubilização da protopectina e conversão em pectina.
-	Protopectinase tipo B (PPase-B)	
<b>DESMETOXILANTES</b>		
3.1.1.11	Pectina metil-esterase (PE)	Hidrólise - desesterificação dos grupos metoxila da pectina, liberação de metanol e conversão de pectina em ácido péctico.

**Quadro 4 - Enzimas protopectinases e desmetoxilantes e seus principais mecanismos de degradação.**

Fonte: Adaptado de JAYANI *et al.* (2005).

Esta variedade de mecanismos de ação das pectinases faz com elas, principalmente as de origem fúngica, possam ser amplamente aplicadas em diversos processos industriais, como por exemplo na fabricação de sucos, pois facilita a filtração e melhora a turbidez, na produção de geléias, na maceração e fibras vegetais, na extração de óleos cítricos, na produção de vinhos tintos para melhoria da cor e turbidez, na extração de amido da mandioca, na aceleração da fermentação de café e chás, na indústria de papel e celulose, na nutrição animal, no processamento têxtil como substituintes do tratamento químico na degomagem e no tratamento de águas residuárias (FELLOWS, 2006; JAYANI *et al.*, 2005; UENOJO e PASTORE, 2007).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ETAPAS DO PROJETO DE PESQUISA

A metodologia para o desenvolvimento da pesquisa foi realizada em três etapas, conforme a figura 5.

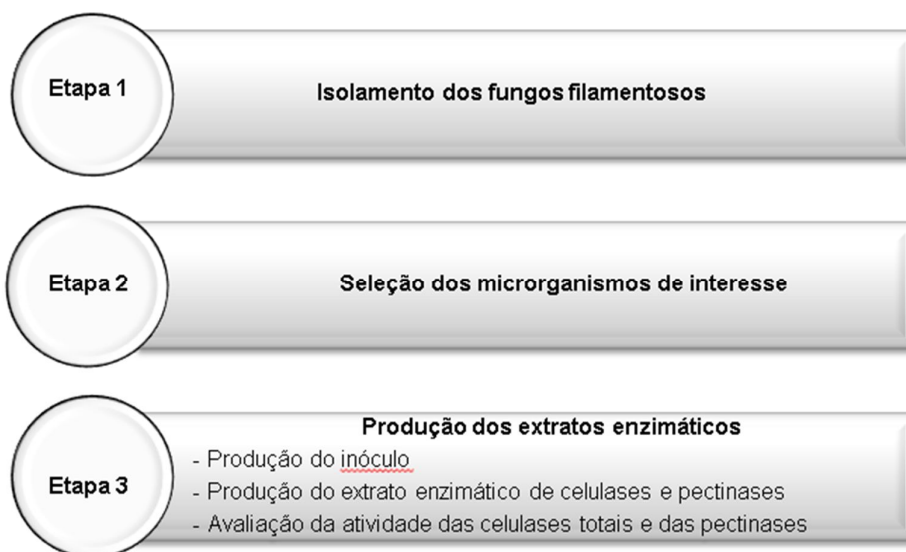


Figura 5 - Etapas envolvidas na realização do projeto de pesquisa

#### 4.1.1 Etapa 1 – Isolamento dos Fungos Filamentosos

Os microrganismos de interesse foram testados em meio sólido tanto para a produção de celulasas quanto para a produção de pectinases. Os fungos foram isolados através de amostras de madeira, de frutas, de outros vegetais e também por fungos disponíveis na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR. Uma pequena porção destas amostras foi inoculada em placas de Petri contendo meio ágar extrato de malte (AEM) e as placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante 7 dias. Após este período realizou-se o repique dos microrganismos

que apresentaram crescimento nas placas, em novas placas com meio AEM, a fim de isolar os fungos de interesse. Este procedimento repetiu-se até a obtenção de culturas axênicas. Quando possível a identificação por microscopia, os fungos foram analisados utilizando o corante azul de lactofenol-algodão (ANVISA, 2004). E para os microrganismos em que a identificação por microscopia não foi possível, foi feita a descrição de seu aspecto macromorfológico (FILHO, 2008).

As culturas fúngicas foram mantidas em meio AEM em placas e tubos de ensaio, a 4 °C. A preservação das culturas foi executada de acordo com o método de Castellani (CASTELLANI, 1967), com o uso de “plugs” de ágar em água destilada.

#### 4.1.2 Etapa 2 – Seleção dos Microrganismos de Interesse

A seleção dos fungos produtores de celulases e pectinases foi feita através do cultivo em meio sólido em placas de Petri, a fim de observar a formação do halo de degradação pelos microrganismos.

Para a seleção dos microrganismos produtores de celulases (meio A) e pectinases (meio B) utilizou-se o cultivo sólido em placas de Petri. “Plugs” (14,5 mm) do inóculo isolado foram retirados das placas contendo AEM, incubadas por sete dias a 28°C. Estes “plugs” foram então, adicionados no centro das placas de Petri (94 mm) que continham o meio específico para produção de cada uma das enzimas.

O meio A era composto por 0,2 % de carboximetilcelulose (CMC), 0,02% Peptona, 1,8% ágar e sais minerais (0,2% de  $\text{NaNO}_2$ , 0,1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05%  $\text{MgSO}_4$ ) (KASANA *et al.*, 2008).

O meio B era composto por 0,774% ácido cítrico, 0,25% pectina cítrica, 1,5% ágar e 1,793%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (COSTA *et al.*, 2014). Todos os meios de cultivo foram autoclavados a 121° C por 15 minutos. Esta etapa foi realizada em duplicata.

As placas foram inoculadas e posteriormente incubadas a 28° C por sete dias. Para medir o crescimento micelial, duas medidas perpendiculares do micélio eram feitas com auxílio de um paquímetro, essas medidas eram feitas diariamente, com o intuito de identificar o dia de maior crescimento micelial dentro dos 7 dias.

No sétimo dia, para a revelação do halo de degradação foi adicionado 20 ml da solução de Lugol de Gram (QELL) por 5 minutos ou até que o halo ficasse visível e fosse possível a sua medição.

Os microrganismos que apresentaram maior índice enzimático, de acordo com a equação 1, foram novamente inoculados no meio em que apresentaram maior produção enzimática. Neste momento também foi feita a inoculação do fungo *Aspergillus niger* tanto no meio A quanto no meio B. As placas foram incubadas por quatro dias a 28 °C. Desta vez, foram utilizadas duas soluções reveladoras de halo de degradação diferentes. Novamente foi utilizada a solução de Lugol de Gram, e também foi utilizada a solução de Vermelho do Congo 1%, sendo possível observar qualquer diferença em relação à revelação dos halos de acordo com a solução reveladora utilizada. Para a revelação do halo de degradação utilizando a solução de Vermelho do Congo 1%, 20 ml desta solução foi adicionada na placa de Petri por 30 minutos. Após este período a solução foi descartada e adicionou-se 20 ml de NaCl 1M por mais 30 minutos. No caso de invisibilidade do halo de degradação, repetiu-se o procedimento com a solução de NaCl 1 M (ZHANG *et al.*, 2009).

Para cada meio foi selecionado o fungo que apresentou o maior índice enzimático (IE), que relaciona o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, segundo a equação 1. Quanto maior foi o índice enzimático, maior será a produção enzimática pelo microrganismo (OLIVEIRA *et. al.*, 2006; FERNANDES, 2009; PEREIRA, 2012).

$$IE = \frac{\varnothing h}{\varnothing c} \quad (1)$$

Onde: IE = índice enzimático;  $\varnothing h$  = diâmetro do halo;  $\varnothing c$  = diâmetro da colônia.

