

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Microrganismos Produtores de Celulases:
Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.**

Camila Florencio

São Carlos
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Microrganismos Produtores de Celulases:
Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.**

Camila Florencio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Prof^a. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende

São Carlos

2011

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

F632mp

Florencio, Camila.

Microrganismos produtores de celulases : seleção de isolados de *Trichoderma* spp. / Camila Florencio. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

83 f.

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

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Microorganismos. 4. Fermentação. 5. Bagaço de cana. I. Título.

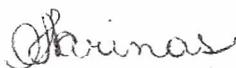
CDD: 660.6 (20^a)

Camila Florencio

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: 27/06/2011

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Cristiane Sanches Farinas (Orientadora)
(EMBRAPA)



Prof.^a. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins
(UNESP)



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
(DEQ/UFSCar)

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes de minha vida: Minha Família (Pai, Mãe e Irmã). Pessoas que fazem a diferença, sem as quais de nada vale o esforço de tentar ser alguém cada dia melhor.

AGRADECIMENTOS

É gratificante passar por uma jornada dessas e ter tanto a agradecer e querer a tanto homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes, do nosso lado. Por isso meus sinceros agradecimentos a...

- A Deus por permitir concluir mais etapa de minha caminhada com saúde e sucesso.
- À Dra. Cristiane Sanchez Farinas pela oportunidade concedida, orientação e apoio o que tornou possível a concretização deste projeto.
- À Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende por ter sido a segunda orientadora.
- A Embrapa Meio Ambiente e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas linhagens doadas para a realização do trabalho.
- Aos Professores de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, pelas disciplinas oferecidas e a funcionária da secretaria, Claudia, pela ajuda durante todo o período de mestrado.
- A todos os funcionários da Embrapa Instrumentação pela valiosa colaboração. Especialmente aos funcionários dos laboratórios, Joana, Silviane e René pela ajuda e profissionalismo nas etapas práticas desenvolvidas no trabalho.
- A todos os amigos e colegas do Laboratório de Agroenergia pelo companheirismo e participação no desenvolvimento do trabalho experimental. Principalmente à Daiane, Fernanda, Rodrigo, Ursula e Viviane pela paciência diante dos momentos difíceis.
- Minha gratidão enorme mais uma vez a minha família pelo apoio em todos os momentos decisivos de minha vida. Meus pais, Jurandir e Lourdes, pelo imenso amor dedicado, constante incentivo, enorme compreensão, confortável força, infinita sabedoria e paciência, eterno exemplo. A minha irmã, Natalia, por ser fonte de estímulo e auto-estima.
- Ao Rodrigo Pereira Lopes pelo companheirismo e compreensão frente a todo o período de realização da pesquisa, onde várias vezes recarreguei minhas forças.
- A FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa.
- Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.
- A UFSCar e Embrapa Instrumentação pela oportunidade concedida.
- A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	8
Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Enzimas Celulolíticas.....	15
3.1.1 Endoglucanases.....	18
3.1.2 Exoglucanases.....	18
3.1.3 β-glicosidades.....	19
3.1.4 Enzimas Hemicelulolíticas - Xilanases.....	19
3.2 Microorganismos Produtores de Celulases.....	20
3.2.1 Fungos Filamentosos do Gênero <i>Trichoderma</i>	22
3.2.2 Gênero <i>Trichoderma</i> e a Produção de Celulases.....	23
3.3 Técnicas de <i>Screening</i>	25
3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	27
3.4.1 Substrato Sólido para FES.....	28
3.4.2 Fatores que influenciam a FES.....	29
3.4.3 FES na Produção de Celulases.....	31
3.5 Materiais Lignocelulósicos (Biomassa).....	32
4 MATERIAL e MÉTODOS	35
4.1 Isolados de Fungos.....	35
4.2 Meios de Cultura.....	37
4.2.1 Meio para Manutenção Celular.....	37
4.2.2 Meio para Triagem em placa de Petri.....	37
4.2.3 Meio para Teste Vermelho Congo.....	38
4.3 Teste do vermelho Congo.....	38
4.4 Fermentação em Tubos de Ensaio.....	39
4.5 FES em frascos Erlenmeyers.....	40
4.5.1 Extração das celulases.....	41
4.6 Cinética de Produção em FES.....	42

