

Priscila da Silva Delabona

Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade de Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadores: Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Prof. Tit. Igor Polikarpov**

São Carlos

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D331bf

Delabona, Priscila da Silva.

Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico / Priscila da Silva Delabona. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 121 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Bioma amazônico. 3. Celulase. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Fungos. I. Título.


CDD: 660.6 (20^a)

Priscila da Silva Delabona

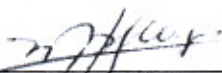
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 14/03/2011.

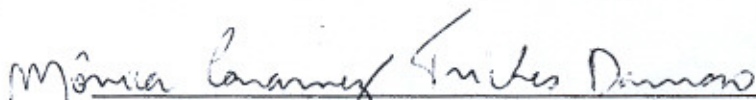
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Orientadora)
(EMBRAPA)



Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
(DEB/UFSCar)



Dra. Monica Caraméz Triches Damaso
(EMBRAPA Agroenergia Brasília)

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo Delabona e Osmarina Delabona, meus irmãos e minha avó pelo grande apoio e incentivo aos estudos que sempre me concederam. O amor que recebo de vocês é a fonte das minhas energias.

“O pessimista queixa-se do vento,
o otimista espera que ele mude
e o realista ajusta as velas”

Willian George Ward

Agradecimentos

A Deus pelos momentos que me envolve com sua presença e espírito, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar o meu caráter.

Aos meus pais Paulo e Osmarina, por sempre estarem ao meu lado, por não me deixarem desanimar durante a caminhada e pela paciência e compreensão por minha ausência nos momentos importantes.

A todos os meus familiares, em especial meus irmãos, Gustavo e Alessandro e minha avó Onilda por toda força, compreensão, amor e curiosidade pelo meu trabalho.

Ao meu namorado Daniel pela constante presença e valiosas sugestões ao longo da condução desta dissertação. Obrigada por todo o seu amor.

A minha orientadora Cristiane Sanchez Farinas que, mediante sua expressiva tutoria contribuiu de forma efetiva, não somente para a conclusão do trabalho, como também para minha formação ética e profissional. Agradeço pela orientação acadêmica e técnica e pelo incentivo e motivação à pesquisa e por toda sua amizade.

À pesquisadora Dra. Célia Tremacoldi, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental pelo profissionalismo e cordialidade demonstrado durante toda minha estadia em seu laboratório.

A toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental por fazer meus dias em Belém se tornarem inesquecíveis.

A minha amiga Rosangela, por sua amizade além de toda ajuda profissional. Muito obrigada por sempre me animar e incentivar quando os experimentos falhavam.

À estagiária Carla pela imensa contribuição na realização dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação, pelos momentos de descontração e carinho.

À galera da república: Amanda, Cíntia, Mônica, Lívia e Marina pelo ótimo ambiente de convivência e pelas festas realizadas.

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação de São Carlos, em especial à Silviane e Joana.

À Embrapa Instrumentação que acolheu este trabalho de mestrado, por meio da destinação de espaço físico e apoio administrativo.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

E a todas as pessoas que se envolveram de forma direta e/ou indireta no desenvolvimento desta pesquisa.

Resumo

DELABONA, P. S. *Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para aplicação na produção de etanol celulósico*. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

A prospecção de fungos produtores de celulases é uma das possíveis estratégias para a obtenção das enzimas necessárias para hidrolisar o material lignocelulósico e com isso contribuir para a viabilização da produção de etanol celulósico. Dentre os diferentes biomas do país, o Amazônico representa uma fonte em potencial de fungos celulolíticos devido as suas condições edafoclimáticas peculiares que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e a seleção de fungos produtores do complexo de celulases presentes no Bioma Amazônico com alta eficiência por meio do processo de fermentação em estado sólido (FES) de 100 amostras de solo coletados em 50 pontos diferentes da Reserva Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém – PA. Após o isolamento dos fungos, um total de 110, eles foram transferidos para placas contendo celulose cristalina (Avicel) como única fonte de carbono para avaliação e seleção quanto a sua produção de celulase. Desses 110, foram selecionados os 10 fungos que apresentaram maior crescimento. As linhagens selecionadas foram cultivadas a 35°C, por 120 horas em FES, utilizando como substrato, para uma primeira seleção de linhagens produtoras de endoglucanases, o farelo de trigo com 60 % de umidade. Os dois fungos que obtiveram maior produção enzimática no farelo de trigo, o *Aspergillus fumigatus* P40M2 e o *Aspergillus niger* P47C3, foram avaliados em diversos outros substratos, com diferentes percentuais de umidade. Nestes outros substratos, além da avaliação quanto a produção de endoglucanases, essas linhagens também foram avaliadas quanto a produção de xilanase, FPase e β -glicosidase. Dessas duas linhagens, o *Aspergillus fumigatus* P40M2 foi o que apresentou, de maneira geral, a melhor produção dessas enzimas. Assim, por fim, as enzimas produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* P40M2 foram caracterizadas quanto ao pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica, e suas bandas de atividades identificadas por eletroforese (zimograma). O extrato obtido pelo fungo apresentou características termofílicas e acidofílicas sendo muito importantes para hidrólise da biomassa visando a produção de etanol.

Palavras-chave: Bioma Amazônico, celulases, fermentação em estado sólido e fungos.

Abstract

DELABONA, P. S. *Bioprospecting of cellulase fungi producer in the amazon region for production cellulosic ethanol*. 121 l. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology), University Federal of São Carlos, São Carlos, 2011.

Prospecting for cellulose-producing fungi is one of the possible strategies for obtaining the necessary enzymes to hydrolyze the lignocellulosic material and to contribute to the viability of cellulosic ethanol production. Among the different biomes, the Amazon represents a potential source of cellulolytic fungi due to its unique soil and climatic conditions that favor the continued degradation of the biomass of the forest undergrowth. In this context, the objective of this study was the isolation and selection of fungi producing complex cellulase present in the Amazon biome with high efficiency through the process of solid-state fermentation (SSF) of 100 soil samples collected at 50 different points of Reserve Embrapa Eastern Amazon, in Belém - PA. After isolation of fungi, a total of 110, they were transferred to plates containing crystalline cellulose (Avicel) as sole carbon source for selection. Of these 110, 10 fungi were selected that showed the highest growth. The selected strains were grown at 35 ° C for 120 hours in SSF, using as a substrate for a first selection of strains producing endoglucanases, wheat bran with 60 % humidity. The two fungi had higher enzyme production in wheat bran, *Aspergillus fumigatus* (P40M2) and *Aspergillus niger* (P47C3) were evaluated in several other substrates, with different percentage of humidity. In these other substrates, has also evaluated the production of endoglucanases, Fpase, xylanase and β -glucosidase. The fungus *Aspergillus fumigatus* P40M2 showed, in general, the best production of these enzymes. So, finally, the enzymes produced by *Aspergillus fumigatus* P40M2 were characterized optimum pH, optimum temperature and thermal stability, and their bands of activities identified by electrophoresis (zymograms). The extract obtained by the fungus is characteristic thermophilic and acidophilic being very important for hydrolysis of biomass to ethanol production.

Keywords: Amazon Biome, cellulases, solid state fermentation and fungal.

Sumário

1	Introdução	15
2	Revisão Bibliográfica.....	19
2.1	Diversidade Microbiana como Fonte de Novas Enzimas.....	19
2.2	Microrganismos Produtores de Celulases.....	22
2.3	Bioma amazônico e seu Potencial Biotecnológico como Fonte de Organismos Produtores de Enzimas	27
2.4	Biomassa Lignocelulósica	28
2.4.1	<i>Caracterização Química</i>	28
2.5	Enzimas	33
2.6	Fermentação em Estado Sólido (FES) e Submersa (FSM) na Produção de Enzimas Microbiana.....	38
2.6.1	<i>Resíduos Lignocelulósicos Utilizados em FES</i>	42
3	Materiais e Métodos	49
3.1	Isolamento	49
3.1.1	<i>Determinação da área de coleta</i>	49
3.1.2	<i>Meio de cultivo para obtenção dos isolados</i>	51
3.1.3	<i>Isolamento e seleção dos microrganismos</i>	51
3.1.4	<i>Meio para manutenção celular</i>	52
3.1.5	<i>Meio de seleção das linhagens celulolíticas</i>	52
3.1.6	<i>Identificação das linhagens</i>	53
3.2	Fermentação.....	53
3.2.1	<i>Substratos para fermentação</i>	53
3.2.2	<i>Determinação da umidade nos substratos</i>	54
3.2.3	<i>Processos fermentativos</i>	55
3.3	Determinações quantitativas.....	55
3.3.1	<i>Atividade de FPase e endoglucase (CMCase)</i>	56
3.3.2	<i>Atividade de xilanase</i>	57
3.3.3	<i>Atividade β-glicosidásica</i>	57
3.4	Caracterização dos extratos enzimáticos	58
3.4.1	<i>Avaliação do efeito do pH e temperatura ótima</i>	58
3.4.2	<i>Avaliação da estabilidade térmica</i>	58
3.4.3	<i>Zimograma</i>	58
4	Resultado e Discussão.....	61
4.1	Isolamento, seleção e identificação	61
4.2	Avaliação da produção de celulases pelas linhagens selecionadas em FES utilizando farelo de trigo como substrato	62
4.3	Produção de endoglucanases em diferentes resíduos agrícolas.....	64
4.3.1	<i>Farelo de trigo</i>	64
4.3.2	<i>Farelo de soja</i>	65

4.3.3	<i>Bagaço de laranja</i>	66
4.3.4	<i>Bagaço de cana</i>	67
4.3.5	<i>Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)</i>	69
4.3.6	<i>Bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1)</i>	70
4.4	Cinética de produção de endoglucanase no melhor substrato.....	74
4.5	Produção de outras enzimas.....	75
4.5.1	<i>FPase</i>	76
4.5.2	<i>Xilanase</i>	79
4.6	Caracterização bioquímica das enzimas produzida pelo fungo <i>A. fumigatus</i>	86
4.6.1	<i>Determinação da temperatura ótima para atividade das enzimas</i>	87
4.6.2	<i>Determinação do pH ótimo para atividade das enzimas</i>	90
4.6.3	<i>Determinação da estabilidade das enzimas na ausência de substrato</i>	94
4.6.4	<i>Zimograma</i>	97
5	Conclusão	101
	Referências Bibliográficas	105

1 Introdução

Pesquisas por fontes de energia alternativa e renováveis têm se tornado muito importantes devido aos aumentos sucessivos dos índices de poluição que as fontes de energia fóssil estão causando, particularmente em termos de emissões de CO₂ que tem provocado mudanças no clima global (PRASAD et al., 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; PICCOLO; BEZZO, 2009).

O setor de transportes em todo o mundo é quase totalmente dependente dos combustíveis baseados no petróleo. Ele é responsável por 60 % do consumo mundial de petróleo (International Energy Agency, 2008), além do setor de transporte, responsável pela emissão de mais de 70 % de monóxido de carbono global (CO) e 19 % de emissões de dióxido de carbono global (CO₂) (BALAT, 2011). São gerados aproximadamente 8 kg de CO₂ a partir de um galão de gasolina, e em 2007 havia cerca de 810 milhões de carros e caminhões leves rodando nas estradas no mundo. Esses números são projetados para aumentar a 1,3 bilhões em 2030 e mais de 2 milhões de veículos até 2050 (Balat, 2011). Este crescimento vai afetar a estabilidade dos ecossistemas e do clima global, bem como reservas mundiais de petróleo. O aumento dramático do preço do petróleo, a natureza finita dos combustíveis fósseis, o aumento das preocupações quanto ao impacto ambiental, especialmente a relacionada, com efeito estufa, as considerações de saúde e de segurança estão forçando a busca por novas fontes de energia. Portanto, um combustível alternativo deve ser tecnicamente viável, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável, e prontamente disponível (DEMIRBAS, 2008).

Inúmeras alternativas possíveis de combustíveis têm sido propostas, incluindo o bioetanol, biodiesel, metanol, hidrogênio, boro, gás natural, gás liquefeito de petróleo (GLP), combustível Fischer–Tropsch, eletricidade e combustíveis solar (BALAT, 2011). O governo dos EUA se comprometeu recentemente a aumentar o consumo de bioenergia em no mínimo

10 anos e a União Européia pretende substituir diesel e gasolina por etanol no combustível ao nível de 5,75 % até 2010 e 10 % até 2020 (PICCOLO; BEZZO, 2009).

No entanto, esses objetivos podem ser alcançados apenas através de mais avanços nos processos existentes e novas tecnologias para geração de combustível. O etanol é um dos mais promissores bicomcombustíveis e, em princípio, pode ser obtido a partir de qualquer material que contenha açúcares simples ou complexos (PRASAD et al., 2007; CHEN; QIU, 2010; ABIDEEN; ANSARI; KHAN, 2011). Além disso, o etanol apresenta boas perspectivas no mercado internacional, como alternativa de energia renovável e menos poluidora que os combustíveis fósseis. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar, os números indicam a produção de 27,09 bilhões de litros de etanol na safra 2009-2010 de acordo com o segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) feita em setembro de 2009.

Porém, a ampliação excessiva dos canaviais pode comprometer outras culturas agrícolas, além do impacto ambiental que poderá causar (GONÇALVES et al., 2008). O desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para produção de etanol é uma prioridade para muitos centros de pesquisa, universidades e empresas privadas, e até mesmo por diferentes governos (especialmente a partir de biomassa lignocelulósica). Assim, a exploração de materiais celulósicos amplamente disponíveis como resíduos agroindustriais, principalmente o bagaço de cana gerado em grande volume pela indústria sucro-alcooleira, representa uma alternativa bastante vantajosa para ampliar a produção de etanol (PANDEY et al., 2000; TSAO et al., 2000; SÁNCHEZ, 2009; ABIDEEN; ANSARI; KHAN, 2011). Uma ampla variedade de processos para a produção de etanol a partir de materiais celulósicos tem sido estudada e está atualmente em desenvolvimento. Um dos processos mais promissores para a transformação de materiais celulósicos em etanol é a hidrólise enzimática seguida da fermentação (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005; PICCOLO; BEZZO, 2009). Philippidis e Hatziz (1997) avaliaram integralmente esse processo de produção de etanol e apontaram como os dois principais gargalos da tecnologia: os métodos de pré-tratamento impostos à biomassa, e os altos custos de produção de celulasas (em média é gasto US\$ 0.15 por galão de bioetanol produzido – custo estimado para 50 milhões de galões por ano) (BALAT, M.; BALAT, H., 2008; CHEN; QIU, 2010).

O desenvolvimento de processos eficientes e otimizados para a produção de enzimas em escala industrial é fundamental para garantir a viabilidade econômica da produção de etanol celulósico. No entanto, para tal desenvolvimento, deve-se dispor da peça chave deste processo, que é o microrganismo produtor de enzimas. Muitos microrganismos decompositores de materiais lignocelulósicos vêm sendo selecionados para serem utilizados como produtores de enzimas (BHAT, 2000; SÁNCHEZ, 2009). Como se sabe, o Brasil se destaca em biodiversidade e, assim, há um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que apresentem as características desejadas para tal aplicação. A região Amazônica, por sua vez é um reservatório de espécies com grande potencial de utilização devido, principalmente, as suas condições edafoclimáticas que propiciam a existência de microrganismos decompositores e degradantes da biomassa rasteira da floresta.

Apesar da grande diversidade microbiana que pode ser explorada pesquisadores têm utilizado microrganismos geneticamente modificados (OGM's) para tornar os processos de bioconversão mais eficientes empregando métodos de engenharia genética, metabólica e de proteínas (Aristidou; Penttila, 2000). Processos utilizando OGM's podem ser muito meritórios, porém uma usina de produção de etanol onde o nível de contaminação é geralmente elevado, certamente não está preparada para lidar com questões como a contenção de OGM's e o controle de contaminação.

Dessa forma, os riscos relacionados à utilização de OGM's frente à alta contaminação das usinas têm incentivado a busca de microrganismos selvagens potencialmente produtores de enzimas que possam ser cultivados utilizando resíduos agrícolas baratos e abundantes. As enzimas podem ser produzidas por cultivo submerso (fermentação submersa – FSM) ou pelo cultivo em estado sólido (fermentação em estado sólido – FES) usando resíduos agrícolas.

Ao longo dos anos, e até os dias de hoje, contribuições científicas vêm sendo dadas continuamente, no que tange as rotas biotecnológicas relacionadas com a obtenção de extratos enzimáticos capazes de hidrolisar a biomassa e produzir etanol celulósico em baixo custo (LYND; ELANDER; WYMAN, 1996; LEE, 1997; CHANDRAKANT; BISARIA, 1998; BHAT, 2000; LYND et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004; SÁNCHEZ, 2009; ABIDEEN; ANSARI; KHAN, 2011). Com base no exposto, foi desenvolvido um projeto com o objetivo de isolar linhagens de fungos no Bioma Amazônico para avaliação de seus potenciais de produção de enzimas celulolíticas. As linhagens selecionadas foram cultivadas em FES e as

enzimas caracterizadas quanto as atividades enzimáticas de endoglucanase, xilanase, FPase e β -glicosidase e suas termoestabilidade para futuramente serem aplicadas na hidrólise do bagaço de cana para produção de etanol celulósico.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Diversidade Microbiana como Fonte de Novas Enzimas

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente, desempenhando funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10 % dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (BURKE et al., 2011). O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial. A extraordinária atividade dos microrganismos está baseada em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética (PRADE; BOHNERT, 2003; OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006; BURKE et al., 2011), o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. São vários os exemplos que atestam a utilização de recursos microbianos pelo homem em diversas atividades de importância sócio-econômica: na área industrial, os microrganismos são empregados na produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado; na agropecuária, destacam-se os microrganismos fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas e vetores; na área de alimentos, as linhagens microbianas são empregadas na produção de bebidas, panificação, queijos, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros; e na área ambiental, as perspectivas de recuperação do meio ambiente através da biorremediação são bastante promissoras e dependentes de novos isolados (SCHAECHTER; INGRAHAM; NEIDHARDT, 2010).

A exploração dos microrganismos pela indústria gera bilhões de dólares a cada ano (SÁNCHEZ, 2009). O valor dos microrganismos é geralmente avaliado pela potencial aplicação direta nos processos biotecnológicos ou valor de mercado dos produtos derivados

(OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006, SINGHANIA et al., 2010). O aumento da diversidade de moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário está associado com a exploração da diversidade microbiana e são muitos os benefícios científicos esperados como resultado desta exploração.

Os fungos filamentosos têm sido usados há séculos como fontes de produção de muitas enzimas. Encontrar uma nova enzima significa encontrar uma nova função microbiana; portanto, deve-se examinar o maior número possível de microrganismos, através de um potente sistema de *screening*. A Tabela 2.1 apresenta algumas das aplicações que as enzimas podem ser usadas.

Tabela 2.1 Principais aplicações industriais das enzimas microbianas (BHAT, 2000; CAMASSOLA et al., 2004, GRAMINHA et al., 2008).

Enzima	Aplicação industrial
Celulases	Aumentar a rehidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores
Celulases	Fabricação de pães, biscoitos e bolos
Celulases, pectinases, xilanases	Promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos.
Amilases, proteases e outras glucanases	Aumentar a digestibilidade das rações
Celulases	Amaciamento e desbotamento do brim
Celulases	Melhorar remoção de fibras curtas e ásperas da superfície dos tecidos
Hemicelulases	Hidrólise total das fibras da polpa
Celulases	Remover sujeiras das fibras de algodão

Os fungos têm registros fósseis presumíveis no período Pré-cambriano, mas com registros mais evidentes a partir do período Siluriano, entre 438 e 408 milhões de anos (SCHAECHTER; INGRAHAM; NEIDHARDT, 2010). Existem informações sobre doenças em plantas causadas pelos fungos datadas de 1200 a.C., inclusive em versículos bíblicos. Referências aos fungos foram sumarizadas por Buller, em 1915, como causadores de doenças, utilizados como medicamento e como alimento, durante o período clássico greco-romano (HAWKSWORTH, et al., 1995). Os fungos eram considerados plantas sem clorofila e, antigamente, colocados dentro do reino Plantae. Mas assemelham-se às plantas apenas no desenvolvimento multicelular. Há dados que mostram que os fungos estão mais próximos dos animais, pois além das evidências moleculares sugerirem a origem de ambos os grupos a

partir de um protozoário colonial, eles são heterotróficos, possuem glicogênio como substância de reserva e sua parede é, na maior parte, constituída de quitina (SCHAECHTER; INGRAHAM; NEIDHARDT, 2010). Alguns sistemas de classificação dos organismos vivos foram tentados de várias maneiras em datas passadas. Os sistemas de classificação são propostos com base na união dos organismos de acordo com sua história evolutiva e grau de proximidade e, nas últimas décadas, a classificação dos fungos passou por inúmeras modificações (HAWKSWOTH et al., 1995; ALEXOPOULOS et al., 1996; KIRK et al., 2001; HIBBETT et al., 2007; SCHAECHTER; INGRAHAM; NEIDHARDT, 2010). Os fungos pertencem ao Reino Fungi, constituído pela Divisão Eumycota, aos quais pertencem os Filos Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota (HIBBETT et al., 2007). Os fungos, por serem organismos heterotróficos, obtêm o carbono para a síntese celular a partir da matéria orgânica ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Como saprófitas, decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao ambiente (SCHAECHTER; INGRAHAM; NEIDHARDT, 2010).

Na biosfera, o habitat mais rico em fungos é o solo. Há no solo representantes de todos os grandes grupos de fungos, ocorrendo numa densidade populacional entre 10⁴ a 10⁶ fungos/g de solo, inferior ao das bactérias e dos actinomicetos. Mas devido ao comprimento das hifas (10 – 100 m/g de solo) e ao elevado diâmetro (5 a 10 µm), podem contribuir com 0,5 a 5,0 g de tecido vivo (PRADE et al., 2006). Alguns dos fungos presentes no solo são conhecidos como patogênicos, sobrevivendo no solo como saprófitas, na ausência de hospedeiro. Nos sistemas florestais, as densidades das populações microbianas do solo são de ordem de milhares de microrganismos por grama de solo, cuja presença e diversificação de atividades interferem diretamente na nutrição vegetal, sendo estas densidades inferiores às encontradas nos sistemas agrícolas (BURKE et al., 2011).

A principal função dos fungos no solo é a degradação da matéria orgânica, tendo um papel importante na degradação da celulose e lignina, gerando biomassa protéica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (BURKE et al., 2011). Existe uma grande diversidade de fungos encontrados no solo, mas alguns gêneros são mais comuns do que outros. Os gêneros mais frequentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Verticillium* (JÚNIOR; PEREIRA, 2007).

As populações, atividades e biomassa microbianas são influenciadas pelas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. De maneira geral, o número de fungos no solo varia diretamente com a matéria orgânica oxidável. As populações de microrganismos do solo e suas funções são afetadas pelas condições ambientais de pH, aeração, temperatura e disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos (BURKE et al., 2011). Os fungos degradadores de substâncias celulolíticas, geralmente ocorrem no solo. A atividade desses organismos depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, que determina a ocorrência e distribuição desses organismos (KÄHKÖNEN; HAKULINEN, 2011; BURKE et al., 2011).

Os solos tropicais, em particular os solos brasileiros como os da Mata Atlântica, Floresta Amazônica e os solos sob vegetação de cerrado no planalto central, são habitats muito peculiares, com características próprias e únicas, cuja atividade biológica é extremamente rica. Estes solos possuem ampla biodiversidade e tem sido pouco estudados quanto às características microbiológicas que as tornam excelente fonte para a busca de microrganismos produtores de novas enzimas (BON et al., 2008; KÄHKÖNEN; HAKULINEN, 2011). Portanto, o conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de muitos compostos de importância industrial como vitaminas, antibióticos e enzimas.

2.2 Microrganismos Produtores de Celulases

Durante a Segunda Guerra Mundial, a deterioração de fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos, fabricados de algodão, chamou a atenção de soldados das forças armadas norte-americanas. Algumas organizações juntamente com as forças armadas montaram laboratórios em busca de explicações e soluções imediatas para esse problema, que incluíam a detecção de organismos agentes das deteriorações, seus mecanismos de ação e métodos de controle (CASTRO, 2006).

Como resultado das pesquisas, uma linhagem de um fungo filamentosos, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, foi isolada e a esta foi atribuída à característica de excretar enzimas capazes de degradar celulose. Até o ano de 1953, Elwyn T. Reese (coordenador da organização de pesquisa Quartermaster Corps juntamente com as forças armadas) e seu grupo de trabalho já haviam determinado que enzimas naturais, nomeadas

celulases, constituem complexos de diversas moléculas com diferentes habilidades na degradação do substrato (CASTRO, 2006). Como resultado disso, a década de 1970 foi marcada por substancial aumento no interesse mundial na produção de celulases. Tal fato foi intensificado por instabilidades na obtenção de combustíveis fósseis, que acarretou no adicional interesse sobre fontes energeticamente renováveis. Com isso, muitos microrganismos produtores de celulases foram identificados (WILSON, 2009).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulase, apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (SÁNCHEZ, 2009), que inclui bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Romimococcus*, etc) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc), plantas (*Fragária*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002). Dentre todos os organismos considerados celulolíticos, alguns dos mais utilizados industrialmente na produção de celulases, são os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (ZHANG et al., 2006; SINGHANIA et al., 2010). Dessa forma, as características desses principais gêneros são apresentadas a seguir:

Aspergillus: os fungos do gênero *Aspergillus*, descritos primeiramente por Micheli e Link em 1809, são fungos pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. São fungos filamentosos, cosmopolitas, ubíquos encontrados na natureza e comumente isolados de solo e resíduos vegetais. No que tange à sua morfologia, produzem micélios septados e ramificados, cujas porções vegetativas encontram-se submersas ao nutriente, quando cultivados estaticamente (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996), seu aspecto microscópico é mostrado na Figura 2.1.



Figura 2.1 Estrutura microscópica da estrutura reprodutiva (conidióforos com conídios) de fungo filamentosos do gênero *Aspergillus* (DOCTORFUNGUS, 2010).

A cor da superfície da colônia pode variar dependendo da espécie. O reverso é incolor a amarelo pálido, na maioria dos isolados. No entanto, a cor reversa também pode ser roxa para verde-oliva em algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* e laranja ao roxo em *Aspergillus versicolor* como mostra a Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Cor da colônia em várias espécies de *Aspergillus* (DOCTORFUNGUS, 2010).

Espécie	Inverso	Reverso
<i>A. clavatus</i>	Azul-verde	Branco e marrom com o crescimento
<i>A. flavus</i>	Amarelo-verde	Marrom ao vermelho
<i>A. fumigatus</i>	Azul-verde para cinza	Branco
<i>A. nidulans</i>	Verde para amarelo claro	Roxa para verde oliva
<i>A. niger</i>	Preto	Branco para amarelo
<i>A. terreus</i>	Marrom	Branco para marrom
<i>A. versicolor</i>	Branco no início e depois amarelo-verde	Branco para laranja, roxo ou vermelho

Cerca de 20 espécies de *Aspergillus* já foram relatadas como agentes causadores de infecções oportunistas no homem, como por exemplo, aspergilose (quando estes fungos invadem tecidos do corpo) Entre estes *A. fumigatus* é a espécie mais comumente isolada, seguido por *A. flavus* e *A. niger* (PRADE; BOHNERT, 2003). A temperatura interna, próxima a 37°C, é um eficiente mecanismo de defesa que nos protege da infecção por fungos não-termotolerantes. Entretanto, cerca de 200 espécies fúngicas conseguiram evolutivamente adaptar-se e sobreviver no ambiente hostil de nosso organismo sobrepujando diversos mecanismos de defesa (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Em geral, estudos publicados demonstraram que a virulência do fungo é multifatorial, associada a sua estrutura, capacidade de crescimento e adaptação a condições de estresse. O fungo *Aspergillus fumigatus* é um exemplo de fungo que consegue crescer bem em temperaturas acima de 40°C e durante a infecção expressa fatores de virulência que mediam danos a células hospedeiras (ABAD et al., 2010).