#### 4.1.3 Etapa 3 – Produção dos Extratos Enzimáticos

A terceira etapa engloba três passos do projeto. O primeiro passo foi a produção do inóculo dos microrganismos selecionados de acordo com o índice enzimático apresentado. O segundo passo foi a produção do extrato enzimático de

cada uma das enzimas em meio líquido, utilizando composições variadas de meio de cultivo, assim como a introdução das aparas de papel contendo tinta e o bagaço de uva Bordô como substrato para a produção de celulases e pectinases. E o último passo desta etapa foi a avaliação da atividade das celulases totais e das pectinases.

#### 4.1.3.1 Produção do inóculo

Os microrganismos foram inoculados nos experimentos, na forma de pellets, plugs ou suspensão de esporos.

Para a produção dos pellets, 1 “plug” (14,5 mm) era removido de placas de Petri contendo o micélio fúngico armazenadas a 4°C para uma nova placa de Petri contendo AEM. Esta nova placa era então incubada em estufa por sete dias a 28°C. Desta placa, 4 “plugs” eram transferidos para os frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 80 ml de meio extrato de malte 2%, agitados em shaker a 135 rpm por 7 dias a 28°C para então serem inoculados na forma de pellets no meio para a produção do extrato enzimático (ESPELETA, 2014).

No caso da adição de “plugs”, um “plug” era removido da placa de Petri mantida a 4°C para uma nova placa de Petri, que era incubada em estufa por sete dias a 28°C. Desta mesma placa eram retirados os plugs para a adição ao meio de produção do extrato enzimático (NUNES *et al.*, 2015).

Para o preparo da suspensão de esporos, o fungo foi cultivado em Erlenmeyers de 125 ml contendo meio AEM, os frascos foram incubados em estufa por 7 dias a 28°C. Após este período, 30 ml de solução de NaCl 0,9% e Tween 80 1%, pérolas de vidro e uma barra magnética foram adicionadas ao Erlenmeyer contendo o cultivo fúngico. Este frasco então foi colocado em um agitador magnético para que a separação do microrganismo do meio de cultivo acontecesse e, assim, fosse possível a obtenção da suspensão de esporos. Após esta etapa, uma alíquota desta solução foi diluída, até que fosse possível a contagem dos esporos, e adicionada na Câmara de Neubauer para a contagem dos esporos (MACIEL, 2006).

O fungo *Ganoderma* sp. foi inoculado nos experimentos tanto na forma de pellets quanto na forma de “plug”. Os microrganismos LB009 e *Aspergillus niger*

foram adicionados aos ensaios como suspensão de esporos. Todos os meios de cultivo para produção do extrato enzimático foram autoclavados a 121° C por 15 minutos.

#### 4.1.3.2 Produção do extrato enzimático de celulasas e pectinases

A produção dos extratos enzimáticos, tanto de celulasas quanto de pectinases, ocorreu em cultivo líquido com agitação de 135 rpm por 4 dias a 28°C (DÍAZ *et al.*, 2012). Todos os meios de cultivo foram autoclavados a 121° C por 15 minutos.

##### 4.1.3.2.1 Produção do extrato enzimático de celulasas

Para a adição do inóculo de *Ganoderma* sp na forma de pellets foram adicionadas em cada frasco Erlenmeyer 3 espátulas de inóculo, aproximadamente 10 gramas de pellets úmidos, conforme figura 6, ou 50 mg de pellets secos.



**Figura 6 - Inóculo de *Ganoderma* sp. em forma de pellets.**

Para a adição do inoculo de *Ganoderma* sp. na forma de “plug”, foram adicionados quatro “plugs” (14,5 mm) em cada Erlenmeyer do experimento.

A composição dos meios de cultivo para produção do extrato enzimático de celulasas com o microrganismo *Ganoderma* sp. encontra-se na tabela 1 (SILVA, 2008).

**Tabela 1- Meios de cultivo para produção de celulasas por *Ganoderma* sp.**

Meio de cultivo	Composição (%)
Controle	1 CMC + 0,5 peptona
CMC + aparas de papel contendo tinta	1 aparas de papel contendo tinta + 1 CMC + 0,5 peptona
Aparas de papel contendo tinta	1 aparas de papel contendo tinta + 0,5 peptona

O fungo *Aspergillus niger* foi inoculado no ensaio para produção do extrato enzimático de celulasas na forma de suspensão de esporos, na concentração inicial de  $1 \cdot 10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup> no meio de produção enzimática.

Para o microrganismo *Aspergillus niger* foi adicionado glicose, como mais uma fonte de carbono no mesmo meio de cultivo que foi utilizado para a produção do extrato enzimático com o fungo *Ganoderma* sp. Além disso, outras composições de meio de cultivo foram elaboradas, contendo solução salina (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, NaNO<sub>3</sub> 0,2%, MgSO<sub>4</sub> 0,05%) (KASANA *et al.*, 2008; SILVA, 2008). A composição dos experimentos com *Aspergillus niger* encontram-se na tabela 2.

Os frascos Erlenmeyes foram incubados em shaker a 28°C por 4 dias sob agitação constante de 135 rpm (SILVA, 2008). As aparas de papel foram cortadas em quadrados de 1x1 cm.



**Tabela 2 - Meios de cultivo para produção de celulases por *Aspergillus niger*.**

Meio de cultivo	Composição (%)
Controle + glicose	1 CMC + 0,5 peptona + 0,5 glicose
CMC + aparas de papel contendo tinta + glicose	1 aparas de papel contendo tinta + 1 CMC + 0,5 peptona + 0,5 glicose
Aparas de papel contendo tinta + glicose	1 aparas de papel contendo tinta + 0,5 peptona + 0,5 glicose
Avicel (celulose microcristalina)	1 Avicel + solução salina
Avicel + peptona	1 Avicel + 0,5 peptona + solução salina
Aparas de papel contendo tinta + solução salina	1 aparas de papel contendo tinta + solução salina
Aparas de papel + peptona	1 Aparas de papel contendo tinta + 0,5 Peptona Bacteriológica + solução salina
CMC	1 CMC + solução salina
CMC + Peptona	1 CMC + 0,5 Peptona + solução salina

O pH de todos os meios de cultivo foram medidos e eles apresentaram pH inicial 6, não sendo realizado o seu tamponamento.

#### 4.1.3.2.2 Produção do extrato enzimático de pectinases

A adição aos experimentos do inóculo de LB009 ocorreu na forma de suspensão de esporos na concentração de  $1.10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup> e *Aspergillus niger* na concentração  $1.10^7$  esporos.ml<sup>-1</sup>. O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer contendo variação do meio de cultivo para produção de pectinases em solução salina (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5%, FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,0001%, ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,0008%, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,0004%, CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O 0,0001%) (DÍAZ *et al.*, 2012), conforme tabela 3.

**Tabela 3 - Meios de cultivo para produção de pectinases a partir da suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e LB009.**

Meio de Cultivo	Composição (%)
Controle	0,1 peptona + solução salina + 1,15 pectina + 0,5 glicose
Bagaço de uva Bordô + pectina	0,1 peptona + solução salina + 1,15 pectina + 1,15 bagaço de uva Bordô + 0,5 glicose
Bagaço de uva Bordô	0,1 peptona + solução salina + 1,15 bagaço de uva Bordô + 0,5 glicose

O pH do meio foi ajustado com tampão citrato de Sódio 0,1 M pH 6, uma vez que o bagaço de uva e a pectina cítrica acidificam o meio. Ao final do tamponamento o meio apresentava pH inicial 6.