4.7	Delineamentos Experimentais.....	43
4.7.1	Seleção das condições das FES.....	43
4.7.2	Delineamento Composto Central Rotacional.....	44
4.7.3	Estudo da variável umidade por <i>T. reesei</i> RUT C30.....	45
4.8	Determinações Quantitativas.....	45
4.8.1	Atividade CMCase (Endo-1,4-β-D-glucanase).....	46
4.8.2	Atividade FPase.....	46
4.8.3	Atividade Xilanase.....	47
4.8.4	Determinação de açúcares redutores por DNS.....	47
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	48
5.1	Triagem em meio AVICEL.....	48
5.2	Teste Vermelho Congo.....	50
5.3	Fermentação em Tubos de Ensaio.....	54
5.4	Cinética de Produção em FES.....	59
5.5	Delineamentos Experimentais.....	60
5.5.1	Seleção das condições das FES.....	60
5.5.2	Delineamento Composto Central Rotacional.....	62
5.5.3	Estudo da Variável Umidade com <i>T. reesei</i> RUT C30.....	66
5.6	Fermentação em estado sólido em frascos Erlenmeyers.....	67
6	CONCLUSÕES.....	72
7	PRÓXIMAS ETAPAS.....	73
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	<i>Ação Sinérgica das celulasas. Adaptado de Arantes e Sandler (2007).....</i>	17
Figura 3.2	<i>Representação da molécula de celulose, dando destaque aos terminais redutores e não-redutores. Adaptado Ramos (2003).....</i>	19
Figura 3.3	<i>Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos. Adaptado Hölker e Lenz (2005).....</i>	22
Figura 3.4	<i>Aspecto verde brilhante dos micélios da espécie Trichoderma. a) T. reesei e b) T. atroviride. Adaptado de Schuster e Schmoll (2010).....</i>	23
Figura 3.5	<i>Estrutura recalcitrante de biomassas lignocelulósicas e Apresentação das frações poliméricas: celulose, hemicelulose se lignina. Adaptado de Rubin (2008).....</i>	33
Figura 3.6	<i>Estrutura de uma fibra vegetal e a subdivisão da parede celular. Adaptado de Silva. (2009).....</i>	35
Figura 4.1	<i>Cultivo em placa de Petri de algumas das linhagens utilizadas. (a): T. asperelum CEN 201; (b): T. harzianum CEN 202; (c): T. pseudokoningii CEN 209; (d): T. harzianum CEN 223.....</i>	37
Figura 4.2	<i>Estrutura do corante vermelho congo. Adaptado de Castro (2006).....</i>	39
Figura 4.3	<i>Fermentação líquida com substrato insolúvel em tubos de ensaio.....</i>	40
Figura 4.4	<i>Câmara de Neubauer para contagem de esporos</i>	41
Figura 5.1	<i>Linhagens avaliadas com substrato celulósico Avicel. (a): T. harzianum. CEN 139; (b) T. sp. CEN 167; (c) T. harzianum CEN 155; (d) T. reesei RUT C30.....</i>	48
Figura 5.2	<i>Linhagens avaliadas que não apresentaram capacidade de degradação do substrato celulósico, Avicel. (a): T. sp. CG 90; (b): T. sp. CG 112; (c): T. sp. CG 109; (d): T. sp. CG 07.....</i>	50
Figura 5.3	<i>Observação dos halos da colônia e de hidrólise após e coloração com o corante vermelho Congo. (a): T. sp. CG 71; (b): T. sp. CG 88; (c) T. harzianum CEN 237; (d): T. reesei RUT C30.....</i>	51
Figura 5.4	<i>Observação da linhagem Trichoderma sp. CG 87, que não apresentou halo de hidrólise do substrato celulósico.....</i>	52
Figura 5.5	<i>Fermentação líquida com substrato insolúvel. T. harzianum CEN 139; T. harzianum CEN 155; T. harzianum CEN 202; T. atroviride CEN 223.....</i>	55

Figura 5.6	Produção de CMCase por fermentação em tubos. (-●-) <i>T. harzianum</i> CEN 139; (-□-) <i>T. harzianum</i> CEN 155; (-◆-) <i>T. sp</i> 104 NH; (-■-) <i>T. reesei</i> Rut C30; (-▣-) <i>T. asperelum</i> CEN 201; (-✱-) <i>T. harzianum</i> CEN 241; (-◇-) <i>T. harzianum</i> CEN 248; (-○-) <i>T. harzianum</i> CEN 238; (-◻-) <i>T. sp</i> CEN 156; (-△-) <i>T. koningii</i> CEN 142; (-◇-) <i>T. sp</i> CEN 159.....	56
Figura 5.7	Produção de Xilanase por fermentação em tubos. (-●-) <i>T. harzianum</i> CEN 139; (-□-) <i>T. harzianum</i> CEN 155; (-◆-) <i>T. sp</i> 104 NH; (-■-) <i>T. reesei</i> Rut C30; (-▣-) <i>T. asperelum</i> CEN 201; (-✱-) <i>T. harzianum</i> CEN 241; (-◇-) <i>T. harzianum</i> CEN 248; (-○-) <i>T. harzianum</i> CEN 238; (-◻-) <i>T. sp</i> CEN 156; (-△-) <i>T. koningii</i> CEN 142; (-◇-) <i>T. sp</i> CEN 159.....	57
Figura 5.8	Produção de FPase por fermentação em tubos. (-●-) <i>T. harzianum</i> CEN 139; (-□-) <i>T. harzianum</i> CEN 155; (-◆-) <i>T. sp</i> 104 NH; (-■-) <i>T. reesei</i> Rut C30; (-▣-) <i>T. asperelum</i> CEN 201; (-✱-) <i>T. harzianum</i> CEN 241; (-◇-) <i>T. harzianum</i> CEN 248; (-○-) <i>T. harzianum</i> CEN 238; (-◻-) <i>T. sp</i> CEN 156; (-△-) <i>T. koningii</i> CEN 142; (-◇-) <i>T. sp</i> CEN 159.....	58
Figura 5.9	Avaliação da máxima produção de CMCase por tempo. (-◆-) <i>Trichoderma sp</i> LCB 79 com produção de 4,83 UI.g ⁻¹ ; (-◆-) <i>Trichoderma sp</i> LCB 46 com produção de 5,95 UI.g ⁻¹	59
Figura 6.0	Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com p≤0,05.....	62
Figura 6.1	B Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade e proporção BC.....	65
Figura 6.2	Atividade CMCase em diferentes níveis de umidade pó <i>T. reesei</i> RUT C30.....	66
Figura 6.3	Resultados das Atividades CMCásica obtidas por FES.....	67
Figura 6.4	Resultados das Atividades Xilanásica obtidas por FES.....	68
Figura 6.5	Resultados das Atividades FPásica obtidas por FES.....	70
Figura 6.6	a) Produção de CMCase (UI.g ⁻¹) das 3 linhagens de <i>Trichoderma</i> , incluindo <i>T. reesei</i> RUT C30 como referência e os í.e. de cada linhagem respectivamente. b) Produção de Xilanase (UI.g ⁻¹) e os í.e. c) Produção de FPase (UI.g ⁻¹) e os í.e.. Os pontos individuais representam a média de dois experimentos independentes e a linha reta representa o ajuste da regressão linear.....	71