Penicillium: os fungos do gênero *Penicillium*, descritos primeiramente por Link em 1809, assim como os do gênero *Aspergillus*, são fungos saprófitos, mesofílicos, pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. Os membros do gênero *Penicillium* são filamentosos com exceção do *Penicillium marneffeii* e reproduzem-se

sexuadamente pela formação de ascósporos (esporos sexuados internos). Possuem micélios vegetativos septados que penetram no substrato (em caso de cultivo estático), produzindo hifas aéreas, nas quais se desenvolvem conidióforos (a partir dos quais se formarão os conídios que são esporos assexuais) (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Seu aspecto microscópico é mostrado na Figura 2.2.



Figura 2.2 Estrutura microscópica de fungo filamentososo do gênero *Penicillium* (DOCTORFUNGUS, 2010).

São comumente considerados contaminantes, e podem causar infecções, particularmente em imunodeprimidos. Além do seu potencial infeccioso são conhecidos também por produzir micotoxinas (compostos químicos venenosos produzidos por certos fungos). (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996) e algumas espécies como *P. echinulatum* podem produzir enzimas celulolíticas para aplicação tecnológica (CAMASSOLA; DILLON, 2007).

As colônias são inicialmente brancas e tornam-se azul, verde, cinza, verde-oliva cinza, amarelo ou rosa com o tempo. O verso da placa geralmente é pálido a amarelado. As colônias de *Penicillium* diferente do *Penicillium marneffei* possuem rápido crescimento, e apresentam-se textura filamentosa e aveludada (DOCTORFUNGUS, 2010).

Trichoderma: os fungos filamentosos desse gênero, que foi descrito primeiramente por Persoon e Gray em 1801, pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Hypocreales e à família Hypocreaceae. É um gênero de fungo que está presente em todos os solos, e muitas espécies deste gênero podem ser caracterizadas como oportunistas e simbiotes de plantas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Os conídios formam normalmente dentro de uma semana em tufo compactos ou soltos em tons de verde ou amarelo ou branco com menos frequência. Um pigmento amarelo pode ser secretado no ágar, especialmente no meio PDA (Potato Dextrose Ágar). Algumas espécies produzem um odor característico de coco doce.

Possuem como principal teleomorfo ("forma perfeita" ou sexual) de algumas de suas espécies o gênero *Hypocrea*. Quando cultivado estaticamente, o aspecto observado é verde brilhante (Figura 3) devido a grupos de conídias presentes nas extremidades das hifas aéreas (DOCTORFUNGUS, 2010). Seu aspecto macroscópico e microscópico é mostrado na Figura 2.3.

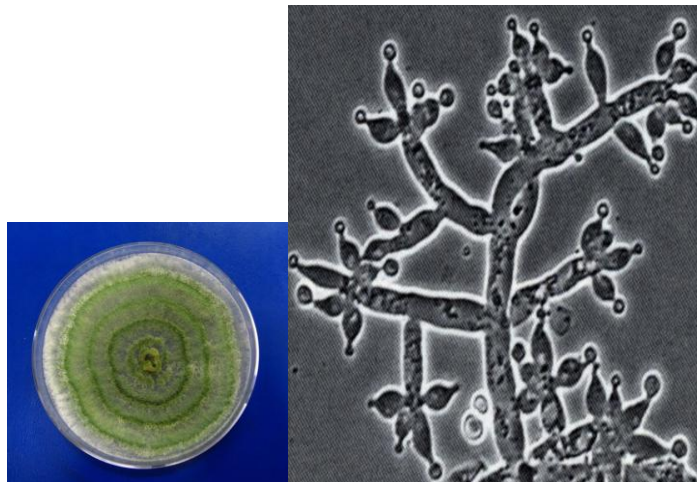


Figura 2.3 Estrutura macroscópica (a esquerda) e microscópica (a direita) de fungo filamentososo do gênero *Trichoderma* (DOCTORFUNGUS, 2010).

Os fungos filamentosos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação (BON et al., 2008; SÁNCHEZ, 2009). Essa atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos (SÁNCHEZ, 2009). Conhecem-se cerca de 4.300 enzimas e há muitas enzimas ainda a serem descobertas. Além do desafio da descoberta de uma nova enzima, há também o desafio de torná-la economicamente viável para a sua comercialização. Ao longo dos anos, e até os dias de hoje, contribuições científicas vêm sendo dadas continuamente, no que tange ao isolamento de fungos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (BHAT, 2000; CARDONA; SANCHEZ, 2007; SÁNCHEZ, 2009, GÍRIO et al., 2010; LIU et al., 2011).

2.3 Bioma amazônico e seu Potencial Biotecnológico como Fonte de Organismos Produtores de Enzimas

A diversidade de microrganismos presente nos diversos biomas da Terra é muito alta. O Brasil é o país de maior biodiversidade do Planeta. Foi considerado megabiodiverso – país que reúne ao menos 70 % das espécies vegetais e animais do mundo pela International Conservation e tem seu território ocupado por diferentes biomas (Amazônia, Caatinga, Campos do Sul, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Zona Costeira e Zona de Transição). De todos estes biomas, o de maior extensão é a Amazônia, ocupando quase metade do território nacional (49,29 %). (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2004). Além de maior bioma é a maior reserva de diversidade biológica do mundo, apresenta características edafoclimáticas bem distintas, e por isso possuem sua própria biodiversidade (GODOY et al., 2009). Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas (THIEME et al., 2007). Por conta disso, se destacam como um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que possam ser usados nos processos biotecnológicos.

A floresta amazônica vive do seu próprio material orgânico em meio a um ambiente úmido com chuvas abundantes. O chão da floresta é coberto por uma fina camada de serrapilheira, a qual é protegida pelas folhas e outras estruturas vegetais que caem das árvores ao longo do ano. Esse material que serve de alimento a muitos insetos, entra em rápida decomposição na atmosfera úmida. A fina camada resultante desse processo fornece as condições necessárias para o crescimento de várias espécies de fungos (CABADILLA et al., 2009). Portanto, o Bioma Amazônico representa uma fonte em potencial de fungos celulolíticos devido as suas condições edafoclimáticas peculiares que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta. Apesar disso, esse bioma tem sido pouco explorado para tal finalidade e poucas pesquisas foram feitas nessa região. Medeiros, Hanada e Filho (2003) isolaram 10 linhagens fúngicas produtoras de enzimas que degradam a xilana na reserva florestal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para uso na indústria de polpa e papel, onde podem ser empregadas como auxiliares no processo de branqueamento proporcionando uma redução na quantidade de compostos químicos. Souza et al. (2008) avaliaram a produção de enzimas como amilases, proteases, celulases, fenoloxidasas e pectinases por linhagens de Basidiomicetos isoladas de áreas de Floresta na Amazônia. Os fungos foram coletados na Reserva de Campina do INPA. Nesse trabalho todos

os isolados de Basidiomicetos foram capazes de produzir pelo menos duas das enzimas pesquisadas.

Lima e colaboradores (2008) avaliaram a atividade de lipases de 250 isolados fúngicos (fitopatogênicos, degradadores de madeira e endofíticos) da Coleção do Laboratório de Biorgânica da Universidade Estadual do Amazonas que já haviam apresentado atividade hidrolítica em ensaios em placa e compararam com o resultado de atividade de lipases de outros isolados de outros biomas (Cerrado e Caatinga). Observaram que os melhores isolados foram UEA-028 E UEA-045 ambos isolados do Bioma Amazônico. Estes fungos apresentaram maiores percentagens de conversão a éster e foram submetidos a ensaio de degradação de azeite. Portanto, devido o grande potencial microbiológico da região Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na área biotecnológica, existe um grande potencial para a prospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico.

2.4 Biomassa Lignocelulósica

2.4.1 Caracterização Química

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza e compõe mais de 60 % de toda a biomassa produzida na Terra (TENGERDY; SZAKACS, 2003; JUHÁSZ et al., 2005; SAKUMARAN et al., 2009). São compreendidas, majoritariamente, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Essas biomassas vegetais são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (SÁNCHEZ, 2009).

Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas na forma de espirais para conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes

(SÀNCHEZ, 2009). Uma representação das três principais frações poliméricas, celulose, hemicelulose e lignina que compõem a parede celular vegetal da é mostrada na Figura 2.4.

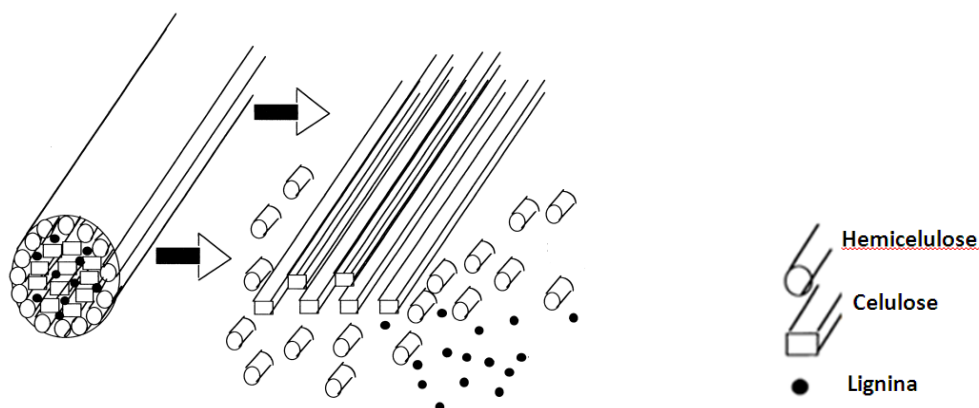


Figura 2.4 Ilustração das estruturas poliméricas, celulose, hemicelulose e lignina que compõem a parede celular (TECHAPUN et al., 2003).

Entre os fungos mais efetivos na biodegradação natural dessas frações lignocelulósicas, estão os fungos de decomposição branca (“White-rot-fungi”), os fungos de decomposição marrom (“Brown-rot-fungi”) e os fungos de decomposição branda (“soft-rot-fungi”) (OKAMOTO et al., 2011). Os fungos de decomposição branca possuem em comum a capacidade de degradar lignina tão bem como os polissacarídeos de madeira (KIRK, 1998). Os fungos de decomposição marrom atacam extensivamente a celulose (RAY et al., 2010). Já os fungos de decomposição branda atacam principalmente os polissacarídeos da madeira. Estes atacam preferencialmente a camada S_2 da parede celular secundária, sendo que a camada S_2 e a lamela média são resistentes ao ataque, provavelmente, pelo alto teor de lignina (OKAMOTO et al., 2011)

A celulose é o polímero mais abundante na biosfera e o principal constituinte das biomassas (SÀNCHEZ, 2009). Corresponde de um terço a metade do tecido das plantas e é constantemente sintetizado pela fotossíntese (SUN et al., 2004). É um homopolissacarídeo não-ramificado formado por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1→4) como mostra a Figura 2.5. Os anéis de glicose adotam conformação mais estável na forma de cadeira com os grupos hidroxila na posição equatorial (a formação de ligações de hidrogênio entre átomos adjacentes de oxigênio e hidrogênio força o arranjo linear da molécula (ZHANG; LYND, 2004).

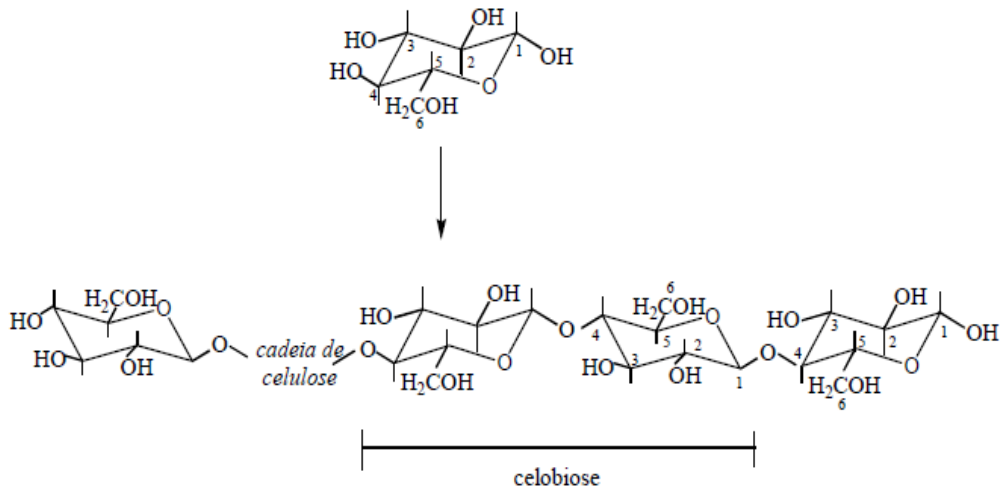


Figura 2.5 Ilustração da estrutura da celulose a partir de unidade de D-glicose, destacando a celobiose, polímero linear de D-glicose ligado por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (ZHANG; LYND, 2004).

Uma das principais limitações da atividade das enzimas celulolíticas, e conseqüentemente da produção de açúcar é a insolubilidade do substrato. A massa molecular que varia de 50 mil e 2,5 milhões de Dalton dependente da origem da amostra (PÉREZ; SAMAIN, 2011). Apresenta regiões altamente ordenadas chamadas de cristalina, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por isso inerte à ação de solventes comuns (hidrofóbicos) e um obstáculo extra para o processo de hidrólise, e regiões menos ordenadas ou amorfas onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (Figura 2.6) (SUN; CHENG, 2002; ZHANG LYND, 2004).

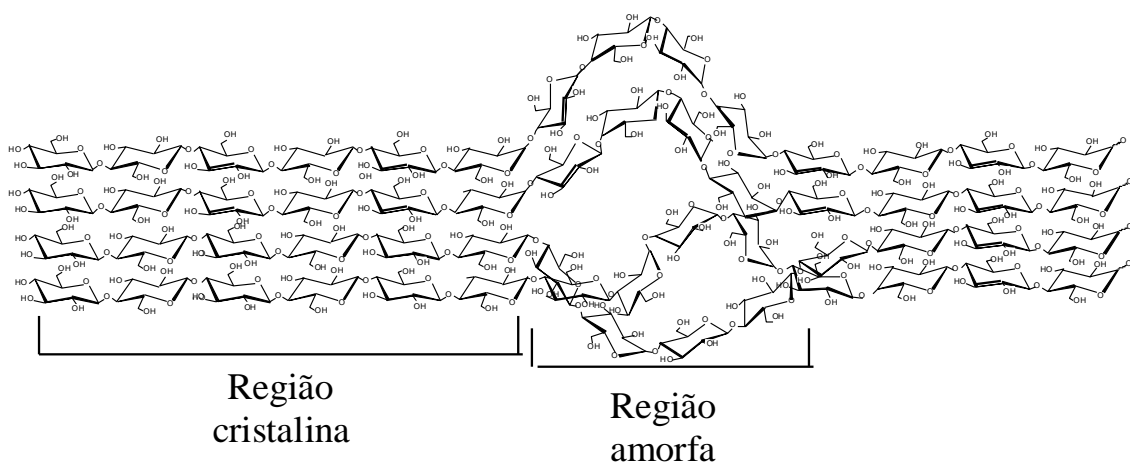


Figura 2.6 Estrutura da celulose destacando a região cristalina e região amorfa (SUN; CHENG, 2002).

A hemicelulose é um grupo diversificado de polímeros que engloba uma série de carboidratos com uma estrutura química similar a da celulose, mas sendo constituído principalmente de xilana, presente na parede celular e nas lamelas de células vegetais (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Estes açúcares estão ligados entre si, por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Elas são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, são diferentes denominações das hemiceluloses em função dos monômeros que as compõem (POLIZELI, et al., 2005).

Por serem intimamente associadas com a lignina e a celulose, as hemiceluloses têm sua conformação estrutural alterada de acordo com o local em que são encontradas. A hemicelulose presente em madeiras duras apresenta de 150 a 200 resíduos de monossacarídeos enquanto as demais apresentam de 70 a 200 (BOCCHINI, et al., 2005). A hemicelulose chega a representar 40 % do peso seco de resíduos lignocelulósicos e sua degradação é realizada por hemicelulases como a xilanase, que hidrolisa este heteropolissacarídeo de cadeias curtas ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores. O interesse industrial pelas hemicelulases e por fungos produtores de xilanases extracelulares vem crescendo, principalmente nas indústrias químicas e farmacêuticas, na produção de biopolímeros catiônicos, hidrogéis e derivados de ester alquil de cadeias longas (SUN et al., 2004, POLIZELI et al., 2005, GOTTSCHALK, et al., 2010). A Figura 2.7 ilustra os monossacarídeos constituintes da hemicelulose.

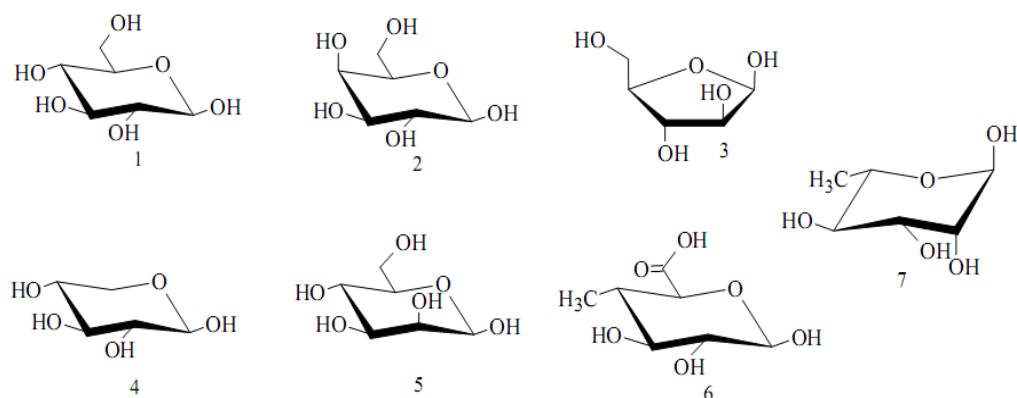


Figura 2.7 Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: *D*-glucose (1), *D*-galactose (2), *L*-arabinose (3), *D*-xilose (4), *D*-manose (5), 4-*O*-metil-*D*-glucorônico (6), *E*-*L*-Ramnose (7), (SAHA, 2005).

A lignina pode representar até 25 % de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40 % do seu peso seco. Está concentrada em tecidos relacionados com condução de solutos e suporte mecânico. A lignina representa um conjunto de polímeros amorfos, de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas características de polímeros termorrígidos. Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura aromática de natureza eminentemente fenólica, na maioria dos casos chamados de compostos polifenólicos (Figura 8) (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990) entre eles, acetovanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzaldeído, ácido sirínico, ácido vanílico, siringaldeído, hidroquinona e vanilina. A lignina é formada pela remoção da água para constituir a estrutura aromática de açúcar existindo vários tipos de monômeros para a formação desta, e esses tipos e proporções dependem da sua natureza (SUN et al., 2011). Os grupos hidroxilas reagem mutuamente com os grupos acetona ou com o aldeído. Quando a hidroxila reage com a outra, forma-se uma ligação do tipo éter, quando ligada a um aldeído, forma-se um hemiacetal e quando se liga a uma acetona forma-se o cetal (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

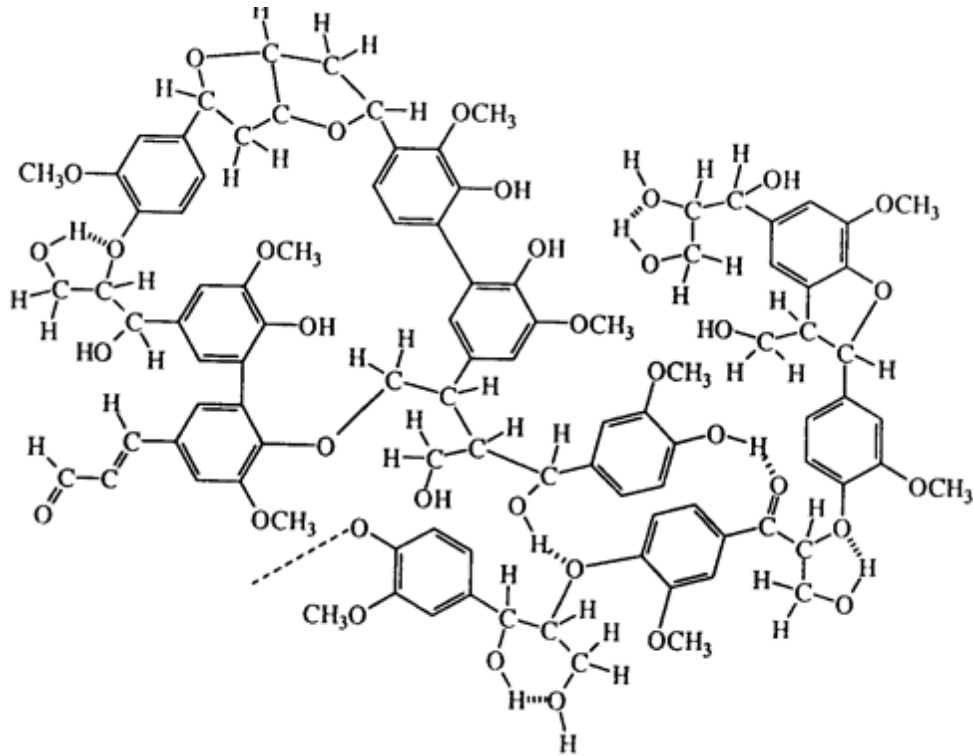


Figura 2.8 Estrutura hipotética da lignina (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

Os anéis fenólicos da lignina se alinham preferencialmente no plano da parede celular e estudos indicam que a estrutura química e tridimensional da molécula está fortemente relacionada com sua estrutura polissacarídica. Essa complexa molécula resiste ao maior ataque de microrganismos (SUN et al., 2011). A biossíntese da lignina é um campo de pesquisa muito ativo, principalmente por causa da sua relevância econômica. Para produção de papel de alta qualidade a lignina precisa ser extraída da poupa por processos caros e com alto potencial de poluição, assim requerendo grandes quantidades de energia e produtos químicos.

2.5 Enzimas

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Esses biocatalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende das condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (MEDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). A biossíntese da enzima pode ser associada ao crescimento sendo, então a taxa de formação do produto proporcional ao

aumento da biomassa; ou não associada ao crescimento celular, e nesse caso, a taxa de formação de produto é independente da taxa de crescimento celular (SCHIMIDELL et al., 2001). Estes biocatalisadores têm a função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e proteínas, para absorção de seus componentes como nutrientes (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004). A Tabela 2.3 ilustra exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de microrganismos.

Tabela 2.3 Exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de microrganismos (BON et al., 2008).

Enzima	Microrganismos produtores
Aminopeptidases	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i> .
Alfa-amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> .
Calalase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Micrococcus luteus</i> .
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Streptomyces lividans</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> .
Dextranase	<i>Chaetomium erraticum</i> , <i>Penicillium lilacinum</i> .
Alfa-galactosidase	<i>Aspergillus niger</i> .
Beta-glicanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> .
Fitase	<i>Aspergillus niger</i> .
Glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>R. niveus</i> , <i>R. oryzae</i> .
Hemicelulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> .
Inulase	<i>Aspergillus niger</i> .
Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i> .
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium crememberti</i> , <i>Candida lipolytica</i> ; <i>C. rugosa</i> , <i>P. roquerforti</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> .
Pectinase	<i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Rhizopus niveus</i> .
Protease	<i>Bacillus halodurans</i> , <i>Aspergillus melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Rhizopus niveus</i> .
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>T. reesei</i> .

Basicamente, dois grupos de enzimas são responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas como lacase, manganês-peroxidase e lignina peroxidase, atuam na degradação da lignina e detoxificam o

meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (KAMIDA, 2005).

As hidrolases correspondem as enzimas do complexo celulolítico que clivam ligações O - glicosídicas, sendo classificadas pela Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a enzima celulásica avaliada (LYND et al., 2002). O modelo básico de ação das celulasas está fundamentado principalmente no sistema dos fungos, e em particular do *Trichoderma* (CASTRO, 2006). Esse sistema possui três enzimas principais que estão classificadas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico em: Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND et al., 2002). Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulásico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia.

As endoglucanases, que estão classificadas com o EC 3.2.1.4, possuem como nome sistemático, segundo a IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases, mas também podem ser referenciadas na literatura como CMCases. Essas são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos (LYND et al., 2002).

Já as exoglucanases (EC 3.2.1.91) ou avicelases são enzimas que atuam na porção cristalina da molécula de celulose e catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose. As exoglicanase são também conhecidas como celobiohidrolase, β -1,4 celobiohidrolase ou CBHs (LINDER; TEERI, 1997). Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela desestratificação das fibras e pelo aumento das regiões intersticiais; promovendo aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG; LYND, 2004). As CBHs ainda podem ser divididas em dois tipos: as enzimas do tipo I (CBHs I), que hidrolisam terminais

redutores (R), enquanto que as do tipo II (CBHs II) hidrolisam terminais não redutores (NR) (LINDER; TEERI, 1997).

O terceiro e último grande grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas β -glicosidásicas, ou β -glicosídeo glucohidrolases (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático. Entretanto, essas enzimas também podem ser encontradas com os nomes gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril- β -glicosidase, β -D-glicosidase, β -glicosídeo glicohidrolase, arbutinase, amigdalina, p-nitrophenil β -glicosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilina (IUBMB, 2010). As β -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002). Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (BHAT; BHAT, 1997)

As celulases são enzimas que apresentam massas moleculares relativamente elevadas, que, em geral, se apresentam em sua forma glicosilada, com um teor de carboidratos que pode variar de cerca de 1 % até 50 % da massa total da enzima (SUURNÄKKI et al., 2000). A estrutura dessas enzimas pode ser dividida em três regiões: o domínio catalítico (DC), que abrange cerca de 90 % do número total de aminoácido da seqüência peptídica e é a localização da molécula onde a catálise ocorre efetivamente; a região de ligação (RL), na qual está contida uma quantidade pequena de aminoácidos, no entanto altamente glicosilados, cuja função é apenas a de ligar o domínio catalítico à terceira região, que compreende o módulo de ligação a carboidratos (MLC) (LINDER; TEERI, 1997). Os MLCs são pequenos polipeptídeos estáveis que podem conter de quarenta a cento e vinte aminoácidos, sendo localizados contiguamente à cadeia de aminoácidos da enzima. As principais funções dos MLCs são: (1) aproximar e manter a enzima próxima à superfície do substrato, de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo, (2) aumentar a especificidade da enzima na atuação de regiões seletivas da molécula de substrato e, (3) romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa se apresentar com elevada cristalinidade (LYND et al., 2002).