#### 4.1.3.3 Avaliação da atividade enzimática

Para tornar a avaliação da atividade enzimática possível foi necessário filtrar e centrifugar o extrato obtido no ensaio anterior. A filtração do conteúdo dos

Erlenmeyers foi realizada através de funis de vidro e papel filtro de 12,5 de diâmetro e gramatura de 80g/m<sup>2</sup>, separando a biomassa do extrato enzimático. Posteriormente o extrato filtrado foi centrifugado a 3.696 g por 20 minutos em Microcentrifuga Modelo MCD - 2000. Alíquotas do sobrenadante foram armazenadas em tubos eppendorfs e congeladas a -20°C até a análise da atividade enzimática.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto ( SANTI, 2005).

#### 4.1.3.3.1 Avaliação da atividade das celulases totais

Para os ensaios realizados com *Ganoderma* sp. a avaliação da atividade de celulases foi feita de acordo com a metodologia FPA para pequenos volumes adaptada de XIAO *et al.* (2004) baseada em GHOSE (1987). Um círculo de papel Whatman N°1 (5 mm de diâmetro e 2,030 mg) foi colocado em um tubo eppendorf de 1,5 ml, diferentemente de XIAO *et al.* (2004) que desenvolveram todo o ensaio em microplacas. Neste tubo foi pipetado um volume de 20 µl da amostra do extrato enzimático e 40 µl de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. A reação foi incubada durante 60 minutos a 50°C em banho-maria. Terminado este tempo adicionou-se 120 µl do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), os tubos foram colocados em banho-maria a 95°C durante 5 minutos. Passado este período, os tubos foram resfriados e uma alíquota de 36 µl de cada amostra foi transferida para um poço de uma microplaca de 96 poços e 160 µl de água destilada foi adicionada. A leitura da absorbância da amostra foi realizada no leitor de microplacas FLUOstar Omega a 540 nm. Para o branco de amostra, em um tubo de ensaio foi colocado 20 µl da amostra e 40 µl do tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, porém sem adição do substrato. Para o preparo do branco total, o volume da amostra foi substituída pelo tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. O valor obtido na leitura da absorbância do branco de amostra foi subtraído de cada um dos valores da absorbância obtidos.

A avaliação da atividade das celulases totais foi feita de acordo com a metodologia adaptada de GHOSE (1987) para os ensaios realizados com *Aspergillus niger*. Uma tira de papel Whatman N°1 (1,0X6,0 cm) foi colocada em um

tubo de ensaio. Foi pipetado um volume de 0,5 ml da amostra centrifugada e 1 ml de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. A reação foi incubada durante 60 minutos à 50°C (SILVA, 2008). Posteriormente os tubos foram colocados em banho-maria à 100°C durante 5 minutos. Terminado este tempo 3 ml do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) e 20 ml de água destilada foram adicionados aos tubos. Para auxiliar na homogeneização da amostra os tubos foram tampados e vertidos três vezes, até que todo o líquido se misturasse dentro do tubo, a utilização do vórtex para esta finalidade mostrou-se inadequada, pois pode ocorrer dano ao papel filtro presente no ensaio, prejudicando a leitura por espectrofotometria. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro Bel UV-M551 UV-VISÍVEL a 540 nm. Para o preparo do branco total, a amostra foi substituída pelo tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Para o branco de amostra, em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL do tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,5 ml da amostra, sem o substrato.

XIAOXIAO *et al.* (2015) compararam as duas metodologias e afirmam que, com isso, obtiveram nível de confiança de 95% entre elas.

Os valores obtidos na subtração do branco da amostra foram comparados com uma curva padrão de glicose para obtenção dos resultados de cada metodologia (SILVA, 2008). Para converter a leitura da absorbância em atividade enzimática, foi utilizada a equação 2.

$$\text{FPU} = \text{mg de glicose liberada} \times 0,185 \text{ unidades/ml} \quad (2)$$

Onde: FPU é unidades de papel de filtro.

#### 4.1.3.3.2 Avaliação da atividade das pectinases

A avaliação da atividade das pectinases foi determinada pela atividade da poligalacturonase (PG) utilizando a metodologia de Li *et al.* (2015), baseada na metodologia de MILLER (1959), sendo adaptada neste estudo para pequenos volumes.

Como substrato foi utilizada a solução de ácido poligacturônico em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 na concentração de 5g/L. Esta solução precisou ser agitada e aquecida para sua completa dissolução.

Para o ensaio, 50 µl do extrato enzimático e 450 µl da solução de substrato em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 foram adicionados em tubos de ensaio, incubados por 30 minutos a 50°C, para que ocorresse a reação enzimática. Para interromper esta reação, após este período, foi adicionado 1,5 ml de do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) ao ensaio, incubou-se as amostras a 95°C por 10 minutos. Os tubos foram então resfriados, e uma alíquota de 200 µl de cada experimento foi transferida para microplaca. Para o branco da amostra foi composto por os 450 µl da solução de substrato. Para o zero total, foram adicionados 50 µl do tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 e 450 µl da solução de substrato. A leitura da absorbância da amostra foi realizada no leitor de microplacas FLUOstar Omega a 540 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão de ácido galacturônico (SANTI, 2005). Para converter a leitura da absorbância em atividade enzimática, foi utilizada a equação 3.

$$\text{Atividade (U/ml)} = \mu\text{g de ácido galacturônico liberado}/(0,05 \times 194,1 \times t) \quad (3)$$

Onde: 0,05 é o volume em mililitros da amostra enzimática utilizada no ensaio; 194,1 o peso molecular do ácido D - galacturônico e t o tempo da reação em minutos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Na etapa de isolamento dos fungos filamentosos, foi possível a obtenção de 7 culturas axênicas. O aspecto macromorfológico do fungo foi descrito apenas para os microrganismos em que a identificação por microscopia não foi possível. O quadro 5 mostra o código de identificação do microrganismo isolado, a sua nomenclatura, seu aspecto macromorfológico e a sua origem.

Código	Microrganismo	Aspecto macromorfológico das colônias (micélio)	Origem
LB002	<i>Rhizopus</i> sp.	-	Framboesa
LB003	*	Tamanho: variável Bordas: projeções regulares Textura: aveludada Relevo: rugosa Pigmento: branca na superfície e reverso	Pimentão
LB004	*	Tamanho: ocupa toda a placa Bordas: projeções regulares Textura: algodonosa Relevo: rugosa Pigmento: branco e bege na superfície e reverso	Uva
LB008	<i>Ganoderma</i> sp.	-	Laranjeira
LB009	*	Tamanho: ocupa toda a placa Bordas: projeções irregulares Textura: aveludada Relevo: rugosa Pigmento: cinza na superfície; preto e cinza no reverso	Uva
LB010	<i>Trichoderma</i> sp.	-	Isolado pertencente ao Banco de Cepas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR
LB014	<i>Aspergillus niger</i>	-	Isolado pertencente ao Banco de Cepas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR

Quadro 5 - Culturas axênicas obtidas na etapa de isolamento dos fungos filamentosos.

\*microrganismos não identificados por microscopia óptica.