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 4.1</i>	<i>Linhagens estudadas durante o processo de avaliação do potencial celulolítico.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4.2</i>	<i>Composição do meio para fermentação em placas de Petri.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4.3</i>	<i>Composição do meio para FES em frascos Erlenmeyer.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 4.4</i>	<i>Linhagens de Trichoderma utilizados no processo cinético da FES.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 4.5</i>	<i>Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2³ completo.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 4.6</i>	<i>Matriz do planejamento fatorial 2³ completo.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 4.7</i>	<i>Variáveis e níveis do delineamento composto central rotacional da FES.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 5.1</i>	<i>Cálculo dos Índices Enzimáticos dos fungos filamentosos do gênero Trichoderma.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 5.2</i>	<i>Planejamento fatorial 2³ completo com as atividade da CMCase (UI.g⁻¹)</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 5.3</i>	<i>Variáveis consideradas significativas através dos efeitos e p-valor</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 5.4</i>	<i>Níveis de BC/FT, umidade e atividades de CMCase (UI.g⁻¹).....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 5.5</i>	<i>Resultados do efeito estimado, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade da CMCase.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 5.6</i>	<i>Análise de variância (ANOVA) das respostas da proporção BC e umidade.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 5.7</i>	<i>Variáveis consideradas significativas através dos coeficientes de regressão e p-valor, com exclusão dos termos não significativos.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 5.8</i>	<i>Comparação nos valores de Produção de CMCase por Trichoderma em FES.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 5.9</i>	<i>Comparação nos valores de Produção de Xilanase por Trichoderma em FES</i>	<i>69</i>
<i>Figura 6.0</i>	<i>Comparação nos valores de Produção de FPase por Trichoderma em FES</i>	<i>70</i>

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
atm	Atmosfera
Aw	Atividade de água
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BG	β -glicosidase
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CA	Casca de Arroz
CBHs	Celobiohidrolases
cm	Centímetro(s)
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CS	Casca de Soja
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	(Ácido) Dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Pesquisa Agropecuária
EGase, EG	Endoglucanase
ExGase	Exoglucanase
FA	Farelo de Arroz
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of The United Nations
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo
FES	Fermentação em Estado Sólido
FPase	Filter Paper Hydrolases
FS	Farelo de Soja
FSm	Fermentação Submersa
FT	Farelo de trigo
g	Gramas
GHs	Glucanohidrolases
GP	Grau de Polimerização
h	Hora(s)
i.e.	Índice enzimático
L	Litro
mg	Miligrama
mH ₂ O	Massa de água

min	Minuto(s)
mL	Mililitro
ms	Massa de substrato seco
nm	Nanômetro
p	p-valor
PC	Polpa Cítrica
PDA	Potato Dextrose Agar
rpm	Rotações por minuto
spp	Espécies
UI	Unidade Internacional
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
μmol	Micromol