As celulases têm uma ampla variedade de aplicações industriais e são produzidas por um grande número de fungos, principalmente Ascomycetos e Basidiomycetos. São utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de

alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (BHAT; BHAT, 1997; SAHA, 2000, CAMASSOLA; DILLON, 2007, GRAMINHA et al., 2008, GOTTSCHALK et al. 2010). A Tabela 2.4 mostra os componentes do complexo enzimático produzidos por diferentes fungos capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos.

Tabela 2.4 Complexos enzimáticos produzidos por fungos capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos (GRAMINHA et al.,2008).

Celulases
Celulase EC 3.2.1.4 (1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucano 4-glucano hidrolase)
Celulose 1,4-b-celobiosidase EC 3.2.1.91 (1,4- β -d-glucano celobiohidrolase)
Glicose 1,4-_-glicosidase EC 3.2.1.74 (1,4- β -d-glucano glucohidrolase)
B-Glicosidase EC 3.2.1.21 (β -d-glicosideo glucohidrolase)
Hemicelulases
Endo-1,4- β -xilanase EC 3.2.1.8 (1,4- β -d-xilano xilanohidrolase)
Xilanase-1,4- β -xilosidase EC 3.2.1.37 (1,4- β -d-xilano
β -N-xilohidrolase Arabinofuranosidase EC 3.2.1.55 (β -l-arabinofuranoside arabinofuranohidrolase)
Acetilesterase EC 3.1.1.6 (acetico-ester acetil hidrolase)
Ligninases
Lacase EC 1.10.3.2 (benzenediol:oxigenoxidoreductase)
Manganês peroxidase EC 1.11.1.13 (Mn(II):hidrogeno-peroxido oxidoreductase)
Lignina peroxidase EC 1.11.1.14 (1,2-bis(3,4-dimetoxi fenil) propano-1,3-diol:hidrogeno-peroxido oxidoreductase)

A elucidação completa da bioquímica e da biologia molecular envolvidas na síntese de enzimas do complexo celulásico é objetivo de cientistas há cerca de muitos anos. Em meados da década de 80, pesquisadores propuseram que microrganismos naturalmente produtores de celulases sintetizam essas enzimas constitutivamente e as excretam, porém mantendo-as ligadas à parede celular. O objetivo dessa propriedade seria liberar pequenos glicídios, que, entrando na célula e no núcleo, induziriam a expressão das celulases (SUURNÄKKI et al., 2000). Para o fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, a principal enzima do complexo celulásico envolvida nesse mecanismo é a celobiohidrolase II, que libera essencialmente celobiose, molécula capaz de passar pela parede e pela membrana celular, sendo o transporte por esta última, possivelmente mediado pela ação de enzimas lipofílicas (SUURNÄKKI et al., 2000). Esse dissacarídeo, segundo ILMÉN et al. (1997), não seria o

indutor verdadeiro da expressão de celulases, e sim a sofrorose, formada a partir de celobiose e oligossacarídeos superiores, pela atividade de transglicosilação de endoglucanases I ou β -glicosidasases.

A regulação da síntese de celulases ocorre pela ativação do processo de transcrição, ou seja, quanto maior a concentração de indutor no meio ao qual o microrganismo está exposto, maior a síntese de mRNA's que se acoplam e transcrevem os trechos da fita de DNA referentes às enzimas celulásicas. Evidentemente, há uma concentração de substrato limite, acima da qual efeitos indutores passam a não ser mais observados e, muitas vezes, até revertidos. É o caso da celobiose. Em concentrações moderadas desse açúcar (até cerca de 20 g.L⁻¹), os genes que codificam as celobiohidrolases I e II e as endoglucanases I, II e V de *T. reesei* QM9414 sofreram transcrição (ILMÉN et al., 1997). Já em concentrações mais elevadas, é sabido que esse glicídio inibe a síntese de celulases (LYND et al., 2002).

A produção de enzimas do complexo celulolítico por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia a ser explorado, para isso são apresentadas duas principais estratégias para a produção de celulases. Fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSM), que diferem entre si em relação as suas condições ambientais e formas de condução.

2.6 Fermentação em Estado Sólido (FES) e Submersa (FSM) na Produção de Enzimas Microbiana

As duas principais estratégias para a produção de celulases são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSM), que diferem entre si em relação a suas condições ambientais e formas de condução. Entre esses processos, a fermentação submersa (FSM) tem sido a mais usada. Entretanto, nos últimos anos têm aumentado a tendência do uso da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (PANDEY et al., 2000; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005; LEVER et al., 2010; SINGHANIA et al., 2010; ROCKY-SALIMI; HAMIDI-ESFAHANI, 2010). Tanto o processo de FES quanto o de FSM apresentam características importantes, as quais devem ser levadas em conta no momento da escolha, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser

utilizado. Indubitavelmente, um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional (PANDEY et al., 2000).

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como: a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos; e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática (GERVAIS; MOLIN, 2003). Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias, afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como, reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (GERVAIS; MOLIN, 2003). Os fungos filamentosos precisam de um ambiente úmido para seu crescimento. Por isso, um nível de umidade ideal tem que ser mantida. Umidade mais baixa que a ideal tende a reduzir a nutrição por difusão e assim o crescimento microbiano e a estabilidade da enzima levando a um inchaço do substrato. Por outro lado, maiores níveis de umidade podem levar a aglomeração das partículas, limitando a transferência de gás e aumentando a competição por bactérias (KRISHNA, 2005).

O termo fermentação em estado sólido (FES) é objeto de numerosas definições. Segundo Aidoo e colaboradores (1982) a fermentação em meio sólido engloba toda fermentação que ocorre sobre substrato sólido bem como, em suporte sólido nutricionalmente inerte. Oriol et al. (1988), Pandey et al. (2000), Rodrigues Couto, Sanromán (2005) e Singhania et al. (2010) definem como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido entre as partículas do substrato. Para Soccol et al. (1994) a água livre indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes (GERVAIS; MOLIN, 2003). De acordo com Auria et al. (1993) a FES é um processo com um sistema de quatro fases. A fase contínua é ar ou de outra mistura de gases que normalmente flui através de uma camada de sólidos. Este sólido é composto de uma parte insolúvel em água que contém uma solução aquosa de nutrientes. Esta solução é fortemente absorvida dentro da matriz de apoio insolúvel,

e a quarta fase é o microrganismo que cresce no interior do suporte e / ou em sua superfície e / ou no interior do espaço livre. O menor nível de umidade que a FES pode ocorrer é de aproximadamente 12 %, pois abaixo deste nível todas as atividades biológicas cessam. O limite superior é função da capacidade de absorção e, portanto, teor de umidade, que varia de acordo sobre a natureza do substrato (KRISHNA, 2005).

Além da umidade ótima na FES existem vários fatores que afetam o processo de fermentação, e estes variam de processo para processo, dependendo do tipo de substrato e os microrganismos utilizados, e também sobre a escala do processo. Os fatores podem ser amplamente divididos em biológicos, físico-químicos, e fatores ambientais. Um fator pode ser independente relacionada com um processo biológico, mas dependente, quando está relacionada a um processo físico-químico e vice-versa. Na FES podem ser destacadas como principais vantagens: a simplicidade, o baixo custo, a alta produtividade, a alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2000; GERVAIS; MOLIN, 2003; SINGHANIA et al., 2009). Como desvantagens podem ser destacadas: as dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição, ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (PANDEY, 2003; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005; SINGHANIA et al., 2009). As principais vantagens e desvantagens da FES estão resumidamente relacionadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Aspectos positivos e negativos da fermentação em estado sólido (MITCHELL et al., 2000; GERVAIS; MOLIN, 2003; KRISHNA, 2005; SINGHANIA et al., 2009).

Vantagens	Desvantagens
O meio de cultivo é simples, na maioria das vezes, natural. Condições próximas dos meios naturais;	Pré-tratamento dos suportes pode ser necessário em alguns casos, podendo modificar negativamente a estrutura do substrato;
Efluentes líquidos reduzidos;	Difícil regulação dos parâmetros de cultura (pH, umidade, etc);
Diminuição das contaminações devido à baixa umidade e atividade de água (a_w);	Risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de

	umidade nas fermentações mais longas);
Em fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo;	Alta taxa de contaminação quando não se utiliza a microflora natural. A estimativa precisa da biomassa produzida é difícil;
Fácil aeração devido à porosidade do material. Baixa demanda de energia.	Difícil automação do processo.

Na FSM a água chega a constituir cerca de 90 a 99 % da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato (MITCHELL et al., 2000; SINGHANIA et al., 2010). Embora a FSM apresente algumas desvantagens em relação à FES, processos envolvendo limitações no teor de água livre no sistema são evitados quando se objetiva a geração de muitos produtos, especialmente em escalas maiores, onde são requeridos biorreatores (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003)

A utilização de inúmeros materiais orgânicos como resíduos agrícolas, florestais e da indústria alimentícia tem sido proposta como substratos para a FES (KALOGERIS, et al., 2003). Esses resíduos promovem, ao mesmo tempo, um substrato alternativo e barato para a fermentação e a redução dos problemas ambientais causados pela sua disposição aleatória no meio ambiente (RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de mandioca e polpa de limão, têm sido empregados com sucesso como substratos na produção de enzimas por FES (NIGAM; SINGH, 1996; ADSUL et al., 2004; SILVA et al., 2007 MARTINS et al., 2008; MAMMA, et al. 2008; SINGHANIA et al., 2010; CHEN; QIU, 2010).

Nigam e Singh (1996) analisaram o uso de resíduos agrícolas como substratos para produção de enzimas celulolíticas em FES e relataram que com o uso de tecnologia adequada de produção (melhoria do design dos biorreatores e controle da operação), a FES pode tornar-se um método competitivo para a produção de celulases.

2.6.1 Resíduos Lignocelulósicos Utilizados em FES

Com o ininterrupto aumento da produção de matérias-primas agrícolas, as biomassas lignocelulósicas, que são *a priori* tratadas como seus “resíduos”, também têm sua geração incrementada. Assim, a Tabela 2.6 ilustra o levantamento da produção mundial de diferentes resíduos lignocelulósicos derivados de fontes agrícolas.

Tabela 2.6 Resíduos lignocelulósicos gerados de diferentes fontes agrícolas (SANCHES, 2009).

Resíduos lignocelulósicos	10 ⁶ ton./ano
Bagaço de cana-de-açúcar	317 - 380
Palha de milho	159 - 191
Casca de arroz	157 - 188
Farelo de trigo	154 - 185
Farelo de soja	54 - 65
Farelo de cevada	35 - 42
Fibra de algodão	17 - 20
Casca de banana	13 - 15
Farelo de feijão	4,9 - 5,9
Farelo de centeio	4,3 - 5,2
Resíduos de pinho	3,8 - 4,6
Farelo de café	1,6 - 1,9

Em um país como o Brasil onde a agricultura é a principal atividade econômica, os resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais são abundantes (GRAMINHA et al., 2008). Estes materiais são pouco aproveitados sendo que uma parte é usada para geração de energia

elétrica, enquanto outra grande parte é queimada ou simplesmente fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um passivo ambiental.

A conversão desses resíduos em biomassa aproveitável ou em produtos de valor comercial poderá, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais, trazer grandes dividendos à economia (SAKUMARAN et al., 2009). Dessa forma, há duas possibilidades promissoras de utilização dos resíduos que vem sendo muito pesquisada nos últimos anos. Uma delas é a completa conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (RESHAMWALA; SHAWKY; DALE, 1995; LAWFORD, ROUSSEAU, 2003; BALLESTEROS et al., 2004; HAMELINCK et al., 2005; GONÇALVES et al., 2008; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; SAKUMARAN et al., 2009; BALAT, 2011). Para tal aplicação é necessário uma abundante geração de resíduos como, por exemplo, o bagaço de cana de açúcar gerado abundantemente no Brasil (CONÇALVES et al., 2008). A outra possibilidade de utilização dos resíduos é a produção de enzimas. Alguns exemplos de resíduos provenientes do uso agroindustrial utilizados em fermentações para produção de enzimas por microrganismos são a palha de arroz (PALMAROLA-ANDRADOS et al., 2005), fibra de alfafa (SREENATH et al, 2001), palha de trigo (THYGESEAN et al., 2003;), serragem de madeira, casca de arroz (SAHA et al., 2005), palha de milho (SAHA et al., 2005) e o bagaço de cana-de-açúcar (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006; GONÇALVES et al., 2008; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009). Existe, portanto, uma forte tendência para que cada usina de etanol produza também as enzimas para obtenção de etanol derivado de palha e bagaço de cana (ADSUL et al., 2004).

Portanto, o aproveitamento de substratos facilmente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais para a produção de enzimas em fermentação em estado sólido pode tornar-se economicamente vantajoso para a produção de etanol. Dentro desse contexto, o presente trabalho descreve a avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção das enzimas celulasas por FES. Os resíduos agroindustriais avaliados neste trabalho incluem o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, farelo de trigo e o farelo de soja. Todos esses materiais se destacam pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo.

2.6.1.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil. Do seu processo de industrialização obtêm-se como produto o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o etanol, o vinhoto e o bagaço (SILVA et al., 2007).

Atualmente, o Brasil lidera a lista dos 80 países produtores de cana-de-açúcar e a previsão da produção de cana-de-açúcar, para a atual safra (2008/2009), indica que o total dessa matéria-prima que será processada pelo setor sucroalcooleiro, deverá atingir um montante de 558,72 milhões de toneladas. Logo, o bagaço de cana é o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade, aproximadamente 280 Kg/ton de cana moída. (CONAB, 2008). Segundo a Unica – União da Indústria de Cana de Açúcar estima-se que 558,72 milhões de toneladas de cana atingidos nesta safra podem gerar 158 milhões de toneladas de bagaço de cana. Na maioria das usinas o bagaço resultante é queimado para co-gerar energia para própria usina, entretanto, cerca de 40 a 50 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída não é utilizada, e torna-se um passivo ambiental, em termos de espaço e material poluente.

A composição do bagaço varia de acordo com diversos fatores, dentre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio. Quimicamente, é composto por: celulose, hemicelulose e lignina, principais polímeros naturais, e pequenas quantidades de outros compostos como pectinas, proteínas e outros polissacarídeos complexos em quantidade menores (PANDEY et al., 2000). Do ponto de vista físico constitui-se por: fibra (fração sólida orgânica insolúvel em água presente no talo da cana) 45 %; sólidos insolúveis 2 a 3 %; sólidos solúveis 2 a 3 % e água 50 %. A Tabela 2.7 mostra a composição média característica do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, com base na massa seca de bagaço.

Tabela 2.7 Composição média do bagaço de cana (PANDEY et al.,2000).

Composição química média	
Carbono	39,7 – 49 %
Oxigênio	40 – 46 %
Hidrogênio	5,5 – 7,4 %
Nitrogênio e cinzas	0 – 0,3 %
Propriedades físico-químicas	
Umidade	50 %
Fibra	46 %
Sólidos solúveis em água	2 %

Impurezas minerais	2 %
Composição média da fibra do bagaço	
Celulose	26,6 – 54,3 %
Hemicelulose	14,3 – 24,4 %
Lignina	22,7 – 29,7 %

2.6.1.2 Farelo de Trigo

As fibras alimentares podem ser divididas em duas categorias: fibra solúvel e fibra insolúvel, com base nas suas propriedades físicas (capacidade de retenção, absorção, adsorção de água, capacidade de troca catiônica e absorção de moléculas orgânicas) e funções fisiológicas. As fibras solúveis incluem pectinas, mucilagens, beta-glicanos e algumas hemiceluloses (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000).

O farelo de trigo representa o principal subproduto da moagem do trigo, constituindo-se de uma mistura heterogênea dos fragmentos dos grãos originada da camada hialina-aleurona da semente. As proteínas de melhor valor biológico, minerais e vitaminas estão concentradas no farelo, que se torna uma fonte muito rica desses nutrientes (DI LENA; PATRONI; QUAGLIA, 1997). Contudo, o valor nutritivo do farelo vai depender da sua disponibilidade e da digestibilidade de seus nutrientes. O teor de fibra alimentar total presente no farelo de trigo encontra-se em torno de 47,31%, e, desse total, o teor de fibra insolúvel cerca de 86% representam e 14% as fibras solúveis (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000)

O farelo de trigo é frequentemente utilizado como substrato para a fermentação em estado sólido visando à produção de insumos para a indústria de alimentos, devido à sua abundância. No entanto, as porções mais externas dos grãos são ricas em nutrientes como proteínas, lipídios, vitaminas e compostos funcionais, que são pouco utilizados na alimentação humana pela indisponibilidade biológica e características organolépticas pouco agradáveis. A composição centesimal dos farelos é condizente com a apresentada na Tabela 2.8, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de solo, da cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização dos mesmos.

Tabela 2.8 Composição do farelo de trigo desengordurado (SILVA et al.,2001).

Composição	Porcentagem (%)
Umidade	9,4

Proteína	13,8
Lipídio	5,2
Carboidrato	60,1
Cinza	6,3
Fibra	5,2

2.6.1.3 Farelo de Soja

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais, sendo sua produção destinada para a obtenção de óleo e farelo, pela indústria alimentícia (POLINUTRI, 2001). Está sendo utilizado também para o desenvolvimento de produtos não alimentares devido à sua quantidade abundante e baixo custo. Entende-se por farelo de soja o produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja, por processo mecânico e/ou químico. O conteúdo de proteína bruta na matéria seca oscila entre 42,5 a 55,6%, dependendo do método de extração de óleo e processamento (SILVA, 1995). O farelo de soja, nas mais diversas composições protéicas comerciais (44%, 46% e 48%) tem sido muito utilizado para alimentação animal (de uso para todas as espécies animais), sendo rico em proteínas como a tiamina, colina e niacina (POLINUTRI, 2001).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – (MAPA, 2009). A produção de grãos (soja, milho, trigo, arroz e feijão) deverá passar de 139,7 milhões de toneladas em 2007/08 para 180,0 milhões em 2018/19. Isso indica um acréscimo de 40,0 milhões de toneladas à produção atual do Brasil. A produção nacional de farelo de soja na safra de 2009/2010 está prevista para 26,3 milhões de toneladas (MAPA, 2009). A composição centesimal do farelo de soja está apresentada na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 Composição do farelo de soja desengordurado (MACIEL, 2006).

Composição	Porcentagem (%)
Umidade	10,2
Proteína	45
Lipídio	0,8
Carboidrato	32
Cinza	5,5
Fibra	6,5

2.6.1.4 Bagaço de Laranja

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que sua produção ultrapassa 80 milhões de toneladas/ano. A citricultura é uma das atividades agrícolas em grande destaque no país e segundo o MAPA (2009), estima-se a produção de 18,93 mil toneladas de laranja na safra 2009/2010. Em média, 34% da produção é transformada em suco, mas em grandes países produtores (Brasil e Estados Unidos), esta percentagem chega a 96%, o que gera grande quantidade de resíduos. Este material equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%⁵. Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos (ITAVO, 2000). A Tabela 2.10 ilustra a composição do bagaço de laranja.

Tabela 2.10 Composição do bagaço de laranja (MAMMA, et al.,2008).

Composição	Porcentagem (%)
Umidade	2,8
Proteína	8,6
Lipídio	3,9
Carboidrato	13,6
Cinza	1,7
Fibra	69,4

Algumas limitações fazem com que estes resíduos tenham uma utilização restrita, entre elas a grande quantidade de água que contêm o que acarreta problemas de coleta, transporte e armazenamento. Devido ao elevado custo de secagem, há interesse das empresas em desenvolver mercados para o bagaço cítrico úmido. Este interesse é maior, particularmente, para aquelas pequenas esmagadoras de laranja que produzem suco natural engarrafado ou para grandes empresas que não pretendem, em suas fábricas futuras, despende o alto investimento necessário à secagem do bagaço de laranja. Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos da laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos com atividade antioxidante e várias enzimas, incluindo pectinases e amilases (MAMMA et al., 2008). Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte

inutilizados. Diante dessas características e considerando a grande produção de laranja no país, o bagaço de laranja vem a ser um substrato em potencial para a utilização na FES.

Enfim, os avanços das pesquisas sobre celulasas ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos, e até os dias de hoje, contribuições científicas vêm sendo dadas continuamente, no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulasas, e ao estudo de diversos resíduos para aumentar a produção dessas enzimas e assim permitir a potencial utilização em escala industrial.

3 Materiais e Métodos

3.1 Isolamento

A etapa inicial deste projeto de mestrado foi consiste na prospecção de fungos filamentosos em solos da região Amazônica. As coletas foram realizadas em regiões determinadas aleatoriamente com o apoio da equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, localizada na cidade de Belém – PA, sob a coordenação da Dra. Célia Regina Tremacoldi. O isolamento e a obtenção das culturas foram realizados na Embrapa Amazônia Oriental e os demais experimentos foram realizados no Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação em São Carlos – SP.

3.1.1 Determinação da área de coleta

As coletas do presente estudo foram feitas dentro da reserva de Floresta Amazônica nativa da EMBRAPA, localizada na unidade da Embrapa Amazônia Oriental em Belém, no estado do Pará. As posições das áreas de coleta foram determinadas pelas coordenadas geográficas centrais 1) $48^{\circ}26'39,62''$ W e $01^{\circ}26'8,51''$ S; 2) $48^{\circ}26'43,1''$ W e $01^{\circ}26'13,27''$ S; 3) $48^{\circ}25'6,38''$ W e $01^{\circ}26'8,51''$ S; 4) $48^{\circ}24'50,46''$ W e $01^{\circ}25'54,67''$ S (Figuras 3.1). Foram realizadas também coletas na reserva de Floresta Amazônica nativa da Fazenda Sococo a qual está localizada nas margens da rodovia PA-252, km 38, que liga o município de Moju à cidade do Acará, entre os rios Moju e Acará, nas coordenadas geográficas 5) $02^{\circ}07'00''$ S e 48° de longitude W, distando 1.600 km da cidade de Belém (Figura 3.2). Foram demarcadas 7 áreas distintas aleatoriamente selecionadas e 50 pontos diferentes. A distribuição da quantidade de pontos de coleta foi realizada de maneira irregular entre as áreas coletadas. As áreas foram identificadas pelas letras C, B, M, E, Q, e V, sendo as áreas C e B correspondentes a pontos localizados no interior da Fazenda Sococo.

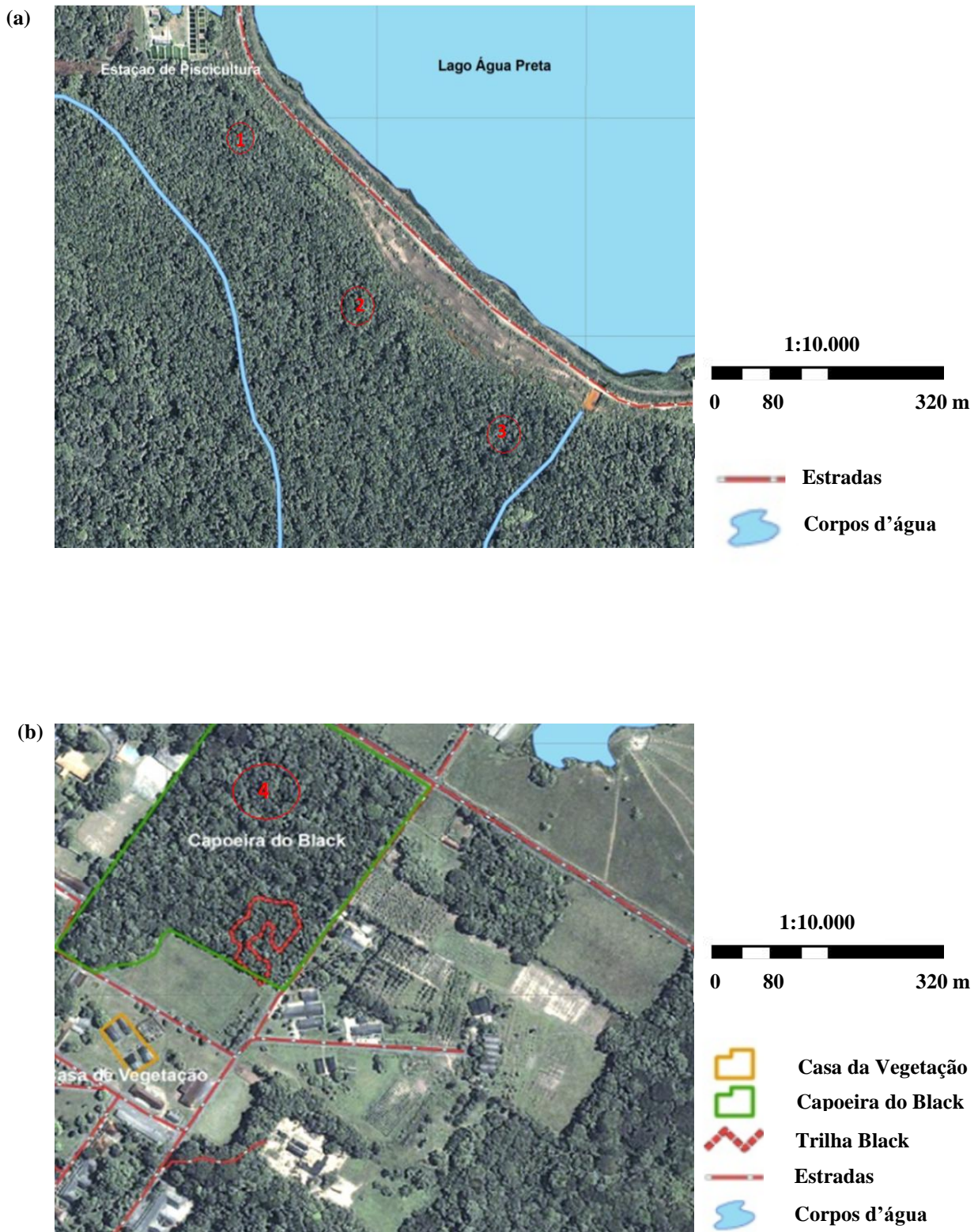


Figura 3.1 Visão parcial das áreas de coleta dentro da reserva de floresta amazônica da unidade da Embrapa Amazônia Oriental em Belém (PA) determinadas pelas coordenadas geográficas centrais em (a)(1) $48^{\circ}26'39,62''W$ e $01^{\circ}26'8,51''S$; (2) $48^{\circ}26'43,1W$ e $01^{\circ}26'13,27''S$; (3) $48^{\circ}25'6,38''W$ e $01^{\circ}26'8,51''S$; (4) $48^{\circ}24'50,46''W$ e $01^{\circ}25'54,67S$ e em (b)(5) $48^{\circ}24'50,46''W$ e $01^{\circ}25'54,67S$. Essas são imagens de satélite fornecidas pelo Laboratório de Sensoriamento Remoto da Embrapa Amazônia Oriental.