## 5.2 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS DE INTERESSE

Para a seleção dos fungos produtores de celulases e pectinases, todos os microrganismos isolados foram testados nos dois meios sólidos, sendo selecionado o fungo que apresentou o maior índice enzimático (IE). Os índices enzimáticos obtidos neste ensaio encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4 - Índice enzimático obtido no meio sólido para celulase e no meio sólido para pectinases medido após 7 dias de incubação a 28°C, utilizando Lugol de Gram como solução reveladora.**

Microrganismo	Índice Enzimático	
	Celulases	Pectinases
<i>Rhizopus</i> sp.	1,1 ± 0,071	1,0 ± 0,000
LB003	2,8 ± 0,354	1,7 ± 0,283
LB004	1,1 ± 0,071	0,5 ± 0,071
<i>Ganoderma</i> sp.	4,5 ± 0,566	2,4 ± 0,141
LB009	1,2 ± 0,212	4,1 ± 0,778
<i>Trichoderma</i> sp.	2,3 ± 1,626	1,3 ± 0,354
LB012	1,6 ± 0,849	2,5 ± 0,495

Para a produção de celulases foi selecionado o fungo *Ganoderma* sp. que apresentou índice enzimático de 4,5 e para produção de pectinases foi selecionado o fungo LB009 que apresentou índice enzimático 4,1. Quando avaliado o desvio padrão de *Trichoderma* sp. e *Ganoderma* sp., os dois fungos apresentaram o mesmo valor para o IE. Contudo de acordo com BASSO *et al.* (2010) o fungo

*Trichoderma* sp. já é reconhecido pela sua significativa produção de enzimas hidrolíticas, não sendo então selecionado para este estudo, já que acabaria funcionando como um microrganismo de referência e para este fim já foi selecionado o fungo *Aspergillus niger*.

De acordo com ZANETI (2012) o microrganismo *Aspergillus niger* é um importante produtor de enzimas hidrolíticas, como as avaliadas no presente estudo. Por este motivo ele foi automaticamente selecionado para produção tanto de celulasas quanto de pectinases.

Um novo ensaio com os meios sólidos foi realizado com o fungo *Ganoderma* sp., com o fungo LB009 e com *Aspergillus niger*. Neste ensaio, as placas foram incubadas 28°C por 4 dias. O fungo *Aspergillus niger* foi testado nos dois meios sólidos, tanto para celulasas quanto para pectinases, *Ganoderma* sp. apenas no meio sólido para produção de celulasas e LB009 apenas para o meio sólido de pectinases. Os halos de degradação foram revelados utilizando solução de Lugol de Gram e solução de Vermelho do Congo 1%, os IE estão representados na tabela 5.

**Tabela 5 - Índice enzimático obtido no meio sólido para celulase e no meio sólido para pectinases medido após 4 dias de incubação a 28°C, utilizando Lugol de Gram e Vermelho do Congo 1% como solução reveladora.**

Microrganismo	Meio	Índice Enzimático	
		Lugol de Gram	Vermelho do Congo 1%
<i>Ganoderma</i> sp.	Celulasas	2,1 ± 0,071	1,7 ± 0,283
<i>Aspergillus niger</i>	Celulasas	2,7 ± 0,141	2,4 ± 0,636
LB009	Pectinases	1,7 ± 0,141	1,6 ± 0,495
<i>Aspergillus niger</i>	Pectinases	2,0 ± 0,212	1,9 ± 0,283

Os três microrganismos testados apresentaram crescimento nos meios de cultivo sólidos para celulasas e pectinases. O fungo *Aspergillus niger* apresentou um



maior índice enzimático para produção de celulases do que *Ganoderma* sp. quando utilizada a solução de Lugol de Gram, porém o valor do desvio padrão das análises realizadas com a solução de vermelho do congo 1% prejudicou a comparação do índice enzimático entre os dois microrganismos. Assim como ocorreu com a produção de enzimas pectinolíticas por LB009 e *Aspergillus niger*, porém, neste ensaio os valores de desvio padrão das duas soluções reveladoras impediram a comparação entre as produções enzimáticas destes dois fungos. Pode-se notar que o desvio padrão é maior nas placas em que se utilizou o Vermelho do Congo 1% do que nas placas em que foi utilizada a solução de Lugol de Gram. KASANA *et al.* (2008) evidenciaram dificuldade de visualização do halo de degradação na placa utilizando o Vermelho do Congo 1%, diferentemente do observado na placa utilizando a solução de Lugol de Gram. Ainda segundo estes autores a utilização de Lugol na revelação do halo de degradação enzimático é uma opção mais fácil, rápida, eficiente e menos tóxica quando comparada com a solução de vermelho do congo.

A utilização do Lugol de Gram como solução reveladora, deixou o halo de degradação mais evidente do que a solução de Vermelho do Congo 1% (Figura 7). Alguns meios de cultura sólidos possuem uma coloração escura, por isso é interessante testar as duas soluções reveladoras e observar qual é mais adequada para determinado meio.

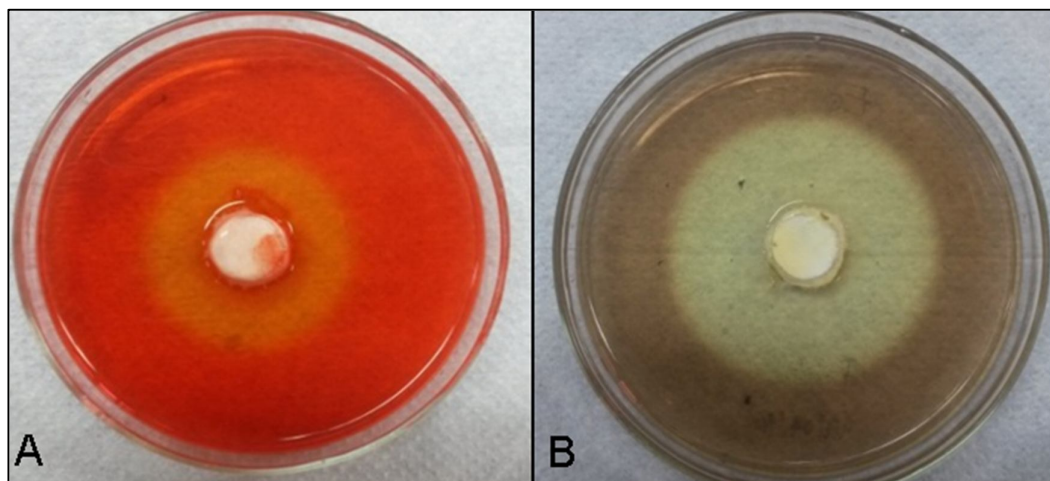
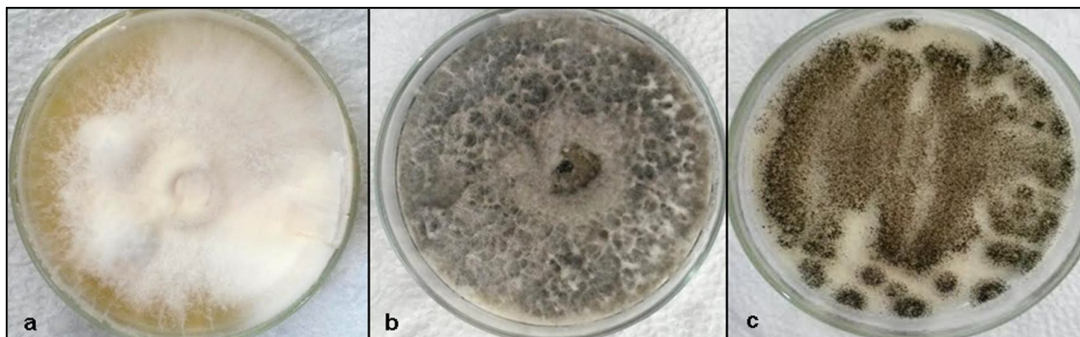