RESUMO

A busca por microrganismos produtores de enzimas celulolíticas é uma etapa de suma importância para contribuir com a viabilização da rota biológica de produção de etanol lignocelulósico. Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* se destacam pela alta produção enzimática exibida. Dada a crescente demanda pelo desenvolvimento de processos que reduzam os custos das celulases, foi proposto o presente trabalho que tem como objetivo avaliar e selecionar isolados de fungos filamentosos *Trichoderma*, disponíveis nos bancos da Embrapa, capazes de produzir altas concentrações de enzimas do complexo celulolítico. A metodologia desenvolvida no projeto foi dividida em quatro etapas até a seleção final das melhores linhagens. A primeira etapa de avaliação consistiu na observação do crescimento das 78 linhagens isoladas de *Trichoderma*, a partir da degradação do substrato microcelulósico cristalino, Avicel. A segunda etapa de seleção, o teste do vermelho congo, resumiu-se na determinação do halo de hidrólise e na medida do índice enzimático (diâmetro halo hidrólise. diâmetro halo colônia⁻¹) de cada linhagem. Na terceira etapa foram avaliadas as linhagens com maior potencial produtor de celulases na fermentação em tubos de ensaio, para as enzimas CMCase, Xilanase e FPase. A última etapa de avaliação e seleção das linhagens foi o processo de fermentação em estado sólido (FES). Na primeira etapa de seleção, 49 linhagens apresentaram capacidade de metabolizar o substrato celulósico cristalino, Avicel. O teste do vermelho congo, segunda etapa, selecionou as dez melhores linhagens com índices enzimáticos obtidos acima de 1,50, que variaram de 1,51 a 1,90. No processo de fermentação em tubos de ensaio foram selecionadas três linhagens com a melhor produção de enzimas entre as dez selecionadas no teste do vermelho Congo, *T. harzianum* CEN 139, *T. harzianum* CEN 155 e *T. sp* CG 104NH. Para avaliação da produção enzimática em FES realizou-se inicialmente um planejamento experimental fatorial para selecionar as variáveis significativas no processo. As variáveis estudadas foram: concentração do inóculo, umidade e proporção de bagaço de cana (BC). Após a análise enzimática de CMCase observou-se apenas a proporção de BC como variável significativa. A partir deste resultado, foi realizado um delineamento composto central rotacional com os parâmetros fermentativos: proporção de BC e umidade. A proporção de BC foi significativa e a atividade enzimática alcançou 11,16 UI.g⁻¹ de CMCase. O processo de FES, dentre três linhagens avaliadas, selecionou *T. sp* CG 104NH como a melhor produtora de CMCase, Xilanase e FPase, com valores de 25,93 UI.g⁻¹, 67,17 UI.g⁻¹ e 1,87 UI.g⁻¹, respectivamente. O coeficiente de correlação entre este processo (FES) e o teste vermelho Congo foi R² = 0,97, 0,98 e 0,97 para as três enzimas estudadas, CMCase, Xilanase e FPase, respectivamente. Obtendo uma correlação linear entre estas duas metodologias. As etapas de seleção avaliadas neste trabalho foram consideradas efetivas, as seleções qualitativas se mostraram rápidas para seleção de um extenso banco de fungos. A correlação direta apresentada entre os ensaios com vermelho Congo e FES indicam que é possível a utilização da combinação entre métodos qualitativos e quantitativos para a avaliação da capacidade de produção de celulases por fungos filamentosos.

Palavras-chave: Microrganismos. *Trichoderma*. Celulases. Fermentação em estado sólido. Bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The search for microorganism that produces cellulolytic enzymes is of the great importance in contributing to the viability of biological route for the production of cellulosic ethanol. Among filamentous fungi, the genus *Trichoderma* is characterized as a high enzyme producer. Given the growing demand for the development of processes that reduce the cost of cellulases had been proposed this work which aims to evaluate and select strains of filamentous fungi *Trichoderma*, available at Embrapa banks, capable of producing high concentrations of complex cellulolytic enzymes. The methodology developed in the project was divided in four steps until the final selection of the best strains. The first step of evaluation consisted in the observation of the growth of 78 pre-selected strains of *Trichoderma* from the degradation of microcrystalline cellulose, Avicel. The second step of selection, Congo red test, summarized in the determination of halo hydrolysis and the measurement of enzymatic index (diameter of halo hydrolysis. diameter halo colony⁻¹) of each strain. The third stage was evaluated the strains with greater potential to produce cellulases in fermentation test tubes for the enzymes CMCase, Xylanase e FPase. The last stage of evaluate and select of strains was solid-state fermentation (SSF). In the first step of selection, 49 strains showed the ability to metabolize the substrate microcrystalline cellulose, Avicel. The Congo red test, the second step, selected the ten best strains obtained with enzymatic indexes above 1.50, ranging from 1.51 to 1.90. In the process of fermentation in tubes were selected three strains with the better production of enzymes among the ten selected on Congo red test, *T. harzianum* CEN 139, *T. harzianum* CEN 155 and *T. sp* CG 104NH. For evaluation the enzymatic production in SSF was held initially a factorial experimental design to select the significant variables in the process. The variables studied were: inoculum concentration, moisture and proportion of sugarcane bagasse. After the CMCase enzyme analysis was observed the proportion of sugarcane bagasse as a significant variable. From this result it was performed a central composite design for the improvement of fermentative parameters: the proportion of bagasse and moisture. The proportion of bagasse was significant and enzyme activity reached 11.16 UI.g⁻¹ to CMCase. The process of SSF, among three tested strains, selected *T. sp* CG 104NH as the best producer of CMCase, Xylanase and FPase, with values of 25.93 UI.g⁻¹, 67.17 UI.g⁻¹ and 1.87 UI.g⁻¹, respectively. The correlation coefficient between this process (SSF) and Congo red test was R² = 0.97, 0.98 and 0.97 for the three enzymes studied, CMCase, Xylanase and FPase respectively. Therefore, it was possible to obtain a linear correlation between these two methodologies. The selection steps evaluated in this study were considered effective, quality selections proved quick selection of an extensive database of fungi. The linear correlation between the tests made with red Congo and SSF indicate that is possible to use the combination of qualitative and quantitative methods to assess the ability of cellulase production by filamentous fungi.