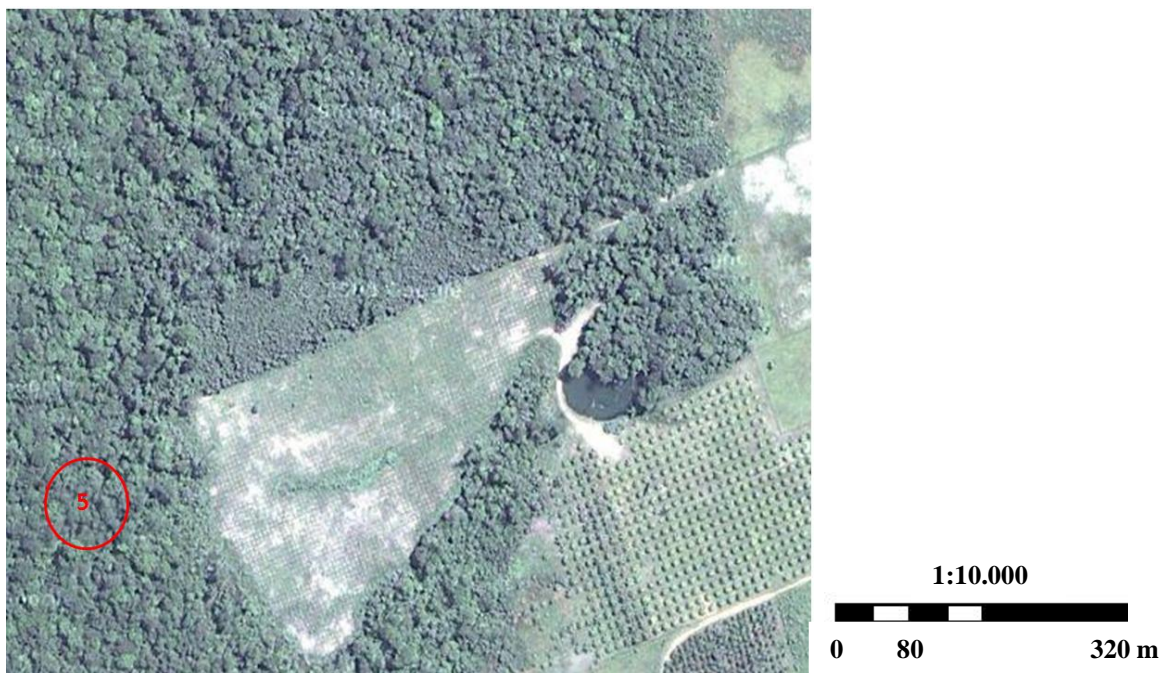


Figura 3.2 Visão parcial das áreas de coleta dentro da reserva de floresta amazônica da Fazenda Sococo que está localizada nas margens da rodovia PA-252, km 38 que liga o município de Moju à cidade do Acará (PA) nas coordenadas geográficas 5) 02° 07'00" S e 48° de longitude W. Essa é uma imagem de satélite fornecida pelo Laboratório de Sensoriamento Remoto da Embrapa Amazônia Oriental.

3.1.2 Meio de cultivo para obtenção dos isolados

Foi utilizado o caldo nutriente conforme descrito por Mandels e Sternberg (1976) com pequena modificação: 1 % glicose; 0,14 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20 % de KH_2PO_4 ; 0,03% de CaCl_2 ; 0,02 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,50% de peptona; 0,20 % de extrato de levedura, 0,03 % de uréia; 0,10 % de Tween 80; 0,10 % de elementos traços (5mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg/L CoCl_2) e 0,4 % de cloranfenicol e ampicilina 500 mg.

3.1.3 Isolamento e seleção dos microrganismos

Para o isolamento e seleção dos microrganismos foi seguido o procedimento de Da Silva (1992). Aproximadamente 0,5 g de amostra do material (solo) foram transferidos diretamente para tubos contendo 4 ml de caldo nutriente (seção 3.1.2). No laboratório, após 48 horas de incubação a 35 °C em estufa com demanda de oxigênio (BOD) as amostras foram transferidas, por meio de estrias, para placas de Petri em meio PDA (*Potato Dextrose Ágar*) e

também em placas de Petri contendo meio mínimo de Ágar (30,0 g/L) Todas as amostras foram incubadas a 35 °C por sete dias ou até esporulação.

Após surgirem as colônias dos fungos, as mesmas foram isoladas com base no aspecto do micélio, cor dos esporos e em outras características do anverso e reverso das colônias. Estas colônias foram isoladas, pelo método de estrias até a obtenção de culturas puras. Para análise das hifas, corpos de frutificação, esporos e outras características, foram feitos exames microscópicos.

3.1.4 Meio para manutenção celular

A manutenção rotineira dos fungos no laboratório de Agroenergia – Embrapa Instrumentação Agropecuária foi realizada por meio de repiques periódicos (em média a cada quatro meses) em placas de Petri e em tubos de ensaio estéreis contendo meio PDA mantidas em temperatura ambiente, e fina camada de óleo mineral estéril. Para manutenção prolongada foi feita uma suspensão de esporos em solução salina estéril (NaCl 9 g/L + 20 % de glicerol). Uma alíquota dessa suspensão de esporos foi armazenada em tubo criogênico em freezer a – 80°C. Para fazer a reativação dos esporos depois do armazenamento os mesmos foram plaqueados em meio PDA e incubados em BOD a 35 °C até completa esporulação.

3.1.5 Meio de seleção das linhagens celulolíticas

Os isolados foram selecionados para produção de celulases. Para fazer o *screening* de seleção, os fungos foram incubados em meio nutriente sólido contendo somente celulose cristalina (Avicel, Sigma, EUA) como fonte de carbono (3,0g/L NaNO₃; 0,5g/L MgSO₄; 0,5g/L KCl; 0,01 FeSO₄ . 7H₂O; 1,0g/L KH₂PO₄; 5,0 g/L avicel; 30,0 g/L ágar) e paralelamente os fungos também foram repicados em meio nutriente sem a presença da Avicel somente com ágar para verificar que o crescimento não foi favorecido pelo ágar. A Figura 3.3 mostra o crescimento de uma das linhagens obtidas em Avicel e em ágar.

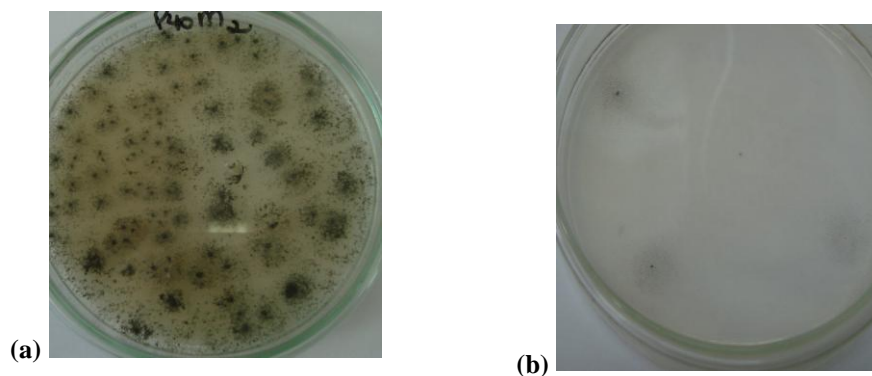


Figura 3.3 Crescimento de um dos isolados fúngicos P40M2 em (a) Avicel (celulose cristalinas) e (b) Ágar.

3.1.6 Identificação das linhagens

Em nosso laboratório foram realizados os testes preliminares para identificação das linhagens selecionadas. Foram feitos exames morfológicos das culturas e microcultivo em lâmina para exame de corpo de frutificação (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; COLLINS; LYNE, 1989). Pretendeu-se chegar até a identificação do gênero, quando possível, por estes métodos. Para identificação em nível de espécie e de gêneros menos comuns, recorreremos ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências de Rio Claro sob supervisão do Taxonomista Andre Rodrigues.

3.2 Fermentação

3.2.1 Substratos para fermentação

Para a fermentação em estado sólido foi utilizado como substrato o meio nutriente líquido descrito no item 4.1.2. sem adição de glicose como fonte de carbono. Para compor a fonte de carbono foram usados resíduos agrícolas. Foi escolhido o farelo de trigo (FT) para selecionar a cepa melhor produtora de celulases, pois observando os substratos utilizados por alguns autores, verifica-se alta produtividade em substrato farelo de trigo (RIDDEN; NOKES; KNUTSON, 1999; GESSESSE; MENO 1999; SILVA et al., 2005). Esse material apresenta-se como fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso, sendo, portanto considerado na literatura como o substrato ideal.

Para avaliar a produção de celulasas dos fungos selecionados foram utilizados os seguintes resíduos agrícolas:

- 100% farelo de trigo (FT);
- 100% bagaço de cana-de-açúcar explodido (BCE);
- 100% bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BC);
- 100% bagaço de laranja industrializado (BL);
- 100% farelo de soja (FS);
- 50% bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 50% farelo de trigo (BC + FT);
- 50% bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 50% bagaço de laranja industrializado.

Foi utilizado bagaço de cana explodido, pois o pré-tratamento é essencial para reduzir a recalcitrância da fibra e aumentar a produtividade enzimática nos substratos. Todos os substratos avaliados foram lavados com água corrente e secos em estufa a 65°C. O bagaço de cana e o bagaço de laranja foram peneirados usando peneira granulométrica *Granutest* de aço-inox para seleção de partículas de 0,1 entre 0,5 mm.

3.2.2 Determinação da umidade nos substratos

Para aperfeiçoar e aumentar a produção de enzimas foram avaliados diferentes resíduos agrícolas e agroindustriais em diferentes porcentagens de umidade. Para a determinação da umidade levou-se uma alíquota de 100 g do substrato à estufa (65 °C ± 5,0 °C) até massa constante (cerca de 72 horas). A umidade inicial utilizada foi de 60%. Foram avaliadas também umidade de 50, 60, 70 e 80 %. Para o cálculo de massa de líquido a ser adicionada para o ajuste da umidade inicial, a seguinte equação foi utilizada:

$$mH_2O = \frac{ms(x_2 - x_1)}{1 - x_2} \quad (3.1)$$

onde, mH_2O é massa de líquido nutriente a ser adicionada (seção 3.1.2.), ms é a massa do substrato seco, x_1 é a porcentagem inicial de umidade do substrato e x_2 é a porcentagem final de umidade desejada.

3.2.3 Processos fermentativos

Foram feitos testes para a verificação da produção de endoglucanase (CMCase) em fermentação em meio sólido contendo meio de Mandels e Sternberg (1976) e farelo de trigo em 60% de umidade como fonte de carbono. O tempo de incubação foi fixado em 10 dias. A FES ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 ml utilizando-se 5 g de substrato. Depois da fermentação de seleção dos fungos melhores produtores de celulasas, estes foram fermentados em diversos substratos os quais estão citados na seção 3.2.1 em diferentes porcentagens de umidade que dependeu do tipo de cada substrato avaliado.

Os isolados foram crescidos no meio de manutenção (seção 3.1.4) por sete dias. Após crescimento fúngico os esporos foram ressuspensos em solução salina estéril (NaCl 9 g/L + Tween 80 0,1%) utilizando alça de platina. Uma alíquota foi retirada e utilizada para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Para inoculação nos substratos avaliados adicionou-se o volume da suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/ml. O cultivo ocorreu a 35° C, durante 10 dias para a seleção da melhor linhagem celulolítica e depois durante 5 dias para os melhores produtores selecionados. A cada 24 horas do período avaliado foi tomado um Erlenmeyer no qual foram adicionados 100 ml de tampão citrato de sódio pH 5,0 e 50 mM para realizar a extração enzimática. O material foi então filtrado a vácuo utilizando-se papel Whatman nº 1 e centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos, a 10°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Para a realização das atividades enzimáticas foi utilizado o sobrenadante imediatamente após a extração e depois os extratos enzimáticos foram estocados em freezer a -4 °C. Todos os testes de fermentação foram feitos com duas repetições.

3.3 Determinações quantitativas

Para as quantificações enzimáticas descritas a seguir as atividades foram expressas em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g de matéria seca). Uma unidade atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

3.3.1 Atividade de FPase e endoglucase (CMCase)

A IUPAC recomenda a utilização de papel de filtro Whatman nº 1 como substrato ideal para a determinação da atividade celulásica total (FPase). O método foi realizado segundo Ghose (1987). A quantificação da atividade FPase foi realizada incubando-se 500 µL de extrato enzimático com 1 tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1 x 6 cm (cerca de 50 mg) e 1 ml de tampão citrato de sódio pH 5,0 a 50 °C por 1 hora. Transcorrido o tempo reacional, adicionou-se 3 ml de reagente de DNS seguindo as seguintes concentrações (10,6 g ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,8 g NaOH; 306,0 g tartarato duplo de sódio e potássio; 7,6 mL Fenol; 8,3 g Metabissulfito de sódio e 1416 mL de água destilada) (MILLER, 1959) de forma a parar a reação enzimática e os tubos foram incubados a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 ml de água e as soluções contidas nos tubos foram homogeneizadas por inversão. Por fim, as absorbâncias a 540 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. De acordo com este método, o DNS sofre redução de um dos seus grupos nitro ao reagir com os carboidratos, formando um composto que apresenta forte absorção a 540 nm (Figura 3.4).

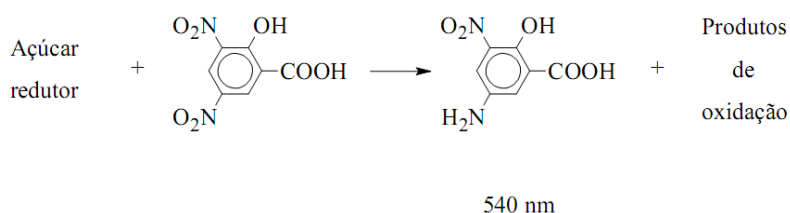


Figura 3.4 Reação de açúcares redutores pelo método de DNS.

A reação envolvida no desenvolvimento da coloração medida em espectrofotômetro acontece devido a capacidade de aldoses e cetoses com hidroxilas heterosídicas livres em reduzir uma solução alcalina de 3,5-dinitrosalicílico que é um composto de coloração alaranjada (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

A IUPAC recomenda a utilização da carboximetilcelulose de viscosidade média (CMC) como substrato ideal para a determinação da atividade de endoglucanase e sugere a hidroximetilcelulose (HEC) como substrato alternativo para este mesmo objetivo. A quantificação da atividade endoglucanásica foi realizada incubando-se 100 µL de extrato enzimático com 900 µL de solução de 4 % CMC (carboximetilcelulose, Sigma Co) em

tampão citrato 50 mM e pH 5,0 por 30 minutos a 50 °C. Em seguida, foram adicionados 1 ml de reagente de DNS e os tubos foram incubados por 5 min. a 100 °C. Por fim, adicionou-se 8,0 ml de água destilada e as absorvâncias das soluções a 540 nm foram registradas.

$$FPU / ml = \frac{ART(mg / ml) \cdot E_{dil} \cdot V_t(ml)}{Tempo(min) \cdot 1\mu mol \text{ glicose } (0,18mg) \cdot V_E(ml)} \quad (3.2)$$

$$CMC / ml = \frac{ART(mg / ml) \cdot E_{dil} \cdot V_t(ml)}{Tempo (min) \cdot 1\mu mol \text{ glicose } (0,18mg) \cdot V_E(ml)} \quad (3.2)$$

3.3.2 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pelo mesmo procedimento para a atividade de endoglucanase, mas como substrato foi utilizado uma solução 0,5 % de xilana *Birchwood* (Sigma, EUA). As absorvâncias foram registradas a 540 nm. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando a curva padrão de xilose.

3.3.3 Atividade β -glicosidásica

Para a determinação da atividade β -glicosidásica, 50 μ L de extrato enzimático foram incubados com 50 μ L de solução de celobiose (Sigma, EUA) por 30 min. a 50°C. Após o tempo reacional de 30 minutos os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 10 minutos, de forma a promover a inativação das enzimas. Em seguida, adicionou-se 1 ml de reativo enzimático para dosagem de glicose (kit enzimático Laborlab, Brasil) e os tubos foram novamente incubados, desta vez a 37 °C por 15 minutos. Finalmente, foi adicionado 1 ml de água destilada e as soluções tiveram suas absorvâncias a 505 nm registradas. Cada análise foi realizada em triplicata. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância com a quantidade de produto formado foi obtida utilizando-se soluções de glicose com concentrações na faixa de 0,55 a 3,6 mM. Neste caso, a reação enzimática em celobiose não se processou: 100 μ L de solução padrão foram incubados com 1 mL de reativo e as etapas seguintes foram conduzidas da mesma forma que para as amostras.

3.4 Caracterização dos extratos enzimáticos

A etapa de caracterização dos extratos enzimáticos foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Universidade de São Paulo, no Instituto de Física de São Carlos (IFSMC) sob coordenação do Prof Dr. Igor Polikarpov.

3.4.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura ótima

Para determinação da temperatura ótima das atividades enzimáticas de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase, e FPase os extratos obtidos armazenados em freezer a -20°C foram incubadas em 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C , sendo que o tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,0 foi utilizado para todas. A influência de diferentes tampões nas atividades de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase, e FPase foram testadas nas condições de temperaturas ótimas determinadas experimentalmente para os extratos enzimáticos do melhor produtor. Foram utilizados os tampões citrato, acetato e tris, em diferentes faixas de pH, de acordo com o poder tamponante de cada solução (acetato-NaOH (pH 3,0 a 5,0), citrato-NaOH (pH 5,5 a 6,5), tris-HCl (pH 7,0 a 8,0) e glicina-NaOH (pH 9,0 a 10,0)). As determinações enzimáticas foram realizadas segundo as metodologias padrão (Seção 3.3).

3.4.2 Avaliação da estabilidade térmica

Para a avaliação da influência da temperatura na atuação das endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e FPase os extratos enzimáticos obtidos foram incubados em 60°C . A escolha da temperatura foi para verificação de extrato enzimático termoestável. A atividade de atuação de cada enzima foi avaliada durante uma hora. Para essas avaliações, alíquotas de 5 mL de cada extrato enzimático foram retiradas a cada 5 minutos e estocadas a -4°C até a análise. As quantificações de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e FPase foram realizadas segundo as metodologias padrão (Seção 3.3).

3.4.3 Zimograma

Para revelação específica das enzimas com atividade de endoglucanase, xilanase e β -glicosidase o gel de poliacrilamida de sulfato de sódio SDS-PAGE 10 % foi preparado. Para revelação específica de celulasas com atividade de endoglucanase, foi adicionado à

composição do gel de poliacrilamida, CMC 0,2 % e após eletroforese que ocorreu em câmara fria a 4 °C, com corrente de 20 mA/gel o gel foi lavado em 0,1% de Triton por cerca de 30 minutos em temperatura ambiente e depois levado ao banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Em tampão citrato de sódio pH 5,0 e 50 mM. Em seguida, foi corado com solução vermelho de Congo 0,1 % por 15 minutos e lavado com solução de NaCl 1 M. Para revelação da atividade de xilanase foi feito o mesmo procedimento sendo a xilana o substrato adicionado ao gel de poliacrilamida. A revelação de β -glicosidases foi realizada com 0,1 % Esculim (6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside) e 0,03 % cloreto férrico (KWON et al., 1994) sendo que o gel utilizado foi o mesmo confeccionado para a revelação do extrato protéico SDS-PAGE a 15 %.

4 Resultado e Discussão

4.1 Isolamento, seleção e identificação

Foram isoladas 110 linhagens fúngicas. A Tabela 4.1 mostra as áreas e o número de microrganismos isolados em cada ponto. Os fungos obtidos encontram-se em fase de identificação, mas dados preliminares mostram que alguns fungos isolados pertencem aos grupos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Mucor*.

Tabela 4.1 Amostra das coletas na Floresta Amazônica dentro da reserva da Embrapa Amazônia Oriental e da Fazenda Sococo no estado do Pará. Foram demarcadas 7 áreas distintas identificadas pelas letras C, B, M, E, Q, e V e 50 pontos diferentes amostrados de maneira irregular entre as áreas coletadas. O período de coletas foi feito entre dos dias 21 e 30 de julho de 2009.

Área de coleta	Pontos	Número de isolados	Data da coleta
B	5	13	21/07/2009
C	7	14	21/07/2009
M	4	09	22/07/2009
E	3	02	22/07/2009
P	5	11	23/07/2009
Q	4	13	23/07/2009
P	15	41	28/07/2009
V	7	07	30/07/2009

Na literatura são encontrados poucos trabalhos sobre o isolamento de fungos na região Amazônica. Considerando o número de amostras tomadas pode-se considerar alto o número de isolados. Em 100 amostras foram isolados 110 fungos. Amostragens nesses mesmos ambientes para isolamento de bactérias, realizadas por Rabalho (2002), levaram a uma média de 8 colônias bacterianas, morfológicamente diferentes, isoladas por amostra coletada. Souza e colaboradores (2008) coletaram 60 exemplares de fungos dentro da mata nativa do minicampus universitário da Universidade Federal do Amazonas, da classe Basidiomycetes das ordens *Ágaricales*, *Aphyllphorales*, *Auriculariales* e *Tremellales* para

produção de celulases, amilases e proteases. Araújo et al., 2008 isolaram 563 fungos filamentosos diferentes coletados na Reserva da Universidade Federal do Amazonas pertencentes aos grupos: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Xylaria* para produção de enzimas.

Das 110 linhagens obtidas, 46 obtiveram um ótimo crescimento em avicel. Uma vez que as linhagens isoladas foram capazes de crescer em meio com avicel como única fonte de carbono, considera-se que as mesmas sejam produtoras de celulases. Destas 46 linhagens, 10 linhagens de fungos codificados por P27C3, P45C3, P47C3 e P40M2 (*Aspergillus* sp.), P12M3, P28P11, P49P11 e P34P9 (*Trichoderma* sp.) P50B2 (*Penicillium* sp.) e P21P18 (*Mucor* sp.). que mostraram um crescimento mais expressivo em placas contendo avicel, foram selecionadas para avaliação de produção de celulase em FES usando farelo de trigo como substrato.

4.2 Avaliação da produção de celulases pelas linhagens selecionadas em FES utilizando farelo de trigo como substrato

Todas as 10 linhagens selecionadas foram capazes de produzir CMCase como mostra a Figura 4.1.

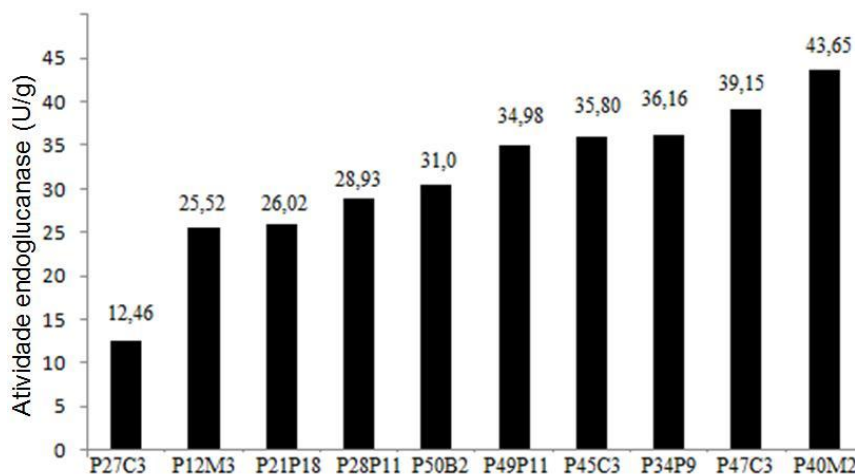


Figura 4.1 Produção de celulases por 10 linhagens selecionadas em FES utilizando farelo de trigo como substrato, sendo P27C3, P45C3, P47C3 e P40M2 (*Aspergillus* sp.), P12M3, P28P11, P49P11 e P34P9 (*Trichoderma* sp.) P50B2 (*Penicillium*) e P21P18 (*Mucor* sp.).

As maiores produções da enzima em FES foram obtidas pelas linhagens P40M2 (43,65 U/g) que posteriormente foi identificada como *Aspergillus fumigatus*, P47C3 (39,15

U/g), que foi identificada como *A. niger* e P34P9 (36, 16 U/g) identificada como *Trichoderma harzianum*.

Na literatura os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são tidos como principais produtores de celulases. Tsao et al. (2000) estudaram a produção de CMCase por FES de farelo de trigo e sabugo de milho depois de realizarem um *screening* com 7 linhagens de fungos do gênero *Aspergillus*, otimizaram a produção pela melhor linhagem (*A. niger* NRRL3), obtendo 215 U/g. Ruegger; Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram a capacidade celulolítica de 80 linhagens de fungos isolados do solo de uma estação ecológica em São Paulo, de todas as linhagens, a que apresentou a maior produção, foi a identificada como *Trichoderma harzianum* II. Castro (2006) verificou que em FES utilizando papel de filtro como única fonte de carbono os fungos que apresentaram atividades de endoglucanase bastante destacadas das obtidas pelas demais linhagens estudadas foram *A. niger* ATCC 16404 (14,0 U/g) e *T. harzianum* IOC 4042 que produziu em seu máximo apenas 0,6 U/g. Li et al. 2004 obtiveram 287,3 U/g de endoglucanase pelo fungo *T. harzianum* F244 em FES utilizando farelo de trigo como substrato. Soni et al. (2010) obtiveram a produção de 20,0 U/g de endoglucanase em FES utilizando farelo de trigo como substrato por *A. fumigatus* isolado de fonte de papel em decomposição. Já um estudo feito por Gao et al. (2008) com o mesmo fungo mostrou a produção de 563 U/ g de endoglucanase em FES utilizando sabugo de milho como substrato.

A diferença nos valores de atividade de endoglucanase apresentadas por diferentes autores pode estar relacionada à linhagem avaliada, bem como a diferença na metodologia das análises. Microrganismos de mesmo gênero ou espécie podem expressar proteínas em quantidades maiores ou menores dependendo do seu metabolismo e da sua necessidade nutricional em seu *habitat*. Outros fatores como pH e temperatura otimizadas podem influenciar a indução de atividade enzimática. O meio nutricional quando otimizado também é um forte contribuinte para o aumento de atividade enzimática. Chen e Qiu, (2010) reportaram que a indução da produção de celulases é fortemente afetada pelas concentrações de carbono e nitrogênio. Muitos microrganismos requerem quantidades diferentes de carbono e nitrogênio para indução de celulases (SAKUMARAN et al., 2009). Portanto, a análise dos dados de produção de endoglucanase apresentada na Figura 7, deve ser feita considerando que os parâmetros fermentativos foram fixados e, portanto, as condições de fermentação podem não ter sido as mais adequadas para algumas linhagens. Ainda que, as atividades das enzimas

foram determinadas em condições únicas de pH, temperatura e tipo de substrato o que pode ter resultado em atividades sub-estimadas.

As linhagens P45C3 (38,8 U/g) e P49P11 (34,98 U/g) identificadas como *Aspergillus sp* e P50B2 (31,0 U/g) identificada como *Penicillium sp* também produziram considerada atividade de endoglucanase, como mostra a Figura 9. O gênero *Penicillium* tem sido reportado por ser um excelente produtor de celulases e por isso, tem sido constantemente utilizado como fonte de enzimas em vários setores industriais (PANDEY et al., 1999; DILLON et al., 2006; ADSUL et al., 2007; CAMASSOLA; DILLON, 2007; MARTINS et al., 2008).

De acordo com os resultados mostrados na Figura 4.1 as linhagens fúngicas *A. fumigatus* P40M2 (Figura 4.2a) e *A. niger* P47C3, (Figura 4.2b) foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho em FES como processo fermentativo em diversos resíduos agrícolas, considerando a maior produção de celulases obtidas pelas mesmas.