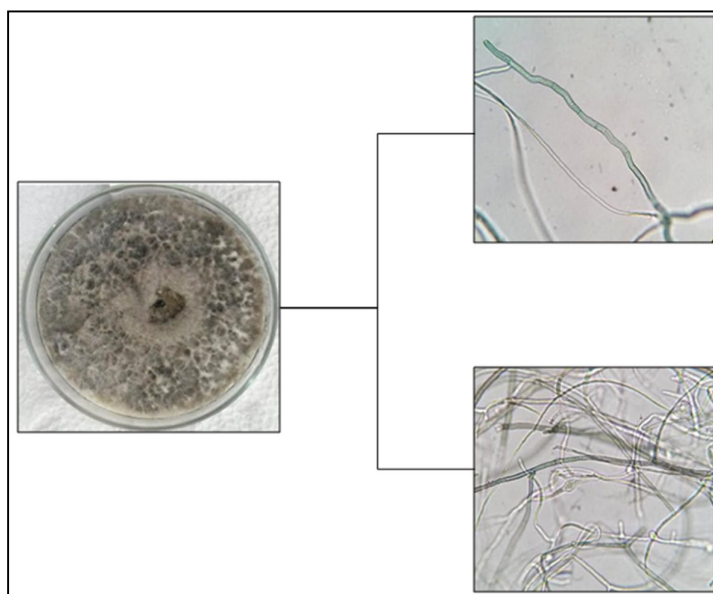
Figura 7 - Halos de degradação com Vermelho do Congo 1% (A) e Lugol de Gram (B) em cultivo de *Ganoderma* sp. em meio sólido para celulases, após 4 dias a 28°C.

A figura 8 mostra os fungos *Ganoderma* sp., LB009 e *Aspergillus niger*, selecionados para produção enzimática.



**Figura 8 - Microrganismos selecionados para produção enzimática. a. *Ganoderma* sp.; b. LB009; c. *Aspergillus niger*.**

O fungo LB009 apresentou-se como um bom produtor de pectinases em meio sólido. Para sua identificação por microscopia foi utilizado o corante utilizando o corante azul de lactofenol-algodão. Foi possível constatar hifas septadas e a presença de clamidósporos, de acordo com a figura 9.



**Figura 9 - Fungo LB009 observado em microscópio óptico com aumento de 400X.**

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CELULASES TOTAIS

Para a avaliação da atividade das celulases totais presentes nos extratos enzimáticos através da metodologia adaptada de XIAO (2004) para pequenos volumes, foi elaborada a curva analítica a partir dos padrões de glicose, composta por cinco concentrações (0,05 mg/20 µl, 0,1 mg/20 µl, 0,15 mg/20 µl, 0,2 mg/20 µl e 0,25 mg/20 µl). Para a avaliação destas enzimas através da metodologia de GHOSE (1987), a curva analítica também foi elaborada com cinco concentrações (0,83 mg/0,5 ml, 1,0 mg/0,5 ml, 1,65 mg/0,5 ml, 2,5 mg/0,5 ml e 3,35 mg/0,5 ml). As equações da reta obtidas nas curvas analíticas foram utilizadas para determinar as concentrações de glicose presentes em cada extrato enzimático. As curvas analíticas de glicose e as equações da reta encontram-se na figura 10.

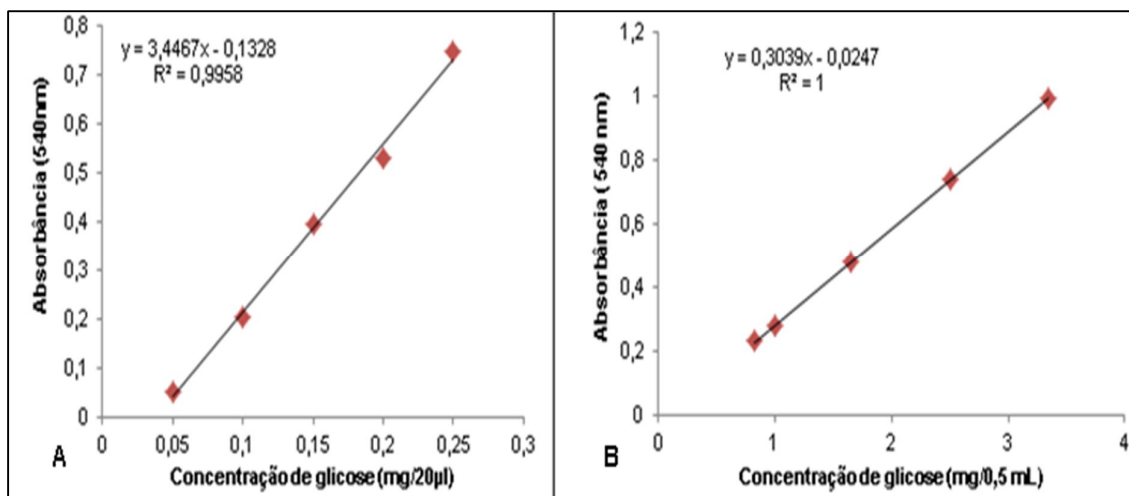


Figura 10 - Curvas analíticas de glicose para a metodologia em microplacas (A) e para metodologia em tubos de ensaio (B).

Os resultados obtidos na produção de celulases utilizando como inóculo os pellets e “plugs” do fungo *Ganoderma* sp., através da metodologia de XIAO (2004), são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Produção de celulasas por *Ganoderma* sp.

Meios de cultivo	Forma do inóculo	Atividade Enzimática (FPU.L <sup>-1</sup> )
Controle	Pellets	8,36
Controle	“Plug”	8,09
Aparas de papel contendo tinta	Pellets	11,69
Aparas de papel contendo tinta	“Plug”	8,63
CMC + aparas de papel contendo tinta	Pellets	9,33
CMC + aparas de papel contendo tinta	“Plug”	7,93

O meio de cultivo denominado controle apresentou as menores atividades enzimáticas, com exceção da produção por *Ganoderma* sp. na forma de plug em meio de cultivo composto por CMC e aparas de papel contendo tinta.

Em seu estudo, SILVA (2008) verificou doze composições de meio de cultivo, variando as fontes de carbono e nitrogênio e relata não ter obtido boa atividade enzimática nos meios compostos apenas por CMC e peptona, apresentando 0,463 U.ml<sup>-1</sup>, sendo esta a menor atividade apresentada na sua pesquisa, o que corrobora com os resultados obtidos por *Ganoderma* sp. neste estudo.

Os resultados demonstram que as aparas de papel contendo tinta induzem a produção de celulasas, sendo a única fonte de carbono presente no meio de cultivo, representando o meio com maior atividade, 11,69 FPU.L<sup>-1</sup>. As aparas de papel contendo tinta juntamente com CMC apenas não estimularam a produção enzimática por *Ganoderma* sp. na forma de plug, quando comparada aos outros meios, porém estimularam a produção quando o fungo foi inoculado na forma de pellets.

SILVA (2008) ainda relata que a presença de sais como o sulfato de zinco, sulfato de ferro e cloreto de sódio, tem efeito positivo na produção de celulasas totais. Portanto, a baixa concentração enzimática encontrada nestes meios pode estar relacionada com a ausência de sais minerais na sua composição e de uma fonte de carbono de fácil acesso como a glicose, por exemplo.

Os resultados demonstram que a produção enzimática é mais favorecida pelo inóculo na forma de pellets do que na forma de “plugs”. De acordo com HELM *et al.* (2009) o inóculo na forma de pellets facilita a adaptação do microrganismo para produção enzimática, o que pode ser observado no presente estudo.

Na tabela 7 é possível observar os resultados quanto a produção de celulases por *Aspergillus niger*.