Keywords: Microorganisms. *Trichoderma*. Cellulases. Solid-State Fermentation. Sugarcane bagasse.

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, pigmentos, aromas, agentes de controle biológico de pragas, antibióticos, dentre outros. Alguns desses bioprodutos podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil.

Dentre um dos principais produtos representantes dos processos biotecnológicos figuram as enzimas, as quais são produzidas comercialmente, na maioria dos processos, a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade e controle operacional, e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as celulasas, utilizadas como enzimas chave na bioconversão de materiais celulósicos (CHANDRA et al., 2010).

O substancial aumento do interesse na produção de celulasas, devido principalmente às instabilidades na obtenção de combustíveis fósseis, promoveu a identificação e melhoramento genético de dezenas de microrganismos produtores destas enzimas. 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, ao aumento da expressão de celulasas por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes celulósicos, ao entendimento sobre mecanismos de ataque à celulose, clonagem e expressão de genes, determinação de estruturas tridimensionais das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (BHAT e BHAT, 1997).

As pesquisas que buscam enzimas eficientes que atuem na degradação da biomassa e também os microrganismos que produzam essas enzimas levaram ao isolamento dos fungos do gênero *Trichoderma*. O isolamento desses fungos ocorreu a partir de fontes inesperadas como baratas (YODER et al., 2008), mexilhões, moluscos marinhos e crustáceos (SALLENAVE et al., 1999; SALLENAVE-NAMONT et al., 2000). Atualmente, as espécies de fungos mais estudadas que produzem enzimas do complexo celulásico são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens*.

A espécie *Trichoderma reesei* é o fungo celulolítico melhor caracterizado e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases e hemicelulases (BÉGUIN e AUBERT, 1994; KING et al.; 2009; ROCHA, 2010). E como um produtor em potencial de celulases, a pesquisa com fungos do gênero *Trichoderma* é hoje em dia focada particularmente no aumento da eficiência da produção do coquetel enzimático, com a finalidade de reduzir os custos totais na produção de bioetanol a partir de materiais celulósicos (KUMAR et al., 2008), embora aplicações na indústria de polpa e papel (BUCHERT et al., 1998) e na indústria têxtil também sejam importantes (GALANTE et al., 1998).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo eficiente para a produção de celulases utilizando fungos filamentosos, em virtude da adaptação microbiana, além de desempenhar um papel de destaque no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. A FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, de agregar valor a essas matérias-primas (ROCHA, 2010). Como estratégia, visando a economia do processo, adotou-se neste trabalho a FES como tecnologia para a produção enzimática e a utilização do bagaço de cana-de-açúcar (BC) como fonte de carbono e suporte para o microrganismo fermentativo.

Espécies do gênero *Trichoderma* são potenciais produtores de celulases no processo da FES, pois a cultura de superfície sólida é o ambiente natural dos fungos, o que torna mais fácil de conservar e controlar o ciclo morfológico desses microrganismos. Assim, a partir do cultivo de linhagens selecionadas de fungos do gênero *Trichoderma*, espera-se contribuir para aumentar a eficiência da produção das enzimas necessárias no processamento dos biocombustíveis de 2ª geração a partir de resíduos lignocelulósicos, visto que a necessidade de pesquisas tecnológicas relacionadas ao elevado custo das enzimas celulolíticas, representa um dos maiores obstáculos para a efetiva inclusão do etanol celulósico na matriz energética mundial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar e selecionar isolados de fungos *Trichoderma* spp pertencentes às micotecas da Embrapa, com base na capacidade de alta produção de enzimas do complexo celulolítico.

2.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar linhagens fúngicas capazes de crescer em meio contendo Avicel como única fonte de carbono;
2. Realizar o teste de hidrólise através da metodologia de coloração com Vermelho Congo nas linhagens selecionadas para determinação do índice enzimático;
3. Realizar fermentação em tubos de ensaio para avaliar a atividade enzimática (CMCase, Xilanase e FPase);
4. Selecionar as linhagens com as melhores atividades celulolíticas para atuar como agentes produtores de enzimas na fermentação em estado sólido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas Celulolíticas

As enzimas são catalisadores biológicos muito potentes e eficazes. Uma das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos, é a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato. Como catalisadores, as enzimas atuam em pequena quantidade e podem ser recuperadas, dependendo das condições de tratamento utilizados. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. As seis classes representativas das enzimas industriais são: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis (ROCHA, 2010).

Entre as enzimas de interesse industrial as fitases, amilases, inulinasas, celulases, proteases, galactosidases, lipases e lacases representam importantes insumos intermediários nas indústrias químicas, alimentares, têxteis, entre outras (SINGHANIA et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2004; RAMACHANDRAN et al., 2005; RODRÍGUEZ-COUTO et al., 2004).

Celulases, pertencentes à classe de hidrolases, são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON e HAHN-HAGERDAL, 1996; CASTRO e PEREIRA, 2010).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: a) Endoglucanases (EGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e c) β -glicosidases (β Gases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND et al., 2002). Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulósico 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. A Figura 3.1 ilustra a ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico.

Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6. A etapa de despolimerização realizada por EGases e ExGases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobiose em glicose pelas β -glicosidases, embora algumas β -glicosidases também hidrolisem celodextrinas (ZHANG e LYND, 2004).

As celulases possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997). O mercado de celulases deverá expandir-se dramaticamente quando as celulases forem usadas para hidrolisar materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares, que podem ser fermentados para *commodities* como o etanol de 2ª geração e produtos com base biológica em larga escala (CHERRY e FIDANTSEF, 2003; HIMMEL et al., 1999; VAN BEILEN e LI, 2002).

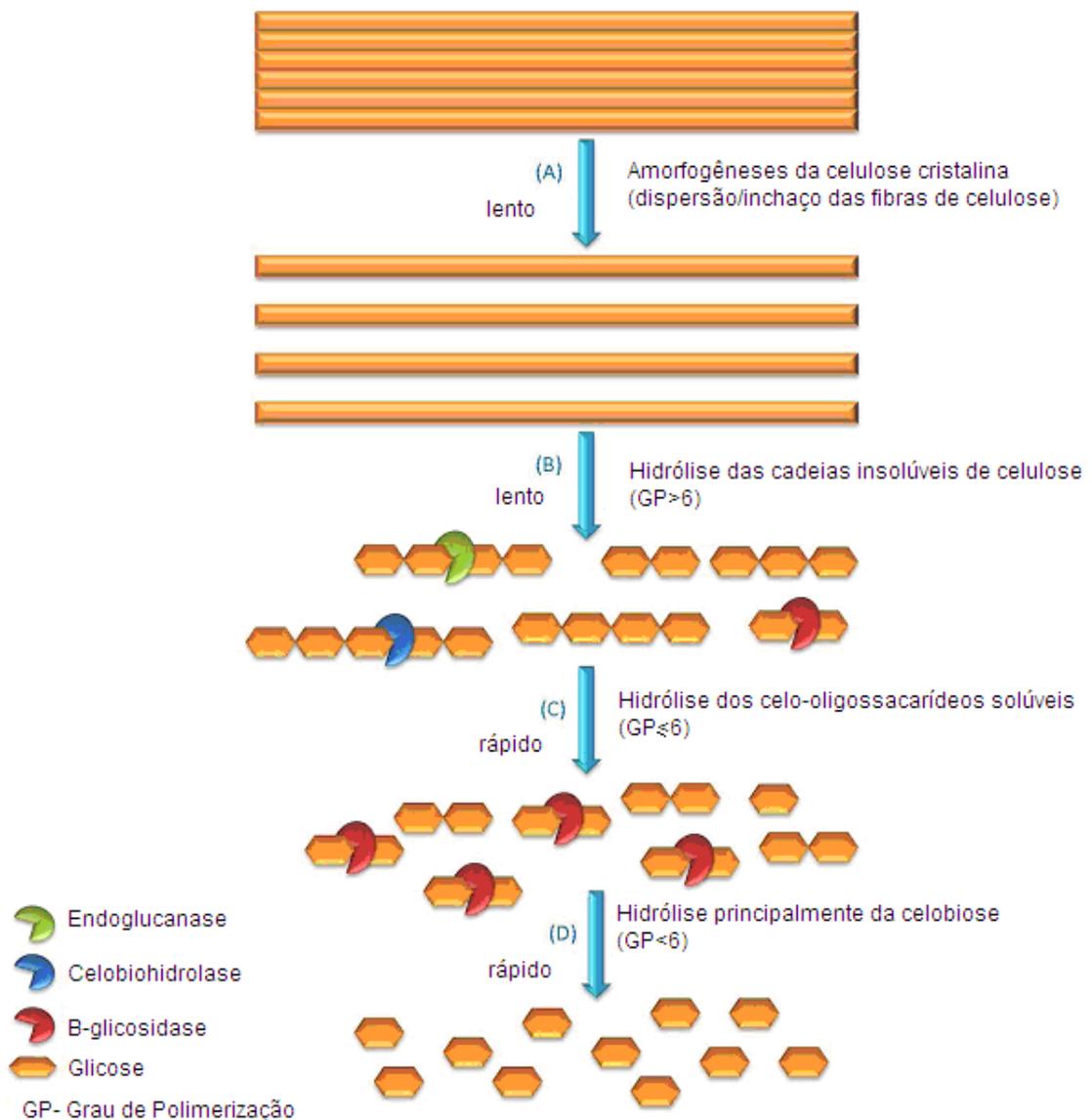


Figura 3.1. Ação sinérgica das celulases. Adaptado de Arantes e Sadler (2010).

As enzimas do complexo celulolítico são centrais para a transformação da biomassa e produção de etanol e bioprodutos. O alto custo destas enzimas, porém, apresenta um obstáculo significativo à comercialização de etanol e produtos químicos. Devido à heterogeneidade e complexidade da biomassa lignocelulósica, a bioconversão requer múltiplas atividades enzimáticas. Um sistema de enzimas eficiente e de baixo custo deveria conter atividades balanceadas de celulases (endo, exoglucanases e β -glicosidade), xilanase, entre outras (BRIJWANI et al., 2010). A redução dos custos das enzimas será importante para seu uso comercial em biorrefinarias. Estratégias baseadas no uso de celulases em biorrefinarias para um processamento econômico incluem: aumento da produtividade volumétrica das enzimas comerciais, produção das enzimas utilizando substrato mais baratos,

produção de coquetéis enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos, além de produzir celulasas com maior atividade específica sobre substratos sólidos (ZHANG et al., 2006).