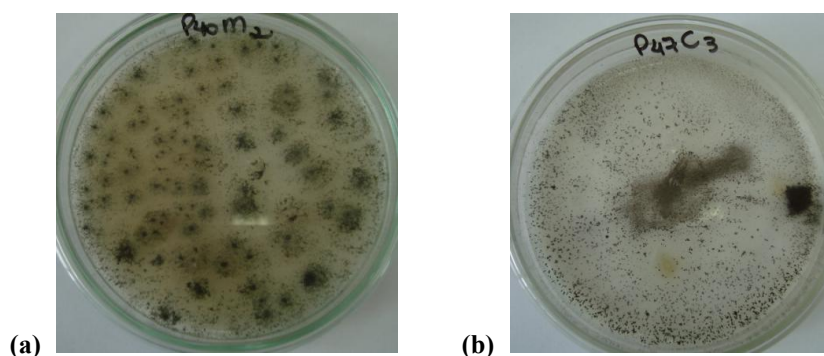


Figura 4.2 (a) *Aspergillus fumigatus* em meio contendo avicel como fonte de carbono. (b) *A. niger* em meio contendo avicel como fonte de carbono.

4.3 Produção de endoglucanases em diferentes resíduos agrícolas

4.3.1 Farelo de trigo

Observa-se pela Figura 4.3 o pico de produção da enzima endoglucanase em FT em 50, 60 e 70 % de umidade. O fungo melhor produtor da enzima foi o *A. niger* (em azul) com valor máximo de 78,3 U/g em 50 % de umidade, o fungo *A. fumigatus* (em verde) teve uma produção relativamente menor com valor máximo de 56,6 U/g.

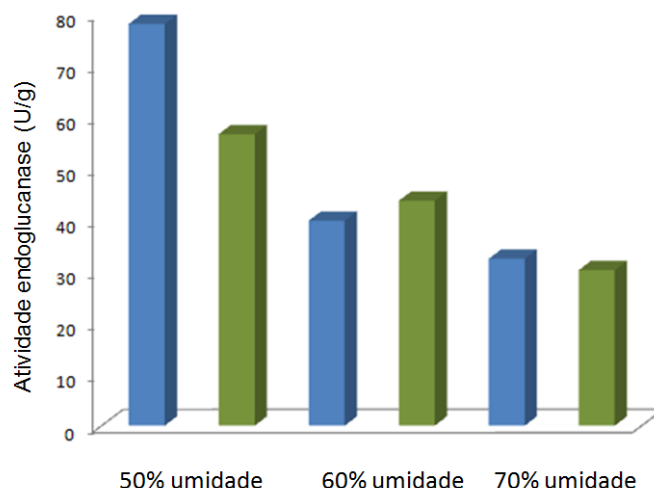


Figura 4.3 Atividade máxima de endoglucanase pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus* em farelo de trigo 50, 60 e 70 % de umidade.

Para ambas as linhagens a melhor produção enzimática ocorreu quando utilizou o substrato em 50 % de umidade. Pode-se observar também que conforme aumentou a umidade o pico de atividade foi menor, sendo em 70 % aproximadamente 30,0 U/g de endoglucanase para ambas as linhagens. Em 60 % de umidade a produção ficou entre os valores máximos e a mínimos obtidos, sendo 39,8 e 43,0 U/g os picos de produção de endoglucanase para os fungos *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente. O nível de umidade na FES pode influenciar a biossíntese e liberação das enzimas, se a umidade for elevada deixando água livre no substrato esta pode reduzir a porosidade de alguns substratos e limitar a transferência de oxigênio. Por outro lado, valor baixo de umidade causaria a redução da solubilidade dos nutrientes do substrato (PANDEY et al., 2000; ELLAIAH et al., 2002). Desta forma, estudos de otimização deste parâmetro são bastante relevantes em FES. Pelo resultado pode-se inferir que a porcentagem ótima para produção de CMCases está relacionada com a umidade escolhida para a fermentação, bem como, a linhagem de fungo.

4.3.2 Farelo de soja

O pico de atividade de endoglucanase pelas linhagens selecionadas em farelo de soja (FSM) foi muito maior quando comparado com o farelo de trigo. Em FS o fungo melhor produtor de CMCases foi o fungo *A. fumigatus* com a produção de 265,0 U/g quando incubado em 60 % de umidade, enquanto o fungo *A. niger* obteve a maior atividade (152,0 U/g)

utilizando 50 % de umidade (Figura 4.4). As linhagens de *Aspergillus* avaliadas obtiveram resultados de atividades diferentes em relação à umidade.

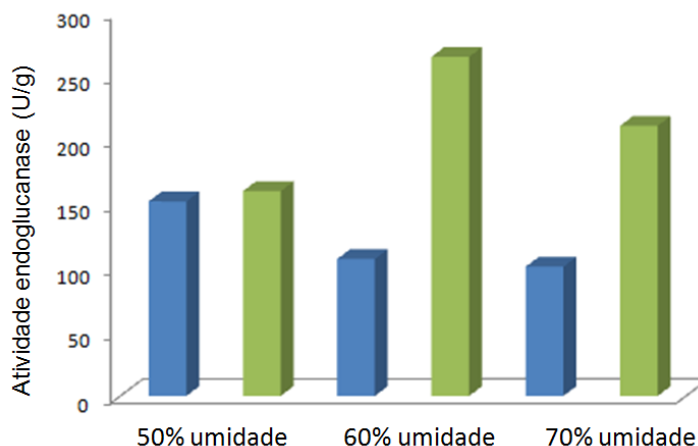


Figura 4.4 Atividade máxima de endoglucanase pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus* em farelo de soja 50, 60 e 70% de umidade.

O fungo *A. fumigatus* obteve maior atividade quando a fermentação ocorreu em umidade maior (60 e 70 %), ao contrário da linhagem de *A. niger* que obteve atividade de endoglucanase maior quando foi incubado em 50 % de umidade. Por esses resultados pode-se inferir que a umidade exerce uma ação ligada ao metabolismo do microrganismo induzindo ou inibindo a produção da enzima.

A porcentagem de umidade ótima para produção de CMCases em FS está relacionada com o tipo de substrato escolhido para a fermentação, bem como, a linhagem de fungo.

4.3.3 Bagaço de laranja

A produção de endoglucanase em fermentação usando BL não foi muito elevada quando comparada com a produção da enzima em FT e FS. A Figura 4.5 mostra a influência da umidade na produção de endoglucanase e os picos de atividade enzimática obtidos. A maior produção da enzima foi utilizando 70 % de umidade para ambos os fungos, sendo o pico de produção de aproximadamente 40 U/g para ambas as linhagens avaliadas. Pode-se observar também que a umidade teve maior influência na produção de endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus* com os picos de atividade de 18,42 U/g em 50 %, 25,78 U/g em 60 % e

39,0 U/g em 70 % de umidade. Portanto, podemos inferir que para este substrato a umidade induziu a produção de endoglucanase.

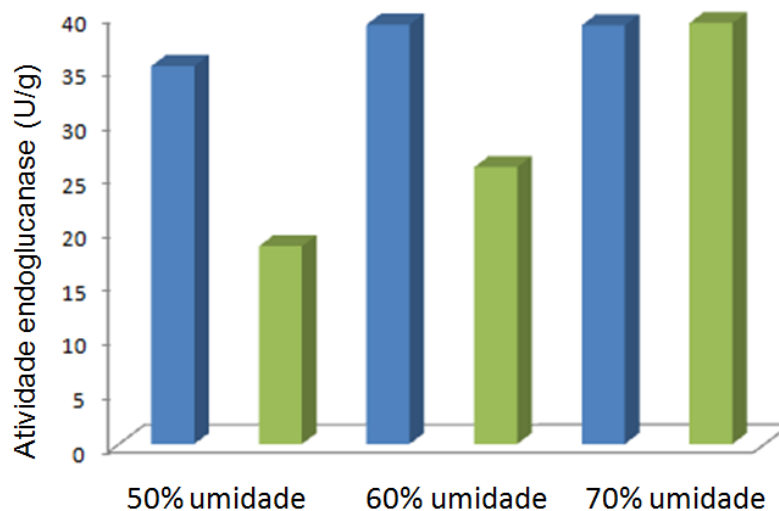


Figura 4.5 Atividade máxima de endoglucanase pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus* em bagaço de laranja 50, 60 e 70% de umidade.

Já a produção de endoglucanase obtida em BL pelo fungo *A. niger* não foi significativamente influenciada pela umidade, conforme mostra a Figura 17. Em 50 % de umidade o fungo *A. niger* obteve o pico de atividade da enzima foi de 35,2 U/g quando a umidade foi aumentada para 60 e 70 %, os valores máximos de atividade foram aproximadamente de 40,0 U/g.

Como dito anteriormente a atividade de endoglucanase em fermentação usando BL não foi muito significativa quando comparada com a produção da mesma enzima em FT e FS, porém foi capaz de proporcionar uma produção significativa (em torno de 40,0 U/g) para ambas as linhagens estudadas quando comparada com FES por outros autores. Mamma et al. (2008) utilizando o fungo *A. niger* obteve 60,5 U/g de CMCase em FES utilizando bagaço de laranja com 90% de umidade. A diferença de atividade observada na comparação com o estudo de Mamma e colaboradores (2008) pode estar relacionada à umidade avaliada, bem como o tamanho das partículas de substrato e também ao meio nutriente usado pelos autores.

4.3.4 Bagaço de cana

Para tentar aperfeiçoar a produção de endoglucanase os substratos BCE e BC foram testados em FES utilizando 70 e 80 % de umidade. As umidades fixadas para avaliação foram

escolhidas para que o substrato não ficasse seco e que também não acumulasse água livre no meio reacional. A Figura 4.6a mostra os picos de produção das linhagens *A. niger* e *A. fumigatus* em BCE e a Figura 4.6b mostra os picos de produção das linhagens *A. niger* e *A. fumigatus* em BC.

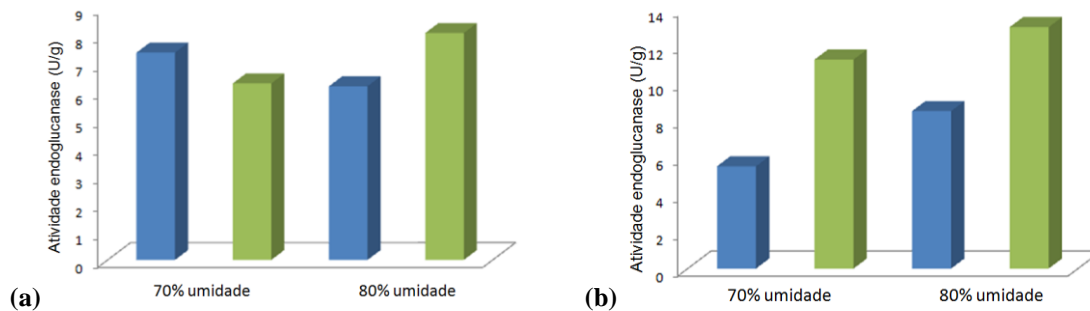


Figura 4.6 (a) mostra os picos de produção das linhagens *A. niger* (■) e *A. fumigatus* (■) em bagaço de cana explodido (BCE) e a figura (b) mostra os picos de produção das linhagens *A. niger* (■) e *A. fumigatus* (■) em bagaço de cana in natura (BC).

Observa-se pela Figura 4.6 que a produção enzimática foi maior em BC, sendo a pico de atividade enzimática obtida pela linhagem de *A. fumigatus* em 80 % de umidade com valor de aproximadamente 14 U/g. O pico de produção por este fungo foi ligeiramente menor quando utilizou-se BCE, com valor de 8,1 U/g também em 80 % de umidade. Esperava-se que o pré-tratamento fosse melhor para a produção de endoglucanase, porém neste trabalho não foi o ocorrido, tal fato pode ser inferido devido a açúcares redutores (monossacarídeos, ex: glicose) no substrato que não foram eliminados com a lavagem, inibindo a produção de endoglucanase pelos fungos.

Em ambos os substratos e para ambos os fungos a umidade também não influenciou muito a produção da enzima como mostra a Figura 4.6. Em BCE utilizando como agente da fermentação o fungo *A. niger* em 70 % de umidade o pico de produção foi de 5,52 e em 80 % foi de 8,5 U/g, já para o fungo *A. fumigatus* a produção de endoglucanase foi de 11,28 e 13,0 U/g em 70 e 80% de umidade, respectivamente. Em relação a influencia da umidade em BC os picos de produção também não aumentaram significativamente com o aumento da umidade. Em 70 % de umidade o pico de produção para a linhagem de *A. niger* foi de 7,4 U/g, e em 80% foi de 6,2 U/g. O fungo *A. fumigatus* obteve em 70% de umidade atividade máxima de 6,3 U/g e em 80 % o pico de atividade foi de 8,1 U/g.

4.3.5 Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)

Em relação ao substrato (BC+FT) a umidade influenciou a produção de endoglucanase a qual mostrou uma tendência de aumento com o aumento da porcentagem de umidade, o que pode ser visualizado na Figura 4.7. Ao contrário do observado quando foi utilizado apenas o farelo de trigo como mostrado na Figura 4.7.

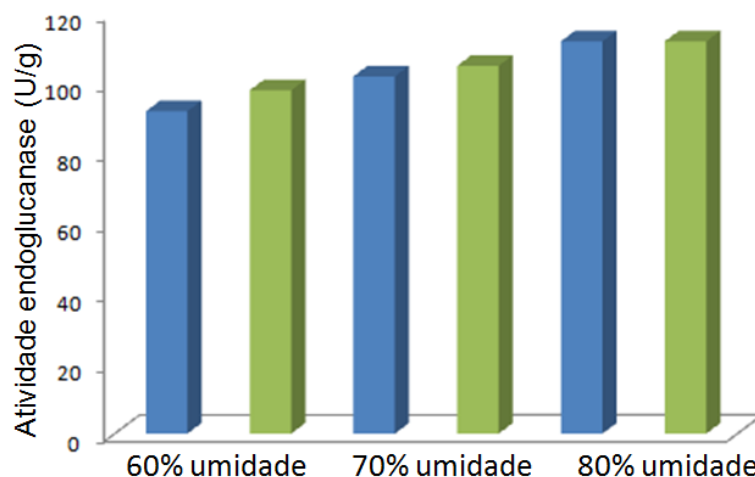


Figura 4.7 Picos de produção das linhagens *A. niger* (■) e *A. fumigatus* (■) em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1).

As linhagens de *Aspergillus* tiveram comportamento semelhante em relação ao pico de atividade enzimática e a umidade. A melhor produção da enzima ocorreu quando utilizou 80% de umidade para ambas as linhagens, com o valor de 112,0 U/g. Em 60 % de umidade o pico de atividade foi menor, com valor de 92, 0 e 98, 0 U/g para o fungo *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente. Em 70 % o pico de atividade da enzima teve um pequeno aumento com valores de 102,0 e 105, 0 U/g para os fungos *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente.

Pode-se observar que quando foi adicionado farelo de trigo ao bagaço de cana a atividade enzimática foi maior quando comparado com a FES utilizando apenas bagaço de cana (Figura 4.6). O farelo de trigo apresenta-se como fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso, sendo, portanto considerado na literatura como o substrato ideal. Oberol et al. (2008) sugerem o uso de farelo de trigo em combinação com outros substratos para aumentar a produção de celulasas. Entretanto, quando foram utilizados 100% de farelo de trigo como substrato, a produção enzimática de celulasas foi menor conforme mostrado na Figura 4.3.

Nesse caso pode-se inferir que o fungo produziu outras enzimas como às amilases para degradar o amido que não foi totalmente retirado com a lavagem do substrato

4.3.6 Bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1)

Quando o farelo de trigo foi adicionado ao bagaço de laranja, também ocorreu um aumento expressivo na atividade da enzima endoglucanase quando comparado por FES em 100% de bagaço de laranja (Figura 4.5), porém teve menor atividade da enzima quando comparado em FES utilizando como substrato 100 % de farelo de trigo (Figura 4.3). Em bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1) a umidade teve influencia positiva apenas para uma das linhagens avaliadas. A Figura 4.8 mostra os picos de produção da enzima para os fungos *A. niger* e *A. fumigatus*.

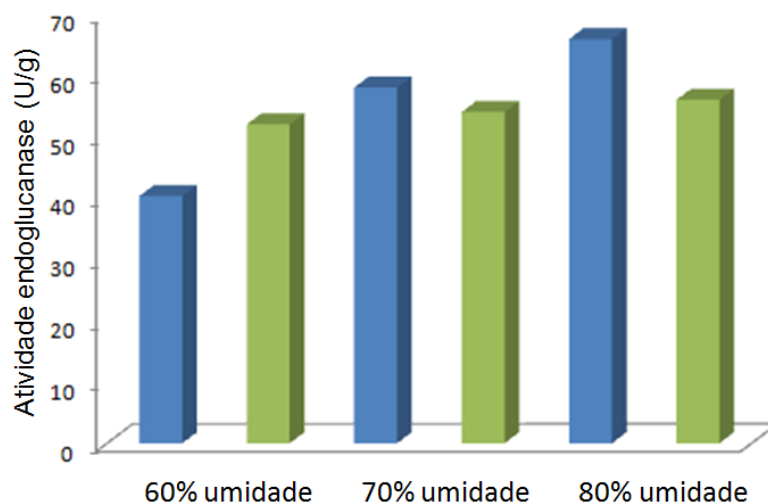


Figura 4.8 Picos de produção das linhagens *A. niger* (■) e *A. fumigatus* (■) em bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1).

Observa-se pela Figura 4.8 que a umidade influenciou a produção de endoglucanase apenas para o fungo *A. niger* mostrando um aumento na atividade com o aumento da porcentagem da umidade. Desta forma, em 60, 70 e 80 % de umidade os picos de atividade foram respectivamente, 40,3 U/g, 65,9 U/g e 65,9 U/g. Para o fungo *A. fumigatus* os valores dos picos permaneceram praticamente constantes (entre 50 e 56 U/g) independente do aumento da porcentagem de umidade avaliada.

Para Kim, Kang e Lee (1997) é possível aumentar a atividade enzimática, desde que a umidade seja controlada em níveis altos, na fase de crescimento, para favorecer o

microrganismo, e, na fase estacionária, seja levada a um nível mais baixo, adequado para a produção enzimática. Alguns autores (ADINARAYANA et al., 2003; KHENG; OMAR, 2005; YANG et al., 2006; PAL; KHANUM, 2010) observaram que as atividades enzimáticas específicas de celulases diminuíram nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto, foi favorável ao crescimento microbiano.

Além da umidade, a avaliação do substrato também foi um parâmetro importante para o aumento ou redução da atividade de endoglucanase como pode ser observado nas Figuras de 4.1 a 4.8. Os resultados de produção de endoglucanase em diferentes meios lignocelulósicos pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus* estão resumidos na Tabela 4.2, onde são destacadas as produções máximas no substrato com a umidade que melhor ocasionou a maior atividade de endoglucanase para cada fungo.

Tabela 4.2 Valores de produção máxima de endoglucanase em diferentes meios e umidades pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus*.

<i>Substrato</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>
Farelo de trigo	78,0 U/g	56,6 U/g
Farelo de soja	152,0 U/g	265 U/g
Bagaço de cana	8,5 U/g	13,0 U/g
Bagaço de cana explodido	7,4 U/g	8,1 U/g
Bagaço de laranja	39,0	39,2
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	112,0	112,0
Bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1)	58,0	65,9

Com os resultados obtidos podemos concluir que o melhor substrato para a produção de endoglucanase foi o farelo de soja. O fungo melhor produtor de endoglucanase foi o *A. fumigatus* com a produção de 265 U/g. O segundo substrato de maior relevância para produção de endoglucanase foi o farelo de trigo para o fungo *A. niger* (78,0 U/g). A quantidade de celulose e sua associação com outros componentes, especialmente com a lignina, conforme mostra a Tabela 4.3 contribuem de forma significativa no retardo e redução de biodegradação do substrato pela enzima.

Tabela 4.3 Composição dos resíduos agroindustriais avaliados (FARINAS et al., 2008; MACIEL, et al., 2008).

Resíduos Agrícolas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	50	33	10
Farelo de trigo	45	25	4,9
Bagaço de laranja	16,2	13,8	3
Farelo de soja	40	35	3
Palha de arroz	40	18	5,5

Quando se utilizou apenas bagaço de cana, que apresenta em sua composição cerca de 10 % de lignina a produção de endoglucanase foi a mais baixa em comparação com a produção da enzima utilizando-se os outros substratos avaliados como mostra a Tabela 4.3.

Outro fator que pode ter ocasionado a baixa produção de endoglucanase em FES utilizando apenas bagaço de cana é o fato desse resíduo possuir teor de proteína extremamente baixo, ao contrário do farelo de soja que possui elevado teor protéico (43 %) (SUN; LI, 2008) em relação aos demais substratos, fornecendo uma quantidade de nitrogênio orgânico mais adequada ao crescimento do microrganismo. O farelo de trigo possui também em sua composição muito amido, e por isso, o mesmo foi lavado sucessivamente, para diminuir a produção de amilase e assim contribuir para a produção de outras enzimas como as celulases. Pode-se inferir que se o farelo de trigo não tivesse sido lavado a produção enzimática teria sido menor.

Pelo resultado obtido pode-se inferir que a produção de endoglucanase está relacionada diretamente com o teor de proteína de cada substrato avaliado. A Figura 4.9 mostra a relação entre porcentagem de proteína dos substratos avaliados e a atividade da enzima endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus*.

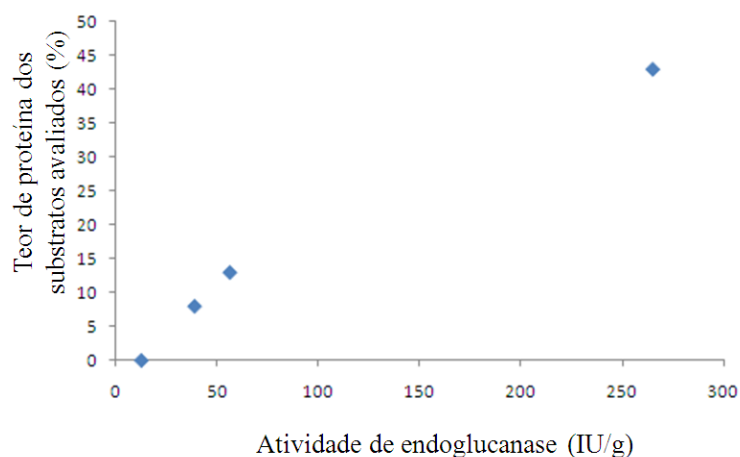


Figura 4.9 Relação entre porcentagem de proteína dos substratos avaliados e atividade da enzima endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus*.

Muitas espécies de *Aspergillus sp* são descritas na literatura como bons produtores de endoglucanase (CEN; XIA, 1998; THYGESEN et al. 2003; ADSUL et al. 2007). No entanto, existem poucos relatos sobre a produção de celulases por *Aspergillus fumigatus*. Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, há que se considerar as diferenças de metodologia de fermentação (substrato, umidade, aeração, pH e temperatura) e de dosagem de atividades usadas. A produção de celulases por outros autores, utilizando cepas de *Aspergillus* (não mutantes) em FES, foi comparada com dados obtidos neste trabalho (pico de atividade) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Comparação da produção de endoglucanase em vários materiais lignocelulósicos em FES, com diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus* e *A. niger*.

Microrganismo	Substrato	Atividade (U/g)	Referência
<i>A. fumigatus</i>	Bagaço de cana	21,06 U/g	Grigorevski-Lima et al., 2009
<i>A. ellipticus</i> e <i>A. fumigatus</i>	Bagaço de cana	14,55 U/g	Gupta; Madamwar (1997)
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo e palha de arroz (1:1)	8,39 U/g	Sherief et al., 2010.
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	66,6 U/g	Thygesen et al., 2003
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	98,5 U/g	Soni et al., 2010
<i>A. niger</i>	Bagaço de laranja	60,5 U/g	Mamma et al., 2008
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de soja	150 U/g	Soni et al., 2010

Pode-se inferir que os meios utilizados no presente estudo proporcionaram, de maneira geral, boa produção de endoglucanase pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus*, quando comparados com dados da literatura, o que os tornam microrganismos possíveis de serem utilizados para produção de endoglucanase em larga escala.

4.4 Cinética de produção de endoglucanase no melhor substrato

Os valores de endoglucanase durante o cultivo de 120 horas obtidos no melhor meio fermentado (farelo de soja 60 % de umidade para *A. fumigatus* e 50% de umidade para *A. niger*) são mostrados na Figura 4.10.

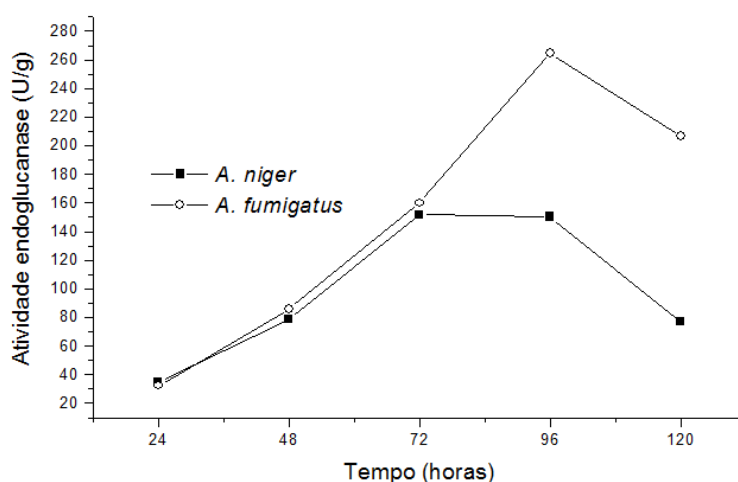


Figura 4.10 Cinética enzimática de endoglucanase (U/g) por *A. niger* e *A. fumigatus* em farelo de soja.

A produção de endoglucanase aumentou durante o cultivo até atingir o pico em 96 horas de incubação pelo fungo *A. fumigatus* (265,0 U/g) e diminuiu em 120 horas (206,6 U/g). Já na FES utilizando o fungo *A. niger* o pico da produção de endoglucanase foi em 72 horas com o valor de 152 U/g essa atividade manteve-se constante até 96 horas (150,4 U/g) e diminuiu em 120 horas (76,9 U/g). Pode ser observado também que o perfil da produção enzimática de CMCase pelas duas linhagens foram semelhantes até 96 horas.

A queda na produção da enzima pode estar relacionada a alterações no metabolismo do fungo durante o crescimento contínuo e juntamente com a limitação do teor de nutrientes que poderiam resultar em morte celular e, posteriormente, a desnaturação de enzimas e

redução da atividade das enzimas (BON et al., 2008) Os resultados confirmaram que os fungos *A. niger* e *A. fumigatus* são bons produtores de endoglucanase e que foram capazes de se adaptarem aos diferentes meios testados (Tabela 4.2). Ainda, pode-se concluir que, considerando a produção total da enzima (U/g), o tempo de fermentação mais apropriado foi 96 horas para a linhagem de *A. fumigatus* e 72 horas para linhagem de *A. niger*. Portanto, o fungo *A. niger* em comparação com o fungo *A. fumigatus* pode ser considerado um melhor fungo para aplicação na produção de enzimas em escala industrial, pois a sua produtividade é mais rápida, mesmo que seja menor em valores de unidade de enzimas.

4.5 Produção de outras enzimas

Uma vez definidas as condições ótimas (substrato e umidade) para a produção de endoglucanase (Farelo de soja 60 % para o fungo *A. fumigatus* e farelo de soja 50 % para o fungo *A. niger*) foram determinadas as atividades de outras enzimas despolimerizantes na solução enzimática bruta obtida por FES no meio FS As enzimas testadas foram FPase, xilanase e β -glicosidase, os resultados dos picos das atividades em FES em cultivo de até 120 horas pelas linhagens *A. fumigatus* e *A. niger* estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Picos de produção enzimática de FPase, xilanase e β -glicosidase em farelo de soja pelas linhagens de *A. fumigatus* e *A. niger*.