**Tabela 7 - Produção de celulases por *Aspergillus niger*.**

Meios de cultivo	Atividade Enzimática (FPU.L <sup>-1</sup> )
Controle + glicose	46,93
CMC + Aparas de papel contendo tinta + glicose	45,47
Aparas de papel contendo tinta + glicose	47,97
Avicel	25,54
Celulose microcristalina+ peptona	18,96
Aparas de papel contendo tinta + solução salina	32,14
Aparas de papel + peptona	59,63
CMC	26,45
CMC + Peptona	44, 32

**Forma do inóculo: suspensão de esporos (1x10<sup>6</sup> esporos.ml<sup>-1</sup> no meio de cultivo).**

O meio de cultivo que mais favoreceu a produção de celulases foi o composto por aparas de papel e peptona (59,63 FPU.L<sup>-1</sup>). O meio contendo celulose microcristalina e peptona apresentou a menor produção enzimática (18,96 FPU.L<sup>-1</sup>). E a segunda maior atividade enzimática foi a do meio composto por aparas de papel contendo tinta e glicose (47,97 FPU.L<sup>-1</sup>), mesmo sem a presença de sais mineirais. RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO (2004) afirmam que a atividade das celulases variam em relação ao tipo de substrato presente no meio de cultivo, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

SALES *et al.* (2010) pesquisaram oito variáveis que poderiam influenciar na produção de celulase por duas linhagens de *Aspergillus* spp., são elas: pH, concentração de substrato, concentração do inóculo, linhagem, substrato, tempo de cultivo, agitação e temperatura. A maior atividade enzimática obtida foi  $0,45 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  com *A. aculeatus*, em pH 6, com tempo de cultivo de sete dias na concentração de 0,5% p/v de bagaço de cana residual, temperatura de 30 graus e agitação de 180 rpm. Ainda de acordo com SALES *et al.* (2010), todas as variáveis analisadas foram significativas, exceto a concentração do substrato. Já HANIF *et al.*(2004) afirmam que é necessário que exista uma concentração limite de carbono, nitrogênio e fósforo para produção de celulases.

No presente estudo os resultados demonstram que as variações quanto a atividade das celulases está diretamente ligada a composição do meio de cultivo líquido. Uma fonte de nitrogênio, como a peptona, juntamente com a presença de sais minerais estimulou a produção de celulases. Contudo, este favorecimento varia de acordo com a fonte carbono disponível no meio. Sendo que a presença de aparas de papel contendo tinta promoveu um aumento na produção de enzimas celulolíticas, apresentando-se como uma fonte alternativa de baixo custo para produção destas enzimas.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS PECTINASES

A avaliação da atividade de enzimas pectinolíticas foi realizada com base na metodologia de Li *et al.* (2015), que avalia a presença de ácido D-galacturônico no extrato enzimático, revelando assim a atividade de poligalacturanase. Para o preparo da solução de ácido D-galacturônico em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8, a solução foi agitada e aquecida até sua completa dissolução. A curva analítica foi elaborada com seis concentrações de ácido D-galacturônico (0,025 g/0,5 ml, 0,05 g/0,5 ml, 0,1g /0,5 ml, 0,2 g/0,5 ml, 0,5 g/0,5 ml e 0,8 g/0,5 ml). A equação obtida pelo ajuste linear dos dados experimentais foi utilizada para a determinação das concentrações de ácido D-galacturônico presentes em cada extrato enzimático. A

curva analítica de ácido D-galacturônico, a equação da reta e o valor de  $R^2$ , podem ser observados na figura 11.

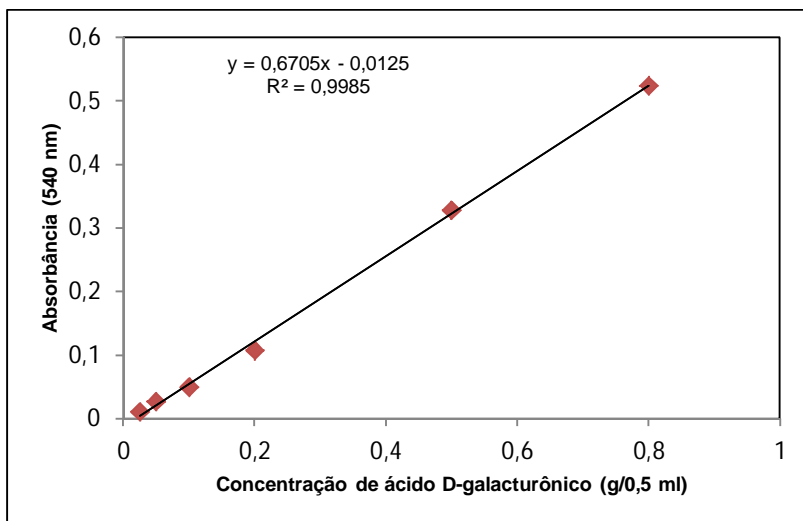


Figura 11 - Curva analítica de ácido D-galacturônico.

Os resultados quanto a produção de pectinases utilizando como inóculo as suspensões de esporos de LB009 e *Aspergillus niger*, encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Produção de pectinases a partir da suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e LB009.

Meios de cultivo	Microrganismo	Forma do inóculo	Atividade Enzimática (U.L <sup>-1</sup> )
Controle	LB009	Suspensão de esporos (1x10 <sup>6</sup> )	3501,25
Controle	<i>Aspergillus niger</i>	Suspensão de esporos (1x10 <sup>7</sup> )	171,60
Bagaço de uva Bordô	LB009	Suspensão de esporos (1x10 <sup>6</sup> )	2420,40
Bagaço de uva Bordô	<i>Aspergillus niger</i>	Suspensão de esporos (1x10 <sup>7</sup> )	ND*
Bagaço de uva Bordô + pectina	LB009	Suspensão de esporos (1x10 <sup>6</sup> )	5268,52
Bagaço de uva Bordô + pectina	<i>Aspergillus niger</i>	Suspensão de esporos (1x10 <sup>7</sup> )	2840,44

\* ND: não detectado.

RIBEIRO *et al.* (2015) avaliaram o perfil bioativo do bagaço da uva Bordô, identificando a presença de carboidratos e proteínas em sua estrutura. Portanto, o bagaço de uva Bordô representa uma fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultivo para o desenvolvimento dos fungos, favorecendo assim a produção enzimática por estes microrganismos.

Os resultados mostram que houve produção enzimática por LB009 em todos os meios de cultivo, sendo sua maior produção, 5268,52 U.L<sup>-1</sup>, no meio de cultivo composto por bagaço de uva Bordô e pectina, o que indica que a presença do bagaço de uva juntamente com a pectina no meio de cultivo estimulou a produção pectinolítica. Vale ressaltar que apesar do meio de cultivo com menor atividade enzimática ter sido o composto apenas por bagaço de uva, ainda assim, obteve-se uma boa atividade enzimática com este microrganismo, 2420,40 U.L<sup>-1</sup>. Também é interessante destacar que o microrganismo LB009 foi isolado da uva, o que já evidencia a sua capacidade de desenvolvimento através desta fonte nutrientes. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por OSKAY e YALÇIN (2015), que analisaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de pectinases em meio líquido, dentre as fontes testadas estavam a pectina cítrica e o bagaço de uva. Para ambos os substratos, a maior atividade enzimática ocorreu em 48 horas, sendo 1800 U.L<sup>-1</sup> com bagaço de uva e 4200 U.L<sup>-1</sup> com a pectina cítrica.