3.1.1 Endoglucanases

As endoglucanases (EGases) são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND et al., 2002). As EGases são as enzimas celulolíticas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO e TAN, 2002; ZHANG et al., 2006).

3.1.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). Essas enzimas, embora pouco reportadas, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). Essas enzimas atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002). As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG e LYND, 2004).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores (Figura 3.2). As CBHs sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β -glicosidades (BON et al., 2008).

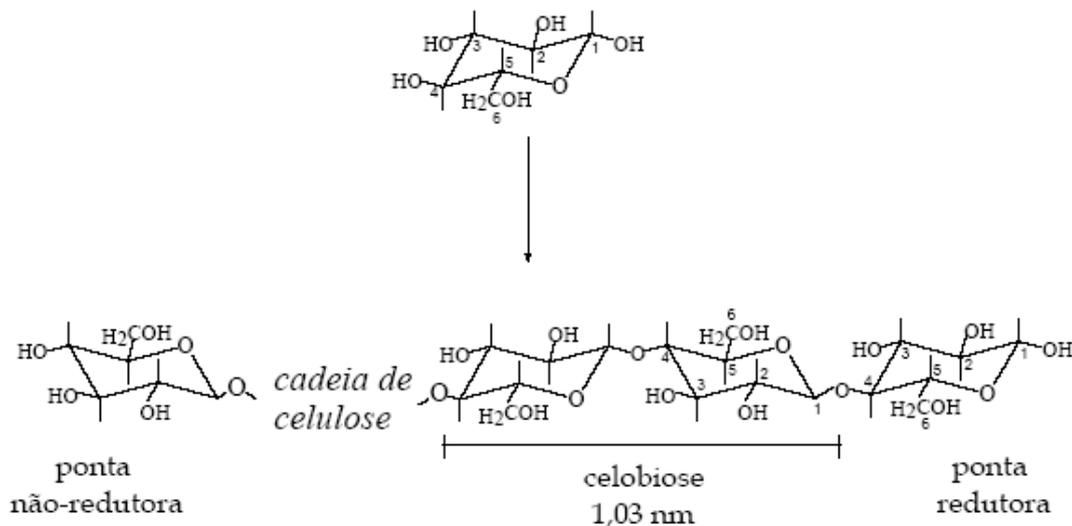


Figura 3.2. Representação da molécula de celulose, dando destaque aos terminais redutores e não redutores. Adaptado Ramos (2003).

3.1.3 β -glicosidades

As enzimas β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, possuem propriedade de hidrolisar celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002; LYND e ZANG, 2002), reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002), além de aumentar o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008). Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

3.1.4 Enzimas Hemicelulolíticas - Xilanases

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas também chamadas de enzimas acessórias ou auxiliares. Estas enzimas são responsáveis pela desestruturação das fortes ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose. Especificamente as xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). A hidrólise realizada por estas enzimas dentro da cadeia da xilana produz xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidade (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2000). Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente, xilana), formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas

microbiais específicas. A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo β -1,4 xilanase (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993).

3.2 Microrganismos Produtores de Celulases

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glucanases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON e CHAMBLISS, 1989). As celulases podem ser produzidas por uma grande gama de microrganismos, que inclui bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Romimococcus*, etc) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002; PALOMER et al., 2004).

Ten e colaboradores. (2004) realizaram estudos com bactérias aeróbicas, anaeróbicas e actinomicetos capazes de degradar celulose e hemicelulose, essa capacidade foi observada através de ensaios em placas utilizando substratos cromogênicos insolúveis. Seleccionadas as bactérias produtoras de celulases, como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas* entre outras, as enzimas xilanase e FPase, tiveram suas atividades quantificadas. Os resultados deste estudo permitiram aos autores observar que o diâmetro do halo de hidrólise serve para prever o rendimento da enzima como uma ajuda para o processo de seleção dos microrganismos capazes de degradar polissacarídeos. Estudos realizados por Herrera e colaboradores. (2007) avaliaram a expressão diferencial de celulases e xilanas por *Cellulomonas flavigena* crescendo em diferentes fontes de carbono. Essa espécie de bactéria secreta um complexo com várias enzimas celulolíticas, que hidrolisam sinergisticamente celulose e hemicelulose (RAJOKA et al., 2005). Os resultados obtidos nesse estudo confirmaram a produção e segregação de uma ampla gama de enzimas por *Cellulomonas flavigena* usando diferentes substratos lignocelulósicos.

Estudos realizados por De Vries e Visser (2001), trazem uma revisão de trabalhos com enzimas do gênero *Aspergillus* envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas e concluem que as enzimas produzidas por este tipo de fungo filamentoso são proteínas altamente glicosiladas. Tao e colaboradores (2010) estudaram a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por um fungo filamentoso, da espécie *Aspergillus glaucus* XC9, esse processo permitiu a produção de endoglucanases que posteriormente foram purificadas. Existem também

estudos que utilizam simultaneamente dois fungos filamentosos na produção de enzimas, como é o caso de trabalhos desenvolvidos por Gutierrez-Correa e Tengerty (1997) e Deshpande e colaboradores (2008) que utilizando cultura mista de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* para a produção de celulases por fermentação em estado sólido apresentaram produções maiores dessas enzimas do que utilizando os fungos filamentosos separadamente.