	Farelo de soja 60% umidade	Farelo de soja 50% umidade
Enzima	<i>fumigatus</i>	<i>niger</i>
FPase	2,4 U/g	5,58 U/g
Xilanase	558,3 U/g	484,21 U/g
B-glicosidase	6,52 U/g	4,0 U/g

Os outros substratos também foram avaliados quanto a produção de FPase, xilanase e β -glicosidase. Para essa avaliação utilizou-se o sobrenadante da fermentação que melhor possibilitou a produção de endoglucanase para os substratos e umidades avaliados. As Tabelas 4.6 e 4.7 mostra os picos de produção enzimática de FPase, xilanase e β -glicosidase nos demais substratos avaliados para as linhagens *A. fumigatus* e a *A. niger*, respectivamente.

Tabela 4.6 Picos de produção enzimática de FPase, xilanase e β -glicosidase nos demais substratos avaliados para *A. fumigatus*.

<i>fumigatus</i>	Enzimas		
Substrato	FPase (U/g)	Xilanase (U/g)	B-glicosidase (U/g)
FS 60% umidade	2,4	558,3	6,52
FT 50% umidade	4,98	1055,0	105,82
BC 80% umidade	0	68,0	3,7
BCE 80% umidade	0	30,4	2,65
BL 70% umidade	0	43,0	1,49
BC+FT (1:1) 80% umidade	5,09	821,0	38,0
BL+FT (1:1) 80% umidade	0	391,0	15,15

Tabela 4.7 Picos de produção enzimática de FPase, xilanase e β -glicosidase nos demais substratos avaliados para *A. niger*.

<i>niger</i>	Enzimas		
Substrato	FPase (U/g)	Xilanase (U/g)	B-glicosidase (U/g)
FS 50% umidade	5,58	484,21	4,0
FT 50% umidade	2,88	1285,0	96,0
BC 80% umidade	0	75,3	3,3
BCE 80% umidade	0	28,3	2,65
BL 70% umidade	0,9	51,0	1,82
BC+FT (1:1) 80% umidade	2,2	1050,0	38,0
BL+FT (1:1) 80% umidade	0	380,0	18,0

4.5.1 FPase

A melhor produção da enzima FPase (5,58 U/g) foi obtida pela linhagem de *A. niger* em FES utilizando como substrato farelo de soja. Farinas et al. (2008) obtiveram a maior produtividade dessa enzima quando se utilizou também o farelo de soja como substrato sólido, atingindo valores de até 6,65 U/g por uma linhagem de *A. niger*, sendo que para o controle da umidade os autores usaram o meio Czapek Dox modificado com a presença de

sacarose, o que pode ter proporcionado maior atividade, pois a sacarose pode ter induzido a atividade quando comparado com o meio usado no presente trabalho.

A linhagem de *A. fumigatus* obteve uma produção de FPase ligeiramente menor em comparação com o fungo *A. niger* chegando até 5,09 e 4,98 U/g, porém utilizando como substrato o farelo de trigo e a mistura farelo de trigo e bagaço de cana (1:1), respectivamente. Grigorevski-Lima et al. (2009) também obtiveram máxima produção da enzima FPase (5,35 U/g) em FES utilizando farelo de trigo como substrato e tendo como agente da fermentação um linhagem de *A. fumigatus*. Sukumaran et al. (2009) obteve 4,55 U/g usando *A. niger* MTCC 7956 em farelo de trigo como substrato. Esse resultado é bastante interessante quando comparado com dados de Chandra et al. (2007) que obtiveram valores máximos de atividade FPase de 2,9 U/g a partir do farelo de trigo como substrato sólido e tendo como agente da fermentação um isolado de *Aspergillus niger*. Soni et al. (2010) obtiveram atividade de 2,11 U/g usando farelo de trigo como substrato e uma estirpe de *A. fumigatus*. No mesmo estudo, os autores obtiveram maior produção de FPase (3,37 U/g), quando utilizou palha de arroz como substrato. De acordo com Poorna e Prema (2007), o tamanho das partículas dos substratos influencia a produção de enzima e biomassa e a aglomeração de partículas podem inibir a transferência de oxigênio. Os microrganismos bem como a ação das enzimas, penetram e aderem dependendo das propriedades físicas do substrato, como natureza cristalina e amorfa, área de acessibilidade, área de superfície, porosidade e tamanho das partículas (KRISHNA, 2005). Por isso, encontramos diferenças na produção de enzimas nos mesmos substratos e em substratos diferentes.

Na literatura o farelo de trigo é considerado um indutor da produção de FPase para a fermentação com linhagens de *Aspergillus sp* (IYAYI, 2004). No entanto, a adição de farelo de trigo no bagaço de laranja não ocasionou indução da atividade da FPase. A expressão diferencial da atividade de FPases observada pode ser atribuída à heterogeneidade estrutural dos substratos celulósicos (VANDAMME; LOGGHE; GEERAERTS, 1982). Gupte e Madamwar (1997) obtiveram 3,75 U/g durante cocultivo de *A. ellipticus* e *A. fumigatus* utilizando bagaço de cana como substrato e 2,1 U/g quando *A. ellipticus* foi usado sozinho. Kang et al. (2004) obtiveram 19 U/g em FES utilizando casca de arroz pelo fungo *A. niger* KK12.

Apesar dos fungos do gênero *Aspergillus* geralmente apresentarem uma produtividade inferior em termos de FPase quando comparada aos fungos do gênero *Trichoderma*, os dados aqui apresentados (pico de atividade de 5,58 U) são superiores aos valores máximos de FPase obtidos por Latifian, Hamidi-Esfahani e Barzegar (2007) utilizando o *Trichoderma reesei* em substrato farelo de arroz (2,3 U/g). Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998) obtiveram 6,5 U/g em FES utilizando farelo de trigo e bagaço de cana e a linhagem mutante de *T. reesei* LM-UC4, quando os autores fizeram o cocultivo do *T. reesei* com o fungo *A. niger* a produção de FPase aumentou mais que o dobro (15,5 U/g). Em um mesmo estudo os autores ao utilizar um mix de cultura entre *T. reesei* LM-UC4 e *A. phoenicis* a produção máxima de FPase foi de 11,0 U/g, o que mostra a grande influencia do gênero *Aspergillus sp* na produção enzimática. Podemos inferir que a produção de FPase assim como para outras enzimas foram influenciadas pela fonte de carbono e pelo microrganismo escolhido.

4.5.1.1 Cinética de produção de PFase pelas linhagens de *A. fumigatus* e *A. niger*

Os valores de PFase durante o cultivo de 120 horas obtidos no melhor meio fermentado (farelo de soja 50 % de umidade) para *A. niger* e bagaço de cana e farelo de trigo 1:1 em 80% de umidade para a linhagem de *A. fumigatus* são mostrados na Figura 4.11.

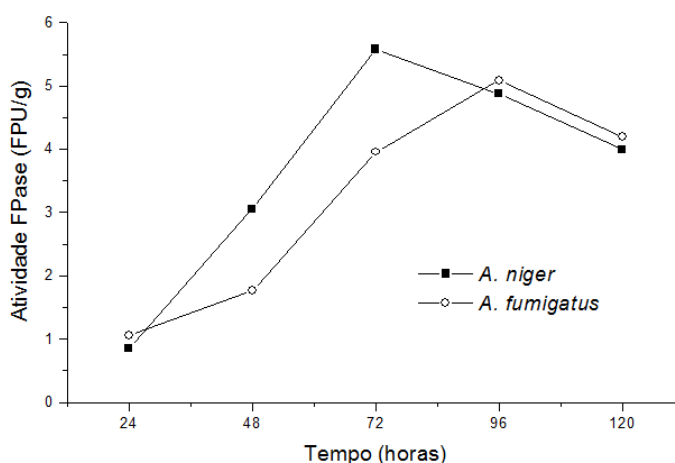


Figura 4.11 Cinética enzimática de FPase (U/g) por *A. niger* em farelo de soja e 50% de umidade e *A. fumigatus* em farelo de trigo + bagaço de cana (1:1) em 80% de umidade.

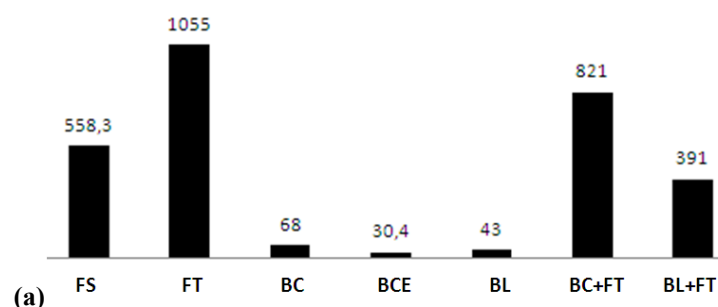
A produção de FPase em FES pelo fungo *A. niger* atingiu o máximo de atividade em 96 horas (5,58 U/g) e diminuiu ao termino do cultivo em 4,0 U/g (120 horas), pode ser

observado também, na Figura 4.11, que até o pico de produção a atividade enzimática foi aumentando progressivamente. O perfil enzimático de FPase do fungo *A. niger* foi semelhante ao perfil de produção da endoglucanase. Já em relação à produção pela linhagem *A. fumigatus* o perfil enzimático também foi semelhante ao perfil produzido pela enzima endoglucanase, sendo o pico atingido em 96 horas de incubação (5,09 U/g). Ao longo do percurso fermentativo a produção foi aumentando, sendo que em 120 horas a atividade foi reduzida (4,2 U/g)

Os resultados confirmaram que os fungos *A. niger* e *A. fumigatus* são bons produtores de FPase e que foram capazes de se adaptar aos diferentes meios testados. Ainda, pode-se concluir que, considerando a produção total da enzima (U/g), o tempo de fermentação mais apropriado foi 96 horas para a linhagem de *A. fumigatus* e 72 horas para linhagem de *A. niger*.

4.5.2 Xilanase

Em relação à enzima xilanase, as melhores produtividades foram obtidas com o substrato farelo de trigo 50 % umidade (1285,0 U/g) pelo fungo *A. niger* e farelo de trigo 60 % umidade 1055,0 U/g pelo fungo *A. fumigatus* (Figura 4.12). O segundo substrato que ocasionou maior produção de xilanase foi a mistura de farelo de trigo e bagaço de cana (1:1), com valores de 1055,0 e 821, 0 U/g para as linhagens de *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente.



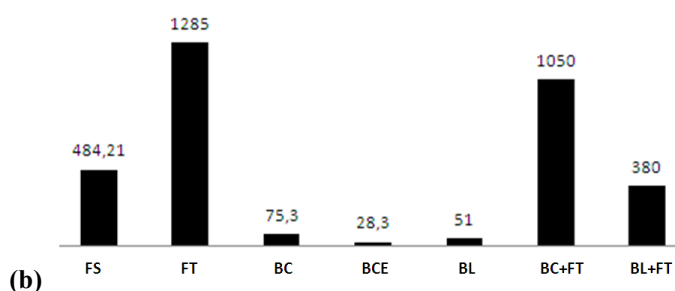


Figura 4.12 Picos de produção enzimática de xilanase pelos fungos (a) *A. fumigatus* e (b) *A. niger* (FSM: farelo de soja; FT: farelo de trigo; BC: bagaço de cana; BCE: bagaço de cana explodido; BL: bagaço de laranja; BC+FT: bagaço de cana e farelo de trigo 1:1; BL+FT: bagaço de laranja e farelo de trigo 1:1).

As xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, que é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses. A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal (POLIZELI et al., 2005). Na literatura são encontrados vários trabalhos utilizando resíduos industriais e agroindustriais alternativos como fonte indutora de xilanase como o sabugo de milho (GAWANDE et al., 1999; DAMASO; ANDRADE; PEREIRA, 2000), pasta de madeira (ANTONY et al., 2003) e casca de coco verde (COELHO; CARMONA, 2003).

De acordo com Aro et al. (2001) a presença de celulose pode influenciar não somente a produção de celulase, mas também a produção de xilanases, porque o regulador da celulase, ACEII, também afeta a regulação da xilanase. Portanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo a atividade de xilanase pode ter sido induzida pela presença de celulose. Como visto na Tabela 4.3 o farelo de trigo e o farelo de soja possuem em sua composição aproximadamente 40 % de celulose, o que pode ter contribuído pela alta atividade de xilanase proporcionada por esses substratos por ambas as linhagens fúngicas. Outro fator que deve ser considerado é o fato de que cada substrato avaliado apresenta diferentes porcentagens de hemicelulose e lignina como também pode ser verificado nas Tabelas 2.8 a 2.10.

Os fungos do gênero *Aspergillus* sp podem ser considerados como fungos xilanolíticos (ANTHONY et al., 2003). Soni e colaboradores (2010) avaliaram a atividade de xilanase em FES usando o farelo de trigo e obtiveram 1722,0 U/g pelo fungo *A. fumigatus*. Senthilkumar et al. (2005) obtiveram uma atividade máxima de 1024,0 U/g usando farelo de trigo como substrato por *A. fischeri* como agente da fermentação.

No presente estudo os valores mais baixos (28,3 e 30,4 U/g) produzidos pelas linhagens de *A. niger* e *A. fumigatus* respectivamente, foram obtidos quando foi utilizado para a fermentação apenas BCE. A produção da enzima foi relativamente maior em BC (75,3 e 68,1 U/g) produzidas pelas linhagens de *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente. Essa produção foi aumentada significativamente quando as linhagens foram incubadas em BC+FT (1:1) com a produção de 1050,0 e 821,52 U/g. A produção de xilanase por outros autores, utilizando cepas de *Aspergillus* (não mutantes) em FES, foi comparada com dados de produção máxima obtidos neste trabalho (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 Comparação da produção de xilanase em vários materiais lignocelulósicos em FES, com diferentes cepas de *Aspergillus*.

Microrganismo	Substrato	Atividade Xilanase (U/g)	Referência
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo ao bagaço de cana (2:1)	1286,0	Maciel et al., 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	4460,0	Pal; Khanum, 2010
<i>A. niger</i>	Aloe vera	825,0	Pal; Khanum, 2010
<i>A. fischeri</i>	Farelo de trigo	1024,0	Senthilkumar et al., 2005
<i>A. niger</i>	Bagaço de cana e farelo de soja (1:1)	3099,0	Maciel et al., 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de soja	15,84	Farinas et al., 2008
<i>A. niger</i>	Bagaço de laranja	77,1	Mamma et al., 2008
<i>A. niger</i>	Bagaço de laranja	13,14	Farinas et al., 2008
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	1234,0	Silva et al., 1999
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	1055,0	Presente estudo
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	1285,0	Presente estudo
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de soja	558,3	Presente estudo
<i>A. niger</i>	Farelo de soja	484,21	Presente estudo
<i>A. niger</i>	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	1050,0	Presente estudo
<i>A. fumigatus</i>	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	821,0	Presente estudo
<i>A. fumigatus</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1)	391,0	Presente estudo
<i>A. niger</i>	Bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1)	380,0	Presente estudo

Comparando com os dados da Tabela 4.8, pode-se inferir que os meios utilizados no presente estudo proporcionaram, de maneira geral, boa produção de xilanase pelos fungos *A. niger* e *A. fumigatus*, quando comparados com dados da literatura. Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, deve-se considerar as diferenças de metodologia de fermentação (substrato, umidade, aeração, pH e temperatura) e de dosagem de atividades usadas.

4.5.2.1 Cinética de produção de xilanase pelas linhagens de *A. fumigatus* e *A. niger*

Os valores de xilanase durante o cultivo de 120 horas obtidos no melhor meio fermentado (farelo de trigo 60% de umidade) para *A. niger* e farelo de trigo 50% de umidade para a linhagem de *A. fumigatus* são mostrados na Figuras 4.13.

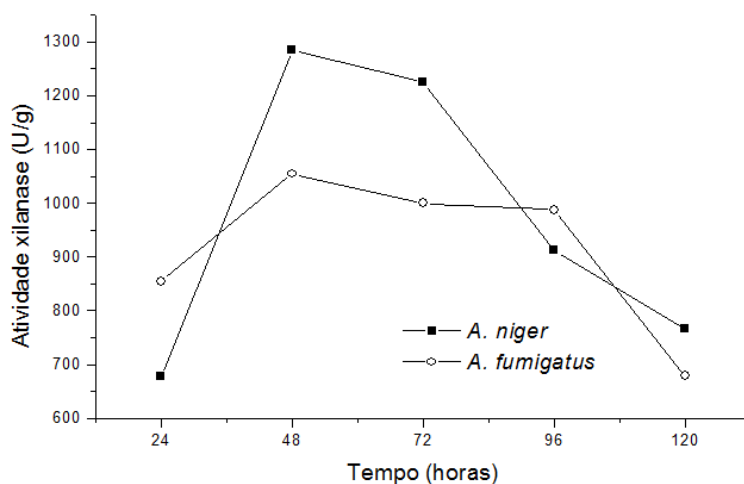


Figura 4.13 Cinética enzimática de xilanase (U/g) por *A. niger* e *A. fumigatus* em farelo de trigo.

Para ambas as linhagens o pico de produção foi em 48 horas de incubação com um valor de 1265 U/g e 1055 U/g para *A. niger* e *A. fumigatus*, respectivamente. Até o pico de produção as linhagens se apresentaram com o mesmo perfil (aumento acentuado). No entanto, após o pico de produção a atividade de xilanase pelo fungo *A. niger* teve uma pequena redução até 72 horas (1225 U/g), porém, essa atividade foi reduzida acentuadamente ao longo do percurso fermentativo. Analisando o perfil da atividade da enzima pelo fungo *A. fumigatus* pode se observar que a atividade manteve-se constante até 96 horas (987,0 U/g) e depois essa atividade foi reduzida a 678,9 U/g no último dia de cultivo.

Os resultados confirmaram que os fungos *A. niger* e *A. fumigatus* são bons produtores de xilanase e que foram capazes de se adaptarem aos diferentes meios testados. Ainda, pode-se inferir que considerando a produção total da enzima xilanase (U/g), o tempo de fermentação mais apropriado foi 48 horas para ambas as linhagens.

4.5.2.2 β -glicosidase

Os gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* são os mais utilizados para produção de β -glicosidase. No entanto, o fungo *A. niger* é o microrganismo considerado melhor produtor da enzima (FADEL, 2000; JÄGER et al., 2001; CHAUVE et al., 2010). Porém, no presente estudo a produção da enzima β -glicosidase não foi maior quando utilizou o fungo *A. niger* em comparação ao fungo *A. fumigatus* (Figura 4.14).

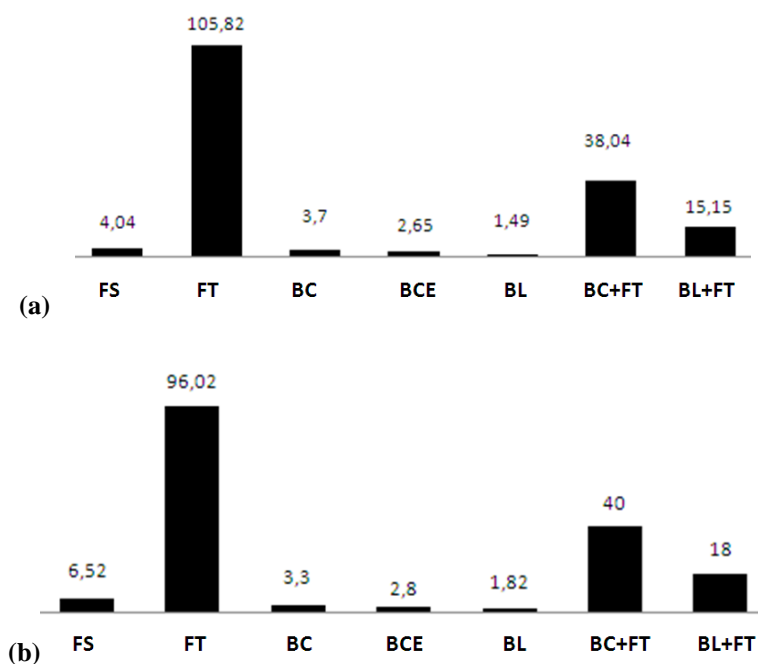


Figura 4.14 Picos de produção enzimática de β -glicosidase pelos fungos (a) *A. fumigatus* e (b) *A. niger* (FSM: farelo de soja; FT: farelo de trigo; BC: bagaço de cana; BCE: bagaço de cana explodido; BL: bagaço de laranja; BC+FT: bagaço de cana e farelo de trigo 1:1; BL+FT: bagaço de laranja e farelo de trigo 1:1).

Quando bagaço de cana foi suplementado com farelo de trigo ocorreu um aumento significativo na atividade da β -glicosidase, de 3,7 e 3,3 U/g para 40,0 e 38,04 U/g utilizando como agente da fermentação o *A. niger* e o *A. fumigatus*, respectivamente. A FES utilizando 100% de bagaço de cana (tanto BC como BCE) não favoreceu a produção de β -glicosidase.

Pode-ser observar pela Figura 4.14 que os picos de atividade foram de 1,49 U/g (*A. fumigatus*) e 1,82 U/g (*A. niger*) para BC e 2,65 e 2,8 U/g para BCE, para os fungos *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente. Observando os dados obtidos para a atividade de β -glicosidase podemos inferir que o farelo de trigo induziu a produção enzimática. Tal fato foi confirmado por Steiner, Socha e Eyzaguirre, (1994) que constataram que o farelo de trigo principalmente, devido à sua composição mineral auxilia na indução da β -glicosidase no meio de fermentação.

O farelo de trigo foi o substrato que proporcionou a melhor produção de β -glicosidase para ambas as linhagens avaliadas, com picos de produção de 105,0 e 96,0 U/g para os fungos *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente.

O fungo *Trichoderma reesei* apesar de ser um dos microrganismos mais estudados em relação à produção de celulasas, produz uma quantidade de β -glicosidase relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação da biomassa (KIM; KANG; LEE, 1997). Nesse sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar essa desvantagem, podendo ser avaliada em fermentações com culturas simples ou em co-culturas.

Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998) obtiveram 55 U/g em FES utilizando farelo de trigo e bagaço de cana e a linhagem mutante de *T. reesei* LM-UC4, quando os autores fizeram o cocultivo do *T. reesei* com o fungo *A. niger* a produção de β -glicosidase aumentou (170,6 U/g). Brijwani et al. (2010) relataram que o déficit de β -glicosidase foi superado quando o *T. reesei* foi co-cultivado com *A. oryzae*. Nesse trabalho, a atividade β -glicosidase foi máxima (10,71 U/g), quando utilizou casca de soja e farelo de trigo. Kang et al. (2004) obteve máxima produção da enzima (100,0 U/g) com palha de arroz como substrato e pelo fungo *A. niger* KK2. Gao et al. (2008) obteve 119 U/g usando resíduos de milho como substrato por *Aspergillus terreus* M11.

No presente estudo a produção de β -glicosidase foi insignificante quando foi utilizado o bagaço de laranja como substrato com a produção máxima de 1,82 U/g usando o *A. niger* como agente da fermentação. Farinas et al. (2008) obtiveram a produção máxima de 1,0 U/g da enzima em bagaço de laranja utilizando o fungo *A. niger* na fermentação. A produção de β -glicosidase foi aumentada em 10 vezes quando o farelo de trigo foi misturado

ao bagaço de laranja 1:1. Portanto, pode-se inferir que o farelo de trigo foi um indutor na produção da enzima por ambas as linhagens avaliadas.

Os meios utilizados proporcionaram, de maneira geral, boa produção de β -glicosidase pelo fungo *A. niger* e *A. fumigatus*, quando comparados com dados da literatura. Substratos contendo farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar tem sido usados com sucesso na obtenção de enzimas β -glucosídicas microbianas.

4.5.2.3 Cinética de produção de β -glicosidase pelas linhagens de *A. fumigatus* e *A. niger*

Os valores de β -glicosidase durante o cultivo de 120 horas obtidos no melhor meio fermentado (farelo de trigo 60 % de umidade para *A. niger* e farelo de trigo 50 % de umidade para a linhagem de *A. fumigatus*) são mostrados na Figura 4.15.

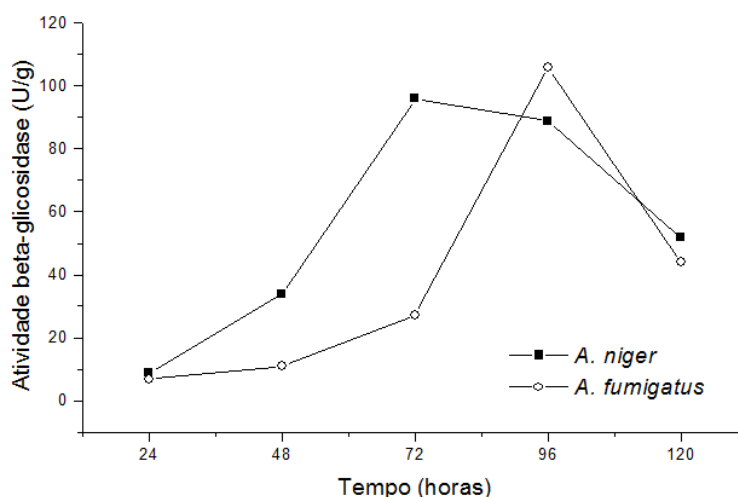


Figura 4.15 Cinética enzimática de beta-glicosidase (U/g) por *A. niger* e *A. fumigatus* em farelo de trigo.

A produção da enzima β -glicosidase foi maior quando a FES teve como agente o fungo *A. fumigatus*, a produção máxima ocorreu em 96 horas com o valor de 105 U/g. Até atingir o pico de atividade manteve-se constante até 72 horas (Figura 4.15) e depois aumentou acentuadamente quando se deu o pico. Porém, essa atividade foi reduzida gradativamente ao término do processo fermentativo (44,9 U/g). Em relação ao perfil enzimático do fungo *A. niger* pode-se concluir que foi semelhante, porém em quantidade um pouco menor e ocorrendo em 72 horas de incubação com o valor de 96 U/g. Ao término da fermentação (120

horas) a atividade de β -glicosidase também foi reduzida (51,9 U/g), porém esta redução foi ligeiramente menor em comparação com a linhagem de *A. fumigatus*.

Os resultados confirmaram que os fungos *A. niger* e *A. fumigatus* são bons produtores de β -glicosidase e que foram capazes de se adaptarem aos diferentes meios testados. Ainda, pode-se concluir que, considerando a produção total da enzima (U/g), o tempo de fermentação mais apropriado foi 96 horas para a linhagem de *A. fumigatus* e 72 horas para linhagem de *A. niger*.

4.6 Caracterização bioquímica das enzimas produzida pelo fungo *A. fumigatus*

Os testes para a caracterização bioquímica das enzimas obtidas foram realizados utilizando-se solução enzimática bruta obtida pelo cultivo apenas do fungo *A. fumigatus* em farelo de trigo 50 % de umidade. Com relação ao tipo de substrato a ser usado na caracterização das enzimas optou-se por usar apenas farelo de trigo em função da maior atividade das enzimas avaliadas. A linhagem escolhida foi em função da sua melhor produção enzimática. Foi escolhido para avaliação da temperatura e pH ótimo, bem como estabilidade térmica apenas os valores dos picos obtidos que ocorreram em 96 horas de incubação.