De acordo com ROCHA (2010), o aumento na concentração do inóculo favorece a produção enzimática. Desta forma, torna-se difícil a comparação entre a produção enzimática de LB009 e *Aspergillus niger*, já que os dois microrganismos foram inoculados nos meios de cultivo com concentrações diferentes, 1x10<sup>6</sup> esporos.ml<sup>-1</sup> e 1x10<sup>7</sup> esporos.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Contudo, é possível observar que os meios de cultivo que mais favoreceram a produção de pectinases por LB009, foram os mesmos que favoreceram a produção por *Aspergillus niger*. Mesmo o fungo *Aspergillus niger* tendo sido inoculado ao experimento numa concentração maior do que LB009, não foi possível detectar a presença de enzimas pectinolíticas nos meios de cultivo composto por bagaço de uva como substrato, o que no presente estudo difere do afirmado por ROCHA (2010). No meio cultivo denominado controle, *Aspergillus niger* apresentou sua segunda menor atividade 171,60 U.L<sup>-1</sup>. Já no meio de cultivo composto por bagaço de uva e pectina, a sua atividade foi de



2.840,44 U.L<sup>-1</sup>, revelando que assim como para LB009, a presença de pectina em conjunto com o bagaço de uva estimulam a produção de pectinases.

MARTOS *et. al* (2009), avaliou a interferência do pH, do tempo de fermentação e concentração de pectina no meio de cultivo, utilizando *Aspergillus niger* na concentração de  $1,25 \times 10^7$  esporos.ml<sup>-1</sup> para produção de pectinase. A maior atividade de poligalacturanase, 1.032 U/L, foi detectada após 94 horas de incubação, em pH 4, com meio de produção composto por 20 g/L de pectina. E a menor produção desta enzima ocorreu em pH 6,5.

KUMAR *et al.* (2011), também avaliaram a interferência do tempo de cultivo, do pH e da concentração das fontes de carbono na produção das pectinases. Como fonte de carbono utilizaram farelo de trigo, farelo de milho e casca de tangerina, em proporção fixa de 2:1:2. Os resultados mostraram que a melhor produção de pectinases por *Aspergillus niger*, foi de 1.640 U/L em 5 dias de cultivo submerso, pH 4,6 e 65 g/L de fonte de carbono.

No entanto, no presente estudo, *Aspergillus niger*, apresentou boa produção enzimática no meio composto por bagaço de uva Bordô e pectina, mesmo em pH inicial 6,0.

CAMARGO *et al.* (2005), elaborou três meios de cultivo, variando na composição a presença de meios de cultivo contendo solução salina, variando as concentrações e as fontes de carbono entre glicose, pectina cítrica e bagaço de laranja, ajustando o pH para 5,5, utilizando como inoculo *Aspergillus* sp. na concentração de  $1 \times 10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup>. Após dois dias de cultivo a maior atividade foi 3.600 U.L<sup>-1</sup>, utilizando o bagaço de laranja, 4 %pv,. E na presença de pectina cítrica a maior atividade, neste mesmo período e concentração, foi de 2370 U.L<sup>-1</sup>.

Os resultados do presente estudo revelaram que o bagaço de uva Bordô representa uma alternativa de baixo custo para a produção de enzimas pectinolíticas, atuando como um estimulante na sua produção. Além disto, do ponto de vista ambiental, esta é uma alternativa de destinação mais nobre para este resíduo.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível a obtenção de culturas axênicas a partir de diferentes amostras, e destas culturas selecionar os melhores produtores de celulases e pectinases dentre os fungos isolados. Ainda foi possível concluir que a formação do halo de degradação está intimamente relacionada com a composição do meio de cultura.

O fungo *Ganoderma* sp. apresentou a maior atividade enzimática na forma de pellets do que na forma de “plug”. Entretanto, o meio de cultivo líquido utilizado para produção de celulases mostrou-se pobre em nutrientes, como sais minerais, por exemplo, o que afetou diretamente a produção enzimática por este basidiomiceto. Quanto à produção de celulases por *Aspergillus niger*, ficou evidente que a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio é uma fator determinante na produção destas enzimas, podendo favorecer ou não a sua produção pelo microrganismo. Ainda assim, as aparas de papel apresentaram-se como um substrato estimulante para produção de enzimas celulolíticas, tanto por *Ganoderma* sp. quanto por *Aspergillus niger*.

O bagaço de uva Bordô revelou possuir uma boa capacidade para estimular a produção de pectinases, principalmente em conjunto com pectina cítrica no meio, estimulando inclusive a produção por *Aspergillus niger*, mesmo com a presença deste microrganismo em baixa concentração no meio de cultivo. O fungo LB009, demonstrou ser um bom produtor de pectinases em todos os meios testados, mesmo no meio composto apenas por bagaço de uva Bordô.

A utilização desses dois resíduos como substratos na produção de enzimas hidrolíticas mostrou-se eficiente, representando uma alternativa interessante para a destinação das aparas de papel contendo tinta e do bagaço de uva.

## 7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Otimizar os meios de cultivo para celulasas e pectinases alterando as suas composições, concentrações de nutrientes e inóculo, a agitação e pH, com a finalidade de avaliar a influência destes parâmetros na produção de celulasas e pectinases.

Estudar o complexo enzimático de celulasas e pectinases, para avaliar como cada uma de suas enzimas é influenciada pela alteração dos parâmetros supra citados.

Realizar a cinética enzimática de celulasas e pectinases para verificar o dia de maior produção enzimática.

Efetuar a cinética de crescimento de biomassa fúngica e relacionar os picos de produção enzimática.

Realizar análise estatística de todas as etapas experimentais, com o propósito de avaliar os aspectos significativos e não significativos que influenciem na produção enzimática.

## REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo VII. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf). Acesso em: 10 mai. 2016.

BASSO, Thalita Peixoto; GALLO, Cláudio Rosa; BASSO, Luiz Carlos. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.11, pp.1282-1289, nov. 2010.

BRACELPA – Associação brasileira de celulose e papel. Dados do setor: março – 2014. Disponível em: <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2016.

CAMARGO, Luciana Amade; DENTILLO, Daniel Blassioli; CARDELO Leonardo. GATTÁS. Edwil Aparecida de Lucca. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus* sp. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, pp. 153-156, jun. 2005.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, pp.181-184, 1967.

CASTRO, Aline M. de.; JÚNIOR, Nei P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n.1, pp. 181-188, 2010.

COELHO, Miguel T. **Pectina: características e aplicações em alimentos**. 2008. 32f. Seminário (Disciplina de Seminários em Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Curso de Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

COSTA, G.; SANTOS, A.; LEE, M.; SOUZA, M. Química: e Sociedade: Motores da Sustentabilidade. In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2014, Rio Grande do Norte. **Seleção de fungos filamentosos com atividade pectinolítica de isolados de sementes de andiroba (*Carapa guianensis*) e mandioca (*Manihot succulenta*)**. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/11/5025-17838.html>. Acesso em: 10 jun. 2015.

DÍAZ, A. B.; ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamorii* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, pp. 72-78, dez. 2012.

ESPELETA, Alexandre de F. ***Aspergillus terreus* isolamento, identificação e avaliação da capacidade catalítica na redução de cetonas pró-quirais**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana (2014).

FELLOWS, Peter J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERNANDES, Ana P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2009.

FILHO, Renato E. M. **Micologia Forense: a dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período post mortem**. 2008.132f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, pp.257-268, 1987.