Dentre todos os microrganismos produtores de celulases citados anteriormente, os fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial. Suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes microrganismos (SOCCOL et al., 1994).

O crescimento dos fungos filamentosos, é uma combinação da extensão apical das hifas associado à geração de novas hifas por ramificação do micélio, permite ao fungo penetrar no substrato sólido e formar uma estrutura sólida, o que confere uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, as enzimas hidrolíticas são excretadas pelas hifas sem grande diluição como ocorre na fermentação submersa, o que faz com que sua ação seja muito mais eficiente, permitindo adentrar no substrato aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas (RAIMBAULT, 1998). Segundo Menezes (2006), nas fermentações em estado sólido o crescimento do fungo acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinada pela disponibilidade dos nutrientes e pelas características do substrato (Figura 3.3).

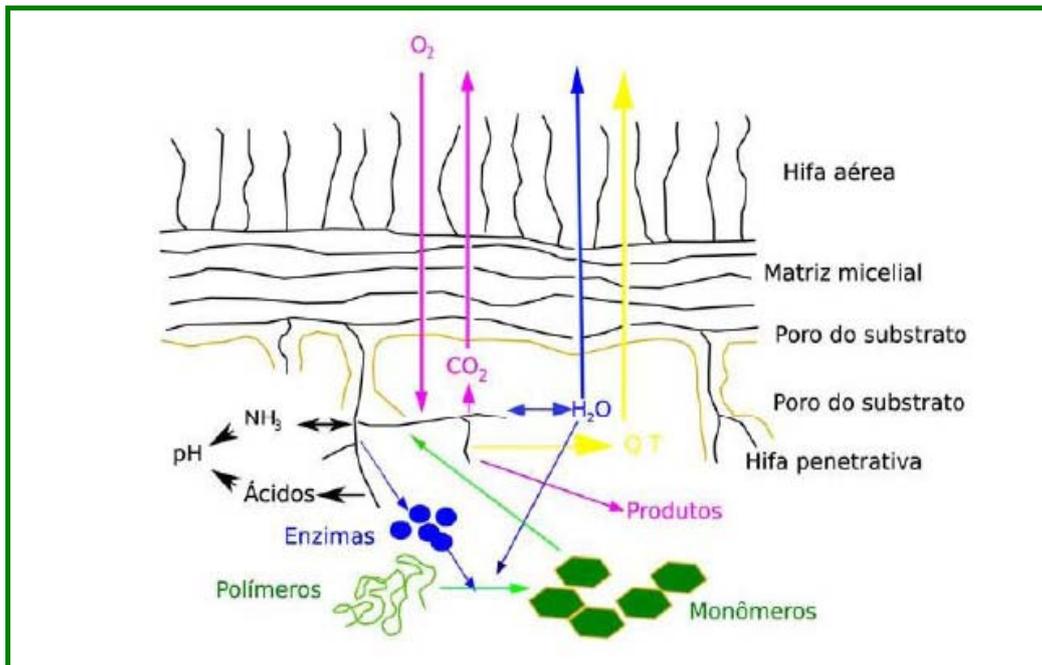


Figura 3.3. Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos. Adaptado Hölker e Lenz (2005).

Todo esse aparato desenvolvido pelos fungos filamentosos para a degradação de substratos sólidos contribuiu para a produção de coquetéis enzimáticos altamente específicos. Isso se confirma com o trabalho realizado por Singh et al. (2009) que estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido e de celuloses comerciais por um coquetel enzimático comercial (Accellerase 1000) e um coquetel enzimático produzido por *Penicillium*. Foi constatado que, para a hidrólise do bagaço explodido e da celulose comercial tratada, ambos os coquetéis apresentaram resultados aproximados; no entanto, na hidrólise da celulose microcristalina e da celulose não-tratada, a celulase do fungo filamentosso *Penicillium* mostrou-se muito superior.

3.2.1 Fungos Filamentosos do Gênero *Trichoderma*

Os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram descritos primeiramente por Persoon e Gray em 1801. São considerados fungos saprófitos mesofílicos pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Hypocreales e à família Hypocreaceae. Quando cultivado estaticamente, o aspecto observado é verde brilhante, devido a grupos de conídios presentes nas extremidades das hifas aéreas, como pode ser observado na Figura 3.4 (PELCZAR et al., 1980; SILVEIRA, 1995).

As *Trichoderma* spp. são colonizadores onipresentes de materiais celulósicos e podem frequentemente ser encontrados em materiais vegetais em decomposição

disponíveis na natureza (KUBICEK et al., 2008; JAKLITSCH, 2009), bem como na rizosfera de plantas, onde podem induzir resistência sistêmica a patógenos. Esses fungos filamentosos são caracterizados por ter um crescimento relativamente rápido, como dito anteriormente apresentam