As propriedades das enzimas como os de todas as proteínas são modificadas por condições físicas existentes, tais como temperatura e pH. Além disso, a concentração, composição e qualidade do substrato, bem como, a concentração de enzima e tempo de reação também são fatores importantes que determinam a melhor atividade enzimática. Cabe ressaltar também, que os resultados apresentados representam a atuação das enzimas nos extratos brutos, sem prévias purificações, sendo, portanto, aparentes as condições ótimas de atuação verificadas. Nessas condições, há possivelmente a influência de componentes do meio de cultivo (especialmente metais) sobre a atividade e a estabilidade das enzimas.

O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo, além disso, permite controlar a velocidade do processo variando estes parâmetros no meio reacional.

4.6.1 Determinação da temperatura ótima para atividade das enzimas

4.6.1.1 Endoglucanase

Pela Figura 4.16 observa-se que a endoglucanase apresentou um perfil típico de enzima termofílica, com atividade máxima entre 55 – 65 °C. A atividade decresceu quando foi incubada em 70 °C, porém ainda manteve cerca de 70 % de sua atividade máxima em 15 minutos de incubação. Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram atividade máxima da enzima pelo fungo *A. fumigatus* em 65 °C e quando incubada em 80 °C a enzima ainda manteve-se 30% da sua atividade. Saqib et al. (2009) também obtiveram temperatura ótima de 65 °C em FES pelo fungo *A. fumigatus*. Javed et al. (2009) em um estudo com FES usando como agente da fermentação o fungo *A. oryzae* obtiveram temperatura ótima de 55 °C para atividade da endoglucanase. Já Siddiqui et al. (1997) obtiveram atividade ótima de 40 °C para a mesma enzima em FES utilizando o fungo *A. niger*. Em uma revisão feita por De Varies e Visser (2001), mostra que de 18 extratos de endoglucanase avaliados de espécies distintas de *Aspergillus*, apenas duas linhagens tiveram temperatura ótima acima de 65 °C, sendo a do fungo *A. fumigatus* e *A. nidulans*. Gao et al. (2008) obtiveram temperatura ótima para a mesma enzima em 80 °C pelo fungo *A. terreus*. Os resultados deste trabalho sugerem fortemente que celulasas do fungo *A. fumigatus* são termofílicas, ideal para muitos processos biotecnológicos. Portanto, o fungo *A. fumigatus* pode ser considerado um termofílico.

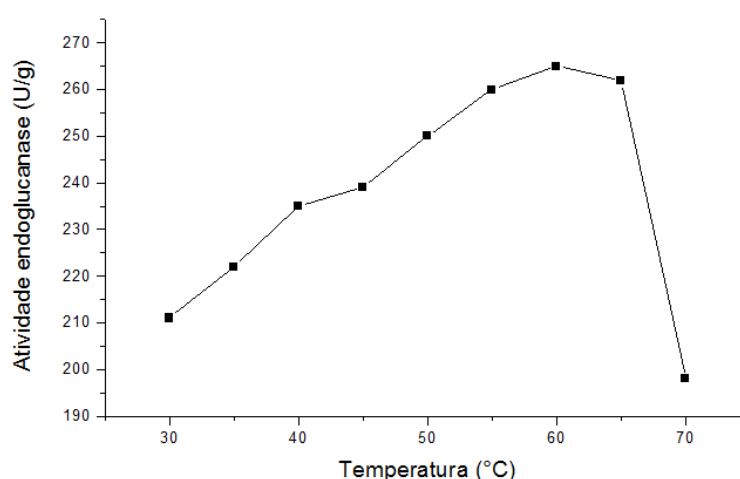


Figura 4.16 Efeito da temperatura para atividade ótima de endoglucanase.

4.6.1.2 FPase

Pela Figura 4.17 observa-se que a atividade de FPase também apresentou um perfil típico de enzima termofílica, com atividade máxima em 65 °C. A atividade decresceu quando foi incubada em 70 °C, porém ainda manteve cerca de 90 % de sua atividade máxima. Sone et al. (1999) relataram atividade máxima de FPase pelo fungo *Aspergillus niger* quando a enzima foi incubada a 37 °C. Em um mesmo estudo os autores relataram que algumas cepas de *Aspergillus*, no entanto, apresentaram atividade máxima da enzima a 30 °C.

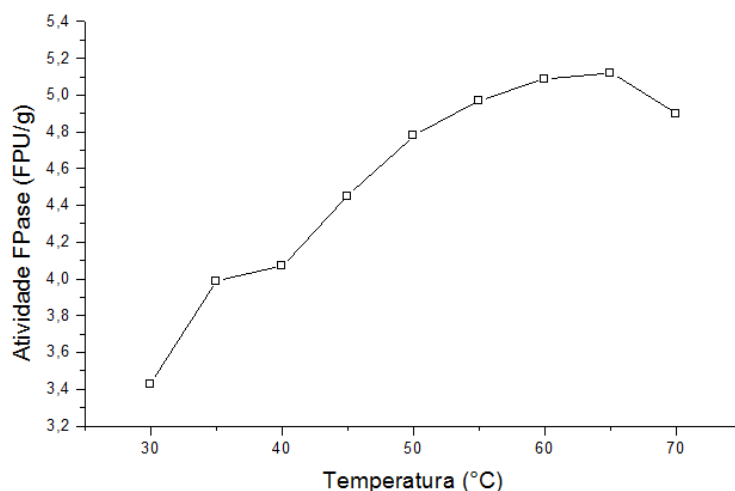


Figura 4.17 Efeito da temperatura para atividade ótima de FPase.

4.6.1.3 Xilanase

Pela Figura 4.18 observa-se que a atividade de xilanase também apresentou um perfil típico de enzima termofílica, com atividade máxima entre 60-65 °C. A atividade decresceu quando foi incubada em 70 °C, porém ainda manteve cerca de 80 % de sua atividade máxima.

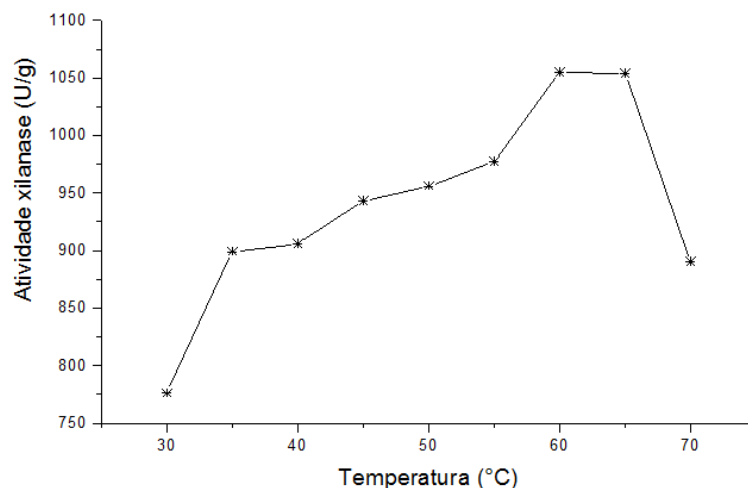


Figura 4.18 Efeito da temperatura para atividade ótima de xilanase.

Anthony et al. (2003) também obtiveram valores máximos de atividades de xilanase em temperaturas entre 60 – 65 °C pelo fungo *A. fumigatus*. A temperatura obtida no presente estudo pode ser considerada alta quando comparada com outros trabalhos na literatura avaliando a produção de xilanases por linhagens de *Aspergillus*. Fugimoto et al. (1995) obtiveram temperatura ótima em torno de 60 °C para produção de celulases com o fungo *A. aculeatus*. Em FES utilizando o fungo *A. terreus*, Ghareib e El Deim (1992) obtiveram temperatura ótima de atividade de xilanase em torno de 45 °C. Shah e Madamwar (2005) obtiveram temperatura ótima de 30 °C em extrato enzimático do fungo *A. foetidus* e quando o extrato enzimático foi incubado a 40 °C a enzima perdeu metade de sua atividade. Smith e Wood (1991) observaram que a melhor temperatura para produção de xilanases por uma cepa de *Aspergillus awamori* foi 30 °C em cultivo líquido. Segundo Prasertsan et al. (1997), a temperatura ótima para produção de xilanases por fermentação em estado sólido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 6275 foi de 30 °C.

4.6.1.4 β -glicosidase

Pela Figura 4.19 observa-se que a atividade de β -glicosidase também apresentou um perfil típico de enzima termofílica, com atividade máxima entre 50 – 60 °C. A atividade decresceu quando foi incubada em 65 – 70 °C, porém ainda manteve cerca de 50 % de sua atividade máxima. Workman e Day (1982) obtiveram atividade máxima de β -glicosidase em torno de 50 °C em FES utilizando como agente da fermentação o fungo *Aspergillus terreus*. Decker, Visser e Schreier (2000) avaliaram a produção de β -glicosidase

de cinco espécies diferentes de *Aspergillus* (*A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingens*) destas somente o fungo *A. foetidus* obteve temperatura ótima de produção da enzima em torno de 60 °C, todos os outros extratos de fungos tiveram sua temperatura ótima de 35 °C até 50 °C.

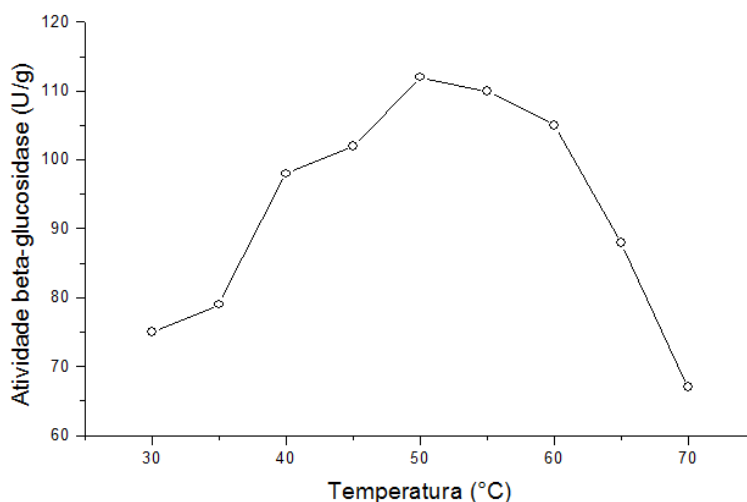


Figura 4.19 Efeito da temperatura para atividade ótima de β -glicosidase

4.6.2 Determinação do pH ótimo para atividade das enzimas

As enzimas têm um pH ótimo em que a sua atividade é máxima e à maior ou menor pH, diminui a sua atividade (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). Os testes para a caracterização do pH ótimo foram realizados utilizando-se solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *A. fumigatus* em 96 horas de incubação. Foi utilizado este tempo de fermentação, devido às enzimas terem apresentado maior atividade enzimática em relação aos outros tempos fermentativos.

4.6.2.1 Endoglucanase

Pela Figura 4.20 observa-se que a atividade de endoglucanase apresentou um perfil típico de enzima acidofílica, com atividade mais alta em pHs ácidos (3,0 – 6,0) e atividade baixa em pH alcalino (8,0 – 10,0). A atividade de endoglucanase foi maior em pH 3,0 – 3,5, caindo sutilmente em pH 4,0, mantendo-se estável até o pH 5,5. A partir do pH 6,0 a atividade foi diminuindo significativamente.

Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram atividade máxima da enzima pelo fungo *A. fumigatus* em pH 2,0 e quando incubada em pH alcalino a atividade foi muito baixa, diminuindo cerca de 30 %. Já Bhainsa e Souza (2009) obtiveram atividade máxima da mesma enzima em pH 4,0. Segundo Gao et al. (2008) esta é uma característica de fungos termofílicos.

Philippidis (1994) trabalhando com diversas linhagens de *Aspergillus* mostrou que o pH ideal para atividade de endoglucanase foi 4,8 como também relatado por Vries e Visser (2001). Sohail et al. (2009) avaliaram a atividade de endoglucanase pelo fungo *A. niger* MS82 em relação à mudança de pH e constataram que a melhor atividade ocorreu em pH 4,0, a mesma reduziu drasticamente em pH 5,0 mantendo-se aproximadamente constante até pH 7,0.

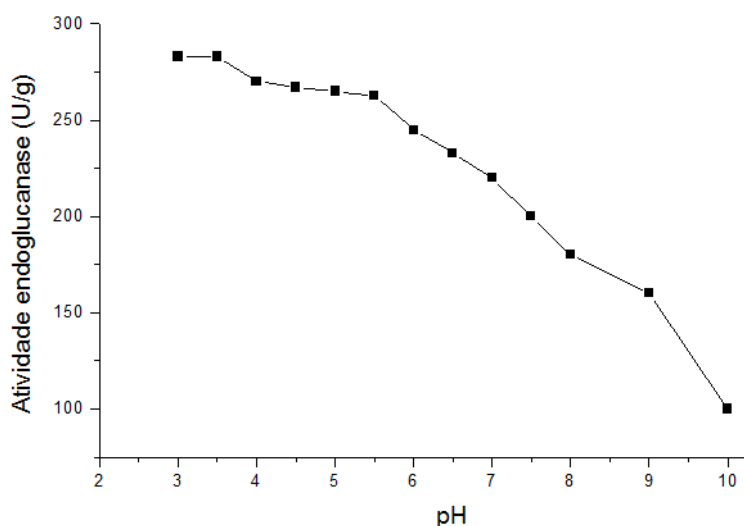


Figura 4.20 Efeito do pH para atividade ótima de endoglucanase.

4.6.2.2 FPase

Com relação à influência do pH na atividade de FPase em diferentes tampões, nota-se que, a maior atividade ocorreu na faixa de pH entre 3,0 e 6,0, atingindo atividade máxima em pH 3,0 (Figura 4.21). Observa-se que a atividade de FPase apresentou um perfil típico de enzima acidofílica. A partir do pH 6,0 a atividade foi diminuindo significativamente. O perfil enzimático foi semelhante ao perfil da enzima endoglucanase como pode ser observado na Figura 4.21.

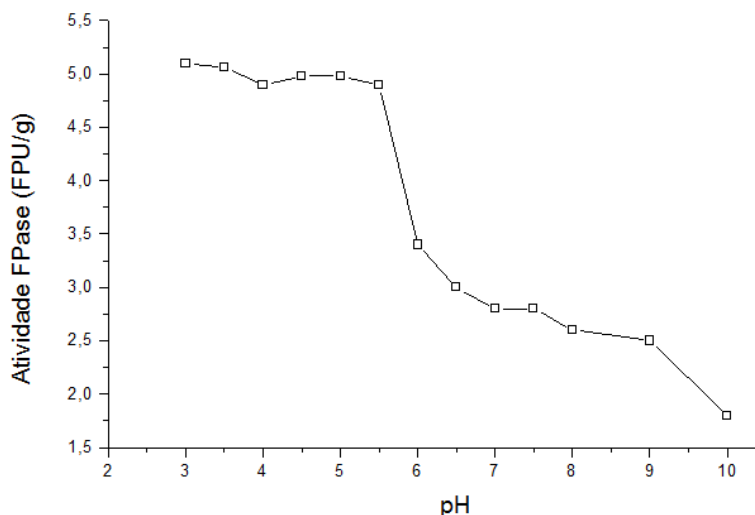


Figura 4.21 Efeito do pH para atividade ótima de FPase.

Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram atividade máxima da enzima endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus* em pH na faixa de 1,5 a 3,0 e quando o extrato foi incubado em pH alcalino a atividade foi muito baixa, atingindo apenas 25 % da atividade residual. Jahangeer et al. (2005) estudaram a influência do pH na atividade de FPase de 7 linhagens de *Aspergillus*. (*A. niger* SJ1, *A. niger* SJ2, *A. niger* SJ3, *A. niger* SJ4, *A. terreus* e *A. niger sp* SJ11), todos apresentaram atividade máxima em pH 4,8. Kang et al. (2004) obtiveram maior atividade de FPase na faixa de pH entre 4,0-7,0, atingindo atividade máxima em pH 7,0 em extratos enzimáticos produzidos pelo fungo *A. niger* KK2.

4.6.2.3 Xilanase

Pela Figura 4.22 observa-se que a atividade de xilanase apresentou maior atividade na faixa de pH entre 5,5 e 6,0, e da mesma forma que as atividades de endoglucanase e FPase como pode se observar nas Figuras 4.20 e 4.21 respectivamente, um perfil típico de enzima acidofílica, porém para a atividade de xilanase o pH que proporcionou melhor atividade foi menos ácido, em comparação com as celulases. A atividade da enzima teve uma pequena diminuição na faixa de pH entre 6,5 e 7,0. Já em pH alcalino a atividade da enzima diminuiu consideravelmente chegando em pH 10 a atingir apenas cerca de 20 % da sua atividade residual (230 U/g).

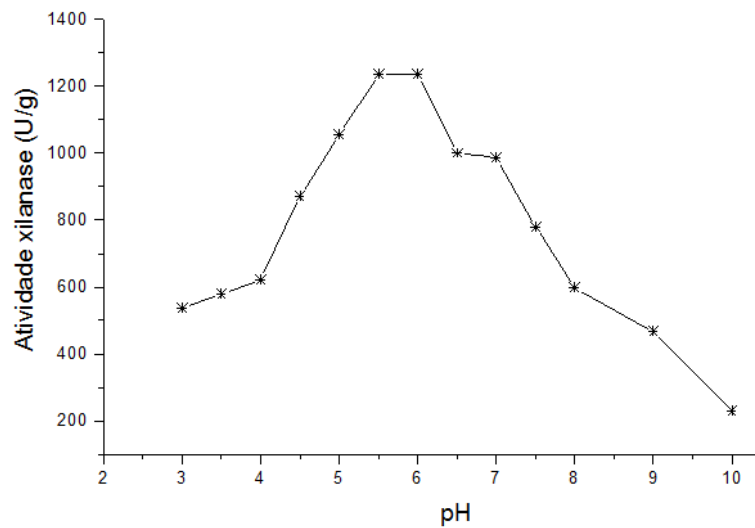


Figura 4.22 Efeito do pH para atividade ótima de xilanase.

Lenartovicz et al. (2003) observaram maior atividade de xilanase em extrato enzimático do fungo *A. fumigatus* na faixa de pH entre 4,5 a 7,0. Maciel et al. (2008) demonstrou em um estudo com extratos enzimáticos do fungo *A. niger* que a atividade de xilanase foi maior na faixa de pH de 5,3 a 5,8. Shah e Madamwar (2005) obtiveram atividade máxima de xilanase em pH 5,0 utilizando o fungo *Aspergillus foetidus* em extratos obtidos por fermentação submersa.

4.6.2.4 β -glicosidase

Com relação à influência do pH na atividade de β -glicosidase em diferentes tampões, nota-se que, a maior atividade ocorreu na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, atingindo atividade máxima em pH 4,0 com valor de (115 U/g) (Figura 4.23). Observa-se pela figura que em pH alcalino a atividade da enzima foi reduzida drasticamente chegando a atingir apenas 8 U/g, correspondendo cerca de 6 % de sua atividade residual.

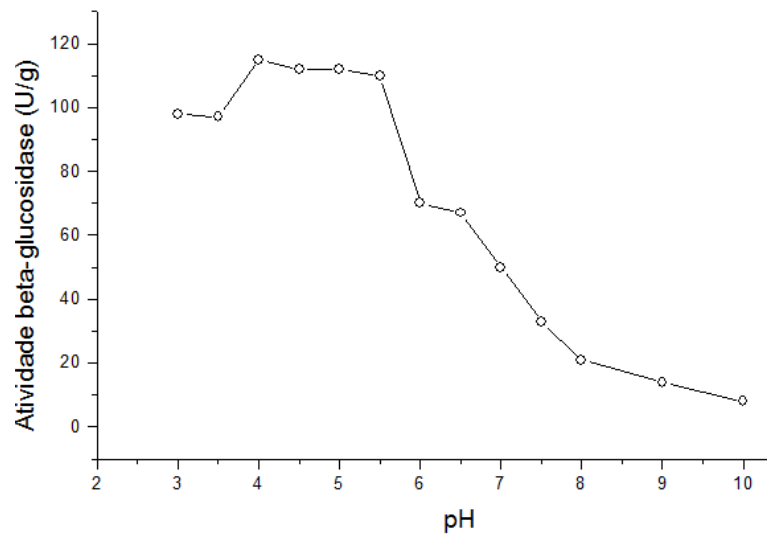


Figura 4.23 Efeito do pH para atividade ótima de beta-glicosidase.

Zhang e colaboradores (2006) obtiveram atividade máxima da enzima β -glicosidase produzida pelo fungo *Aspergillus phoenicis* em pH 5,0, em uma mesmo estudo obtiveram a maior atividade da enzima pelo fungo *A. niger* na faixa de pH entre 4,5 e 5,0 e para o fungo *A. oryzae* sp a maior atividade ocorreu quando o extrato foi incubado em pH 5,0. Elyas et al. (2010) obtiveram dois picos de atividade máxima da enzima β -glicosidase por uma linhagem de *Aspergillus* SA 58, sendo que um ocorreu em pH ácido (5,0) e outro ocorrendo em pH alcalino (9,0).

4.6.3 Determinação da estabilidade das enzimas na ausência de substrato

A temperatura e o pH mostraram grande influência sobre a atividade das enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, como esperado. As atividades enzimáticas foram maiores em temperaturas entre 50 e 60 °C mostrando que o fungo pode ser considerado termofílico.

Quanto a avaliação do pH ótimo, todas as atividades obtidas foram maiores em pH ácido. Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade das enzimas obtidas foram feitos testes para se determinar a estabilidade térmica, na ausência de substrato. A estabilidade térmica é um aspecto muito importante quando se considera a aplicação industrial de enzimas. A estabilidade das enzimas presentes no extrato bruto foi avaliada a 60 °C na ausência de substrato e extraídas de farelo de trigo 50 %.

Nota-se na Figura 4.24 que a endoglucanase manteve cerca de 90 % (235,0 U/g) da sua atividade original (265 U/g) após ser mantida por 35 minutos em 60 °C e teve sua atividade original mantida em cerca de 60 % (160,0 U/g) após uma hora de incubação. Em relação à enzima FPase, a atividade original foi mantida em cerca de 100 % (5,0 FPU) até 40 minutos de incubação e manteve cerca de 75 % da atividade original após uma hora de incubação, diminuindo gradualmente em 3,6 U/g (Figura 4.24) Com relação a estabilidade de xilanase, a atividade da enzima manteve cerca de 100 % da atividade residual até 30 minutos de incubação e teve a atividade reduzida significativamente em 10 % quando aumentou 10 minutos de incubação em 60 °C (960,0 U/g) e após uma hora de incubação a atividade de xilanase manteve cerca de 60 % da atividade residual com valor de 664,0 U/g. A atividade de β -glicosidase foi a que menos se mostrou estável em 60 °C como pode ser observado na Figura 35, mantendo cerca de 95 % da atividade após 15 minutos de incubação com valor de 100 U/g e após uma hora de incubação a atividade original caiu em 50 % (53 U/g).

Os resultados obtidos mostram que as enzimas produzidas pelo fungo *A. fumigatus* são mais estáveis até aproximadamente 40 minutos de incubação a 60 °C, o que pode favorecer o uso dessas enzimas na aplicação da hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais para produção de etanol. A termoestabilidade da enzima se refere a sua resistência ao desdobramento após aquecimento, ou seja, à desnaturação térmica.

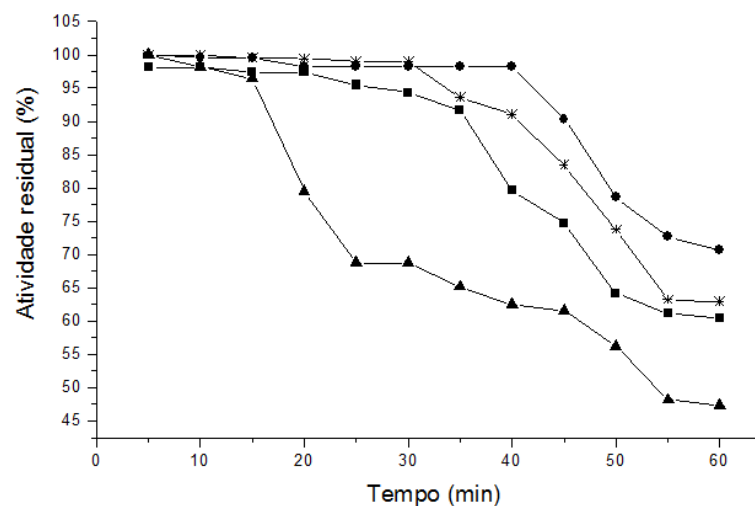


Figura 4.24 Termoestabilidade das enzimas ■ endoglucanase, ● FPase, * xilanase e ▲ β -glicosidase em ausência de substrato obtidas em FES utilizando como substrato farelo de trigo pelo fungo *Aspergillus fumigatus* em 60 °C.

Saqib et al. (2010) avaliaram a produção de endoglucanase em sobrenadante obtido pelo fungo *A. fumigatus* em FES utilizando farelo de arroz como substrato e obtiveram 50 % da atividade de CMCase original em 75 °C após uma hora de incubação. Já o sobrenadante obtido do fungo *A. fumigatus* FBSPE por Grigorevski-Lima et al. (2009) foi capaz de reter 100 % da atividade de CMCase residual a 50 °C por duas horas de incubação, os autores obtiveram resultados semelhantes usando extrato enzimático bruto obtido por *A. niger* o qual manteve cerca de 100 % de atividade de endoglucanase original após uma hora em temperatura entre 50 e 60 °C. Cunha (2002) avaliou a termoestabilidade das endoglucanases de *Myceliophthora thermophila*, fungo que na literatura é apontado como um excelente termófilo e constatou que durante duas horas de incubação a 60 °C, não foram observadas perdas estatisticamente significativas na atividade. Lima et al. (2005) incubaram as endoglucanases de *Streptomyces drozdowiczii* a 50 e 60 °C, visando sua aplicação na indústria têxtil e após três horas de incubação, as enzimas já haviam perdido 80 e 95 % de sua atividade inicial, respectivamente. A estabilidade térmica das FPases e endoglucanases de um extrato celulásico comercial produzido por *Penicillium funiculosum* foi determinada por Van wyk (1997). Após vinte e quatro horas a 50 e 60 °C, as FPases mantiveram apenas 46 e 10 % de sua atividade inicial, respectivamente. Já as endoglucanases apresentavam, após o mesmo período, 50 % de sua atividade inicial (em ambas as temperaturas). Castro (2006) obteve 50 % de atividade de FPase original pelo fungo *A. niger* ATCC 16404 após 2 horas de incubação.

Lenartovicz et al. (2003) avaliaram a termoestabilidade da enzima xilanase após 3 horas de incubação e os extratos enzimáticos produzidos pelo fungo *Aspergillus fumigatus* mantiveram-se estáveis a temperaturas de 65 °C e 70 °C retendo 50 e 25 % de sua atividade original respectivamente. Shah e Madamwar (2005) obtiveram 100 % da atividade residual da mesma enzima, porém de extratos produzidos pelo fungo *A. foetidus* quando incubados a 30 e 40 °C após uma hora e quando a enzima foi incubada em 60 °C a atividade original manteve-se apenas em 20 %. Castro (2006) obteve 50 % de atividade de FPase original pelo fungo *A. niger* ATCC 16404 após 2 horas de incubação.