GUIMARÃES, Luis H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, Simone C.; MICHELIN, Michele; RIZZATTI, Ana C. S.; SANDRIM, Valéria C.; ZANOELO, Fabiana F.; AQUINO, Ana C. M.M.; JUNIOR, Altino B.; POLIZELI, Maria de L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n.4, pp.474-480, jan. 2006.

HANIF, Atif; YASMEEN, Amber; RAJOKI, M.I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.94, pp. 311-319, fev. 2004.

HELM, Cristiane V.; LIMA, Edson A. de; BOZA, Adriana P. O.; PINTO, Fernanda S.; TERZI, Selma da C.; COURI, Sônia. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE FLORESTAS ENERGÉTICAS, 2009, Belo Horizonte. **Avaliação de basidiomicetos do gênero ganoderma quanto ao potencial de síntese de enzimas lignocelulolíticas**. Disponível em: <

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/304338/1/helm.PDF>. Acesso em : 21 jun. 2016.

JAYANI, Ranveer S.; SAXENA, Shivalika; GUPTA, Reena. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.40, pp.2931-2944, mar. 2005.

JURUTU, Veeresh.; WU, Jin C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, pp. 188-2031, fev. 2014.

KASANA, Ramesh C.; SALWAN, Richa; DHAR, Hena; DUTT, Som; GULATI, Arvind. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v 57, pp 503-507, set. 2008.

KHANDELWAL, Ashish; CHAUHAN, Sunita; PARIHAR, Shivali; DIXIT, Pranav; KUMAR, Sharma R. Effect of Enzyme Treatment on Recycling of Shredded Currency Waste of RBI for Making Handmade Paper. **Current World Environment**, v. 6, pp 77-85, jan. 2011.

KUMAR, Sanjay; SHARMA, H. K; SARKAR, B. C. Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, pp.: 1289-1298, out. 2011.

LI, Quian.; COFFMAN, Anthony M.; JU, Lu-kwang. Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, pp. 42-48, fev. 2015.

MACIEL, Giselle M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 133f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

MARTOS, María A.; VAZQUEZ, Francisco M.; BENASSI, Fernando O.; HOURS, Roque A. Production of pectinases by *A. niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, pp.567-572. Jun.2009;

MARZZOCO, Anita.; TORRES, Bayardo B. **Bioquímica básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MAYRINK, Maria I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose.** 2010. 81f Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2010.

MELLO, Loiva M. R. **Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

MELLO, Loiva M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2012.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013.

MELO, Priscilla S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais.** 2010. 100f. Dissertação (Mestrado) – Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, pp. 426–428, 1959.

NUNES, Hayssa C. A.; CHICATTO, Juliana A.; GRANZER, Elis.; HELM, Cristiane V.; TAVARES, Lorena B. B. Obtenção de celulases por fungos cultivados em sistema submerso com resíduo de pupunha. **Revista de Estudos Ambientais**, v.17, n. 1, pp. 16-26, jan./jun.2015.

OLIVEIRA, Arlem N.; OLIVEIRA, Luiz Antonio de.; ANDRADE, Jerusa Souza.; JÚNIOR, Aloisio Freitas Chagas. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 4, pp. 853-860, dez. 2006.

OSKAY, Mustafa; YALÇIN, Hüsniye T. Screening of Yeast Strains for Pectinolytic Activity: Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources in Submerged Fermentation. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 3, pp. 89-96, jun. 2015.

PEREIRA, Eduardo P.; GAMEIRO, Augusto H. Sistema agroindustrial da uva no Brasil: arranjos, governanças e transações. In: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Acre. **Estrutura, evolução e dinâmica dos sistemas agroalimentares e cadeias agroindustriais.** Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/590.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

PEREIRA, Vanessa M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer.** 2012. 111f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

RAMOS, Eduardo H. da S. **Avaliação da produção de celulases por fungos filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato.** 2012. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

RIBEIRO, F.; RIBANI, R. H.; FRANCISCO, T. M. G; SOARES, A. A.; PONTAROLO, R.; HAMINIUK, C.W.I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 1007, p. 72–80, dez. 2015.

ROCHA, Christiane P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

RUEGGER, Marcelo J. S; TAU-K-TORNISIELO, Sâmia M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, pp. 205-211, abri-jun. 2004.

SALES, Marília R.; MOURA, Rosemary B. de; PORTO, Tatiana S.; MACEDO, Gorete R. de; PORTO, Ana L. F.. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, pp. 1.290-1.296, nov. 2010.

SANDRI, Ivana G. **Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos.** 2010. 114f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2010.

SÁNCHEZ, Sheila R.; SÁNCHEZ, Irene G.; ARÉVALO-VILLENA, María.; PÉREZ, Ana B. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, pp. 587–593, out. 2014.

SANTOS, Daniele Bueno dos. **Propriedades ópticas de suspensões coloidais e filmes à base de nanocelulose.** 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2012.



SANTOS, G. P.; ALVES, D. F.; PAIVA, L. S.; NUNES, R.V. A cadeira do papel/papelão comum e o reciclado: uma análise comparativa na indústria de embalagens. In: XXX ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2010, São Paulo. **Maturidade e desafios da engenharia de produção: competitividade das empresas, condições de trabalho, meio ambiente.** Disponível em: <[http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2010\\_TN\\_STO\\_120\\_783\\_15980.pdf](http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2010_TN_STO_120_783_15980.pdf)>. Acesso em: 11 jun. 2015.

SANTI, Lucélia. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** 2005. 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

SILVA, Lucas D. e. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*.** 2008. 117f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

SMITH, Laurie G. Plant cell division: Building walls in the right places. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, pp.33-39, jan. 2001.

SOUSA, Helena M. P. D. de. **Aplicação de celulases e xilanases na reciclagem de fibras de papel.** 2002. 370f. Tese (Doutorado) – Área de Concentração Engenharia Enzimática e das Fermentações, Universidade do Minho. Braga, 2002.

STAFUSSA, Ana P. **Antocianinas do bagaço de uva: extração e bioadsorção em *Saccharomyces cerevisiae*.** 2014. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Cristine L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UENOJO, Mariana.; PASTORE, Glaucia Maria. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, pp. 388-394, abr. 2007.

UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura. Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados: 2003 - 2014, 2014. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/pdf/safra\\_uva2003-2014.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva2003-2014.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2016.

VALADARES, Fernanda de L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2013.

VALENCIA, Estela Y.; CHAMBERGO, Felipe S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v 60. Pp. 9-18, jul. 2013.

VOET, Donald.; VOET, Judith. G.; PRATT, Charlotte. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2 ed. Porto alegre: Artemed, 2008.

WANG, Wenjun.; XIAOBIN, Ma.; YUTING, Xu.; CAO, Yongqiang.; JIANG, Zhumao.; DING, Tian.; YE, Xingqian.; LIU, Donghong. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method. **Food Chemistry**, v. 178, pp. 106-114, jan. 2015.

XIAO, Zhizhuang; STORMS Reginald; TSANG, Adrian. Microplate- Based filter paper assay to measure cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, 2004. v. 88, pp. 832-837. Jul. 2004.

XIAOXIAO, Yu; LIU, Yan; CUI, Yuxiao; CHENG, Qiyue; ZHANG, Zaixiao; LU, Jia H.; MENG, Qingfan; TENG, Lirong; REN, Xiaodong. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, pp. 93-98. Jan. 2015.

ZANETI, Vinícius Moura. **Produção de xilanases por *Aspergillus niger* utilizando planejamento experimental: purificação de xilanase**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2012.

ZHANG, YH Percival; HONG, Jiong; YE, Xinhao. Cellulase assays. **Biofuels: methods and protocols**, v. 581, pp. 213-231, ago. 2009.