Com relação à estabilidade de β -glicosidase Zhang et al. (2006), mantiveram 100 % da atividade original após incubação do extrato obtido pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

Com base nos dados de termoestabilidade obtidos no presente trabalho pode-se constatar que as enzimas produzidas pela linhagem de *A. fumigatus* P40M2 apresentaram

estabilidades à temperatura avaliada bastante satisfatória, em relação à sua aplicação em processos industriais de interesse. Os desempenhos foram semelhantes aos resultados obtidos na literatura e revelaram a potencialidade das enzimas produzidas, visto que foram avaliados extratos brutos, que não foram submetidos a prévias purificações.

4.6.4 Zimograma

Com a intenção de identificar as bandas enzimática de endoglucanase, xilanase e β -glicosidase produzidas em FES pelos substratos farelo de trigo (50 % umidade), farelo de soja (50 % umidade), e a mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (80 % umidade), foram conduzidos diversos ensaios de eletroforese, sob condições desnaturantes (enzimas sem poder catalítico). A eletroforese é uma técnica freqüentemente utilizada sob amostras protéicas e baseia-se na migração de proteínas de diferentes tamanhos (massas moleculares) sobre um meio gelatinoso com um gradiente de porosidade, que age como uma peneira molecular, na qual as moléculas maiores ficam localizadas na parte superior, enquanto que as menores migram mais facilmente, sendo encontradas em sua parte inferior (STRYER, 1996). Foi usado o extrato enzimático do fungo *A. fumigatus* extraído das fermentações com farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana. Para visualização das bandas que continham a atividade avaliada o gel foi preparado usando o mesmo substrato como parte constituinte. Posto isso, a Figura 4.25 mostra as bandas com atividade de CMCase. Pela figura pode se observar a expressão de três formas de endoglucanases (Ia, Ib e Ic) nos extratos de FES por farelo de trigo, já em farelo de soja e bagaço de cana somente duas isoformas podem ser observadas.

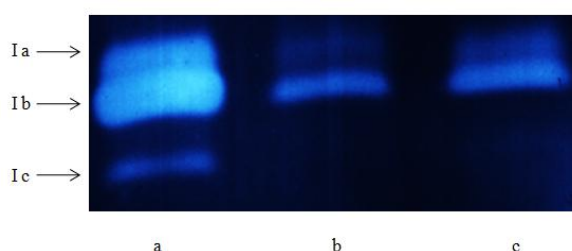


Figura 4.25 Zimograma mostrando as bandas com atividade de endoglucanase (isoformas Ia, Ib e Ic). Em a - farelo de trigo, b - farelo de soja e c - bagaço de cana e farelo de trigo (1:1).

Soni et al. (2010) obteve quatro isoformas na presença do sabugo de milho e em extratos obtidos da FES em bagaço de cana apenas duas isoformas de endoglucanase. Grigorevski-Lima et al. (2009) mostrou a expressão de seis isoformas de endoglucanase na

presença do bagaço de cana em cultura submersa. A expressão diferencial de celulases observado pode ser atribuída à heterogeneidade estrutural dos substratos celulósicos, bem como diferenças nas condições de cultura durante o cultivo (Soni et al., 2010). Essas múltiplas formas de endoglucanases também têm sido relatadas em diferentes cepas de *Aspergillus*.

Em relação às bandas de xilanase pode-se observar a expressão de cinco bandas indicando a presença de múltiplas formas de xilanase em extrato enzimático obtido por FES em farelo de trigo e pela mistura de farelo de trigo e bagaço de cana 1:1. Já no extrato obtido por FES em farelo de soja observa-se a expressão de apenas 3 bandas (Figura 4.26).

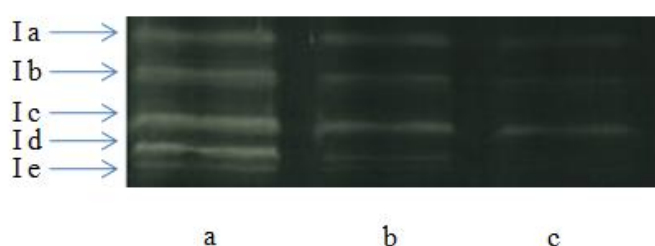


Figura 4.26 Zimograma mostrando as bandas com atividade de xilanase (isoformas Ia, Ib, Ic Id e Ie). Em a - farelo de trigo, b - bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e c - farelo de soja.

A maioria dos fungos xilanolíticos produz pelo menos duas isoformas de xilanases. A produção de xilanases múltipla foi atribuída principalmente à heterogeneidade de xilana, que precisa de xilanases múltiplas com diferentes especificidades para a hidrólise completa (ANTONY et al., 2003). Gawande e Kamat (1999) relataram três e duas formas de xilanases em duas cepas de *Aspergillus sp.* Já em relação ao zimograma da β -glicosidase apenas uma isoforma foi expressa para os três substratos avaliados como mostra a Figura 4.27.

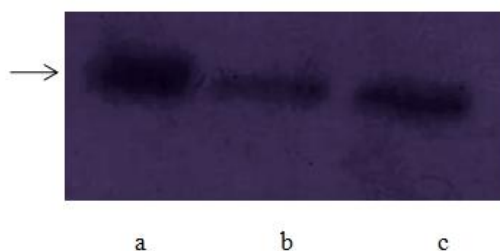


Figura 4.27 Zimograma mostrando a bandas com atividade de β -glicosidase. Em a - farelo de trigo, b - bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e c - farelo de soja.

Elyas et al. (2010) revelaram a expressão de duas isoformas de β -glicosidase com pesos moleculares de 44 kDa e 30 kDa em extratos obtidos pelo fungo *Aspergillus* SA58 em farelo de trigo.

5 Conclusão

Com base nos resultados discutidos no Capítulo 4, surgiram as seguintes conclusões:

1. A partir de amostras de solo do Bioma Amazônico foi possível o isolamento de 110 isolados.
2. A análise preliminar do potencial celulolítico das linhagens de trabalho, conduzidas em meio de cultivo contendo apenas celulose cristalina como fonte de carbono mostrou que 46 fungos possuíam habilidade de expressar celulases.
3. A avaliação semiquantitativa da capacidade das linhagens em produzir celulases realizadas em placas de Petri mostrou que 10 fungos obtiveram melhor crescimento e por isso, foram selecionados para fermentação.
4. A fermentação das 10 linhagens conduzida em Erlenmayer contendo farelo de trigo como fonte de carbono revelou que os fungos *Aspergillus fumigatus* P40M2 e *Aspergillus niger* P47C3 foram os que mais produziram celulases, com produção de 43,65 U/g e 39,15 U/g, respectivamente.
5. Dos substratos avaliados: farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana in natura, bagaço de cana pré-tratado e bagaço de laranja os experimentos realizados com os fungos *A. fumigatus* P40M2 e *A. niger* P47C3 nos resíduos de farelo de trigo, farelo de soja e mistura de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar mostraram ser bons substratos para a produção de enzimas fibrolíticas.
6. Relações hídricas em fermentação devem ser avaliadas criticamente. A umidade do substrato tem uma influência determinante na atividade microbiana. A umidade pode ser atribuída como um parâmetro direto para a transferência de massa e solutos através das células microbianas. Desta forma, estudos de otimização deste parâmetro são bastante relevantes em FES. Cada substrato apresentou uma umidade ótima para produção de determinadas enzimas como as

celulases, xilanases, FPase e β -glicosidase. Durante a produção de celulases, o fungo *A. fumigatus* apresentou melhor atividade de FPase quando cultivado em bagaço de cana e farelo de trigo 1:1 em 80 % de umidade, já o melhor desempenho obtido na produção de xilanase e beta-glicosidase foi em farelo de trigo 50 % de umidade. O fungo *A. niger* apresentou melhor produção de FPase em farelo de soja 50 % de umidade e assim como o fungo *A. fumigatus* a melhor atividade de xilanase e beta-glicosidase foi em farelo de trigo 50 % de umidade.

7. O cultivo das linhagens selecionadas durante avaliação dos resíduos agroindustriais mostrou que o fungo *Aspergillus fumigatus* foi melhor produtor de endoglucanase (265,0 U/g) e β -glicosidase (105,85 U/g) em comparação com o fungo *Aspergillus niger* (152,0 U/g) Já em relação às enzimas FPase e xilanase o fungo *Aspergillus niger* foi melhor produtor com valores de 5,58 FPU e 1285 U/g, respectivamente.
8. A determinação da influência do pH e temperatura na atuação das enzimas das linhagens selecionadas previamente mostrou, para todas as enzimas, valores de pH ótimos entre 3,0 e 6,0. No que tange à temperatura, os valores ótimos oscilaram entre 50 e 65 °C. A endoglucanase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade máxima entre 55 e 65 °C e pH 3,0 a 3,5. A enzima FPase também apresentou atividade máxima em 65 °C e pH 3,0. A xilanase e β -glicosidase apresentou maior atividade entre 60 e 65 °C e entre 50 e 60 °C, respectivamente. A xilanase obteve maior atividade enzimática na faixa de pH entre 5,5 e 6,0. A β -glicosidase apresentou atividade máxima quando o extrato foi incubado em pH 4,0. Pode se concluir que a temperatura e o pH mostraram grande influência sobre a atividade das enzimas produzidas. O fungo *A. fumigatus* P40M2 secretou enzimas tipicamente termofílicas e acidofílicas.
9. Pela avaliação da estabilidade térmica das enzimas produzidas, pôde-se observar, como preconizado pela literatura, redução da estabilidade enzimática com o aumento da temperatura de incubação. A atividade de endoglucanase manteve cerca de 90 % da sua atividade original após ser mantida por 35 minutos em 60 °C e cerca de 60 % após uma hora de incubação. Em relação à enzima FPase, a atividade original foi mantida em cerca de 100 % até 40

minutos e após uma hora 75 % da atividade original foi mantida. Com relação à estabilidade de xilanase, a atividade da enzima manteve cerca de 100 % da atividade até 30 minutos de incubação e após uma hora a atividade de xilanase manteve cerca de 60 % da atividade residual. A atividade de β -glicosidase foi a que menos se mostrou estável em 60 °C mantendo cerca de 95 % da atividade após 15 minutos de incubação e após uma hora a atividade original caiu em 50 %. No extrato enzimático produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus* em FES utilizando farelo de trigo foi identificado 3 isoformas de endoglucanase. Já nos extratos enzimáticos obtidos em FES usando como substrato farelo de soja e a mistura de bagaço de cana e farelo de trigo foram identificadas apenas 2 isoformas de endoglucanase.

10. No extrato enzimático produzido pelo fungo *A. fumigatus* em FES utilizando farelo de trigo e no extrato enzimático da mistura de bagaço de cana e farelo de trigo foi identificado 5 isoformas de xilanase. Já no extrato enzimático obtido em FES usando como substrato farelo de soja foram identificadas apenas 3 isoformas de endoglucanase. A β -glicosidase teve apenas uma isoforma expressa nos três substratos avaliados (farelo de trigo, farelo de soja e mistura de farelo de trigo e bagaço de cana (1:1)).
11. Pelo cruzamento de informações sobre produção e propriedades das celulases produzidas por cada linhagem, pôde-se apontar o extrato produzido por *A. fumigatus* P40M2 com potenciais aplicações na sacarificação de biomassas.
12. Visto que a presente dissertação teve como um dos intuitos avaliar a produção e caracterizar parcialmente as celulases de fungos filamentosos, de forma a estabelecer suas potenciais aplicações industriais, inúmeros desdobramentos podem ser definidos, tomando-se como base os resultados apresentados, objetivando, por exemplo, a elucidação da atuação dos complexos celulásicos, o aumento da produtividade e viabilidade econômica das fermentações, bem como a adequação dos extratos produzidos em aplicações de interesse. Portanto, sugere-se que os seguintes experimentos e análises sejam realizados:
 - melhoria da produção das enzimas hemicelulolíticas por mutação clássica das linhagens fúngicas selecionadas;

- avaliação da produção de enzimas por diferentes polpas de bagaço de cana pré-tratado e indutores visando ampliação de escala;
- avaliação da produção enzimática em Biorreatores para aumentar a escala do processo;
- proteômica das enzimas de interesse e identificação por Maldi-Tof;
- testar o potencial de sacarificação do concentrado enzimático produzido e compará-lo com as enzimas comerciais.

Referências Bibliográficas

ABAD, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 27, p. 155-182, 2010.

ADINARAYANA, et al. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 171-177, 2003.

ADSUL, et al. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 67-72, 2004.

ADSUL, et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 6-10, 2007.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid Substrate Fermentations. *Advance Applied Microbiology*, v. 28, p. 201-237, 1982.

ALEXANDER, M. *Introducción a la microbiología del suelo*. Cidade do México: Libros Y Editoriales, p. 491, 1980.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley, p. 865, 1996.

ANTHONY, et al. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 647-654, 2003.

ARAÚJO et al. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. *Agricultural Biology and Chemistry*, v. 36, p. 1913-1917, 2008.

ARO, et al. ACEII: a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 24309-24314, 2001.

ARISTIDOU, A.; PENTTILA, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 2, p. 187-198, 2000.

AURIA, et al. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, n. 11, p. 1007-1013, 1993.

BHAINSA, K. C.; SOUZA, S. F. Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, p. 650-670, 2009.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p. 551-573, 2008.

_____. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 858-875, 2011.

BALLESTEROS, M. I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, v.39, p. 1843-1848, 2004.

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

_____. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-83, 2000.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 881-896, 2003.

BIELY, P. Biotechnological potencial and production of xylanolytic systems free of cellulases. *Enzyme and biomass conversion*, p. 460-408, 1991.

BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, p. 613-616, 1988.

BOCCHINI, et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.40, p.3653-3659, 2005.

BON, et al. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 506, 2008.

BRIJWANI, et al. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 120-128, 2010.

BURKE, J.D.; MICHAEL, A.B.; WEINTRAUB, N.; CHARLOTTE, C.; HEWINS, R. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 43, n. 4, p. 795-803, 2011.

CABADILLA, et al. Composition, structure and diversity of phyllostomid bat assemblages in different successional stages of a tropical dry forest. *Forest Ecology and Management*, v. 258, n. 6, p. 986-996, 2009.

CAMASSOLA, M. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 22, p. 391-396, 2004.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium achinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2196-2204, 2007.

CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de gabaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) 240f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*, v. 65, p. 70-92, 1998.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal Microbiology*, v. 47, p. 323-328, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 18, p. 295-331, 1998.

CHAUVE, et al. Comparative kinetic analysis of two fungal b-glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, In press, doi: 10.1186/1754-6834-3-3, 2010.

CHEN, H.; QIU, W. Key technologies for bioethanol production from lignocelluloses. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 556–562, 2010.

COELHO, G. D.; CARMONA, E. C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. *Journal Basic Microbiology*, v. 43, p. 267-277, 2003.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. *Microbiological Methods*, London, Editora Butterworth & co Ltd, p.409, 1989.

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

CONAB 2008, Companhia Nacional de Abastecimento. <http://www.conab.gov.br/conabweb/index>. Acessado em 02/10/2008.

CONÇALVES, et al. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 157-163, 2008.

COURI, S.; MERCES, E.P.; NEVES, B.C.V.; SENNA, L.F. Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy*, v. 3, p. 290–297, 2006.

CUNHA, R. T. Avaliação do emprego de celulase de *Myceliophthora thermophila* no processamento têxtil, 247 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA, N. Jr. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, p. 821-834, 2000.

DA SILVA, R. Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp 179-5 e aplicação dessas enzimas. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, Campinas, 1992.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. Beta-glucosidases from five black *Aspergillus* species: Study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 4929-4936, 2000.

DEMIRBAS A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage*, v. 49, p. 2106–2116, 2008.

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

DI LENA, G.; PATRONI, E.; QUAGLIA, G. B. Improving the nutritional value of wheat bran by a white rot fungi. *Journal of Food Science and Technology*, v. 32, p. 513-519, 1997.

DILLON et al. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Applied Microbiol and Cell Physiology*, v. 70, p. 740-746, 2006.

DOCTORFUNGUS. Disponível em: www.doctorfungus.org. Acesso em: 15 maio 2010.

ELLIAH, et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 615-620, 2002.

ELYAS, et al. Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnology*, v. 30, n. 27, p. 347-351, 2010.

FARINAS, et al. Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida Boletim de Pesquisa e desenvolvimento. (<http://www.cnpdia.embrapa.br>), São Carlos, 2008.

FADEL, M. Production physiology of cellulases and β glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *Journal Biology Science*, v. 5, p. 401-411, 2000.

FERRER, M. Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Sociedade Española de Microbiología*, v. 38, p. 11-7, 2004.

FUJIMOTO et al. Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 59, p. 538-540, 1995.

GAO, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GHAREIB M.; EL DEIN, M. M. N. Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 569-576, 1992.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, p. 511-519, 1999.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, p.68-72, 1999.

GODOY, et al. The relation between forest clearance and household income among native Amazonians: Results from the Tsimane' Amazonian panel study, Bolivia. *Ecological Economics*, v. 68, n. 6, p. 1864-1871, 2009.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GUPTE, A.; D. MADAMWAR. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cultivation of *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Progress*, v. 13, p. 166-169, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, v.19, p. 665-667, 1997.

_____.Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters*, v. 20, p. 45-47, 1998.

GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. Aveia: composição química, valor nutricional e processamento. São Paulo: Varela, p. 191, 2000.

GRAMINHA, et al. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v.144, p. 1-22, 2008.

GRIGOREVSKI-LIMA, et al. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. v. 155, p. 321-329, 2009.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-middle and long-term. *Biomass & Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.

HAWKSWORTH, et al. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford: CABI, p. 616, 1995.

HERNÁNDEZ-SALAS, et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HIBBET et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, p. 509-547, 2007.

ILMÉN, et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1298-1306, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2004. Mapa de Biomass e de Vegetação. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acessado em 21/03/09.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, p. 62, 1990.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Disponível em <http://www.iubmb.org>. Acessado em abril 2010.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Key world energy statistics 2008. Paris: OECD/IEA; 2008.

ITAVO, et al. Composição e digestibilidade aparente da silagem de bagaço de laranja. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 5, p. 1485-1490, 2000.

IYAYI, A. E. Changes in the cellulose, sugar and crude protein contents of agro-industrial by-products fermented with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. *African Journal Biotechnology*, v. 3, p. 186-188, 2004.

JAHANGEER , et al., Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pakistan Journal of Botany*, v. 37, p. 739-748, 2005.

JÄGER, et al. Production and characterization of b-glucosidase from different *Aspergillus* strains. *World Journal of Microbiology*, v. 17, p. 455-461, 2001.

JAVED, et al. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.157, p.483-497, 2009.

JUHÁSZ, et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JÚNIOR, F. M. R. S.; PEREIRA, S. V. Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. 2, p. 903-905, 2007.

KALOGERIS, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural waste. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KAMIDA, et al. Biodegradação de Efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Quimica Nova*, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KÄHKÖNEN, M. A.; HAKULINEN, R. Hydrolytic enzyme activities, carbon dioxide production and the growth of litter degrading fungi in different soil layers in a coniferous forest in Northern Finland. *European Journal of Soil Biology*, v. 47, n. 2, p. 108-113, 2011.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*, v. 106, p. 147-150, 2004.

KANG, et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153-156, 2004.

KHENG, P. P.; OMAR, I.C. Xylanase production by a local fungal isolate *Aspergillus niger* USM A11 on solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songkhanakarin Science & Technology*, v. 27, p. 325-336, 2004.

KIM, S.W.; KANG, S.W.; LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 63-67, 1997.

KRISHNA, C. Solid state fermentation systems: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 25, p. 1-30, 2005.

KWON, et al. Detection of b-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

LENARTOVICZ, et al. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, 388-395.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 457-469, 2003.

LEHNINGER, A L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. *Principles of Biochemistry*, Bridgeport: Worth Publishers, 1013 p, 2000.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, p. 1-24, 1997.

LI, et al. Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 111, p. 439-447, 2004.

LIMA, et al. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, p.272-277, 2005.

LIMA, et al. Estudo do potencial sintético de lípases de fungos isolados na Região Amazônica. In *Biocatálise e Biotransformação, Proceedings...*2008, p. 63.

LINDER, M.; TEERI, T. T. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, v. 57, p. 15-28, 1997

LIU et al. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnology*. In press. doi:10.1016/j.nbt.2010.12.003, 2011.

LYND, L. R.; ELANDER, R.T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57, p. 741-761, 1996.

_____. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACIEL, et al. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. *Food Technology Biotechnology*, v.46, p.183-189, 2008.

MAMMA, et al. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. *Journal of Fermentation Technology*, v. 54, p. 267-286, 1976.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dados Estatísticos. Mundo: Principais países produtores, culturas selecionadas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: abril 2010.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method form enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 426-432, 2006.

MARTINS, et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Biosource Technology*, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MEDIGAN; MARTINKO; PARKER. *Biology of microorganisms*, Illinois: 10th edition. Prentice hall, p.624, 2008.

MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 52, p. 97-100, 2003.

MILLER, G. L. Use of Dynitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemical*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, et al. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

NIGAM, P.; SINGH, D. Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzyme production. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 55, p. 457-467, 1996.

OBEROL, et al. Enhanced oil recovery by pre-treatment of mustard seeds using crude enzyme extract obtained from mixed-culture solid-state fermentation of Kinnow (Citrus reticulata) Waste and Wheat Bran. *Food and Bioproducts Processing*, v. 3, n. 4, p. 528-536, 2008.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L;D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp*, v.7, p. 1-19, 2006.

OKAMOTO et al. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsute*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, p. 273-277, 2011.

ORIOLE, E.; SCHETTINO, B.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT, M. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology*, v. 66, p. 57-62, 1988.

PALMAROLA-ANDRADOS, B.; CHOTĚBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology*, v. 96, e. 7, p. 843-850, 2005.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 109-117, 1992.

_____. P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149-161, 1999.

_____.Biotechnological potential of agro-industrial residues. *Bioresource Technology*., v. 74, p. 69-80, 2000.

_____.Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.81-84, 2003.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n.19, p.7563-7569, 2010.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo: Makron Books, v.1, p. 521,1996.

PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Estructure and engineering of celluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 64, p. 25-116, 2011.

PHILIPPIDIS, G.P. Cellulase Production technology. In: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuel Production. (Eds): M. E. Himmel et al., *Proceedings...*1994, p. 566.

PICCOLO, C.; BEZZO, F. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocelluloses. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 478-491, 2009.

POLINUTRI ALIMENTOS LTDA. Farelo de Soja: processamento e qualidade, 2001. Endereço eletrônico: http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_janeiro.htm. Acessado em: 25/05/2010.

POLIZELI, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 67, p. 577-591, 2005.

POORNA, C. A.; PREMA, P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 98: 485-490, 2007.

PRADE, R. A.; BOHNERT, H. J. *Genomics of plants and fungi*. Illinois: Ebooks Corporation, p. 440, 2003.

PRADE, et al. Diversidade de fungos filamentosos e microscópicos do solo em uma plantação de *Hovenia dulcis* Thumb. *Revista Biociência*, v. 14, n. 2, p. 101-106, 2006

PRASAD, et al. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. *Resource Conservation Recycling*, v.50, p. 1-39, 2007.

PRASERTSAN, et al. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 13, p. 555-559, 1997.

RABALHO, A. A. Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: Produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

RAY et al. Brown rot fungal early stage decay mechanism as a biological pretreatment for softwood biomass in biofuel production. *Biomass and bioenergy*, v. 34, p. 1257- 1262, 2010.

RESHAMWALA, S.; SHAWKY B. T.; DALE, B. E. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 51, p. 43-55, 1995.

RIDDER, E. R.; NOKES, S. E.; KNUTSON, B. L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. *American Society of Agricultural Engineers*, v. 42, p.1785-1790, 1999.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, p. 61-66, 2010.

RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, p. 211-219, 2005.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Editora Manole, v.2, 1991.

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

SAQIB, et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*, v. 45, p. 641-646, 2009.

SAHA, et al. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 816- 822, 2005.

SAKUMARAN, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421-424, 2009.

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

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.

SCHAECHTER, M.; INGRAHAM, J. L.; NEIDHARDT, L. C. *Micróbio, uma visão geral*. Ed. Artmed, v. 1, p. 528, 2010.

SCHMIDELL, et al. *Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 516, 2001.

SENTHILKUMAR, et al. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresource Technology*, v. 96, p.1380- 1386, 2005.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1763–1771, 2005.

SIDDIQUI, et al. Stability and identification of the active-site residues of carboxymethylcellulases from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, v. 42, p. 312-318, 1997.

SILVA, A. G. Algodão, amendoim e soja. In: Simpósio sobre nutrição de bovinos, Piracicaba: FEALQ, Piracicaba, SP, v. 6, *Proceedings...*1995, p. 47-72.

SILVA, et al. Purification and Characterization of a Lower Molecular Weight Xylanase From Solid-State Cultures of *Aspergillus Fumigatus* Fresenius. *Reviews Microbiology*, v. 30, p. 114-119, 1999.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz composição e propriedades. *Óleos & Grãos*, p. 34-42, 2001.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. M. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, p. 27-32, 2007.

SMITH, D. C.; WOOD, T. M. Xylanase production of *Aspergillus awamori* development of medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extra cellular xylanase of β -xylosidase while maintaining low protease production. *Journal Biotechnology Bioenergy*, v. 38, p.838-90, 1991.

SINGHANIA et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

_____.Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOCOL, et al. Comparative Production of Amylase and Protein Enrichment of Raw and Cooked Cassava By *Rhizopus* Strains in Submerged and Solid State Fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, v. 3, p. 320-323, 1994.

SOHAIL et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SONE, et al. Localization and optimization of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. *Journal Biotechnology*, v. 73, p. 43-51, 1999.

SONI et al. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 277-283, 2010.

SOUZA, H. K.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 1-9, 2008.

STRYER, L. Biochemistry. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, p. 131-135, 1996.

SREENATH, et al. Ethanol production from alfafa fiber fractions by saccharification and fermentation. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 1199-1204, 2001.

STEINER, G.; SOCHA, C.; EYZAGUIRRE, J. Culture conditions for enhanced cellulases productions by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF though process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.142, 60-70, 1994,

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

SUN, et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUN, X.; LI, Z. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 119-128, 2008.

SUN, et al. Lignin vs. enzyme hydrolysis. *Bioresources*, v. 6, p. 317-328, 2011.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p. 169-179, 2003.

TECHAPUN, et al. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1327-1340, 2003.

THIEME, et al. Freshwater conservation planning in data-poor areas: an example from a remote Amazonian basin (Madre de Dios River, Peru and Bolivia). *Biological Conservation*, p. 484-501, 2007.

THYGESSEN, et al. Production of cellulose and hemicellulose degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet oxidized wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 606-615, 2003.

TSAO, et al. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 743-749, 2000.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA, <http://www.portalunica.com.br>. Acessado em 02/01/2009.

VANDAMME, E. J.; LOGGHE, J. M.; GEERAERTS, H. A. M. Cellulase activity of a thermophilic *Aspergillus fumigatus* (fresenius) strain. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 32, p. 968-974, 1982.

VAN WYK, J. P. H. Thermostability of cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 385, 397, 1997.

VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 5500-5513, 2001.

YANG, et al. High level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 97, p.1794-1800, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology Bioenergy*, v. 88, p. 797-824, 2004.

_____. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481, 2006.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 295–299, 2009.

WORKMAN, W. E.; DAY, D. F. Purification and properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreu*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 44, p. 1289-1295, 1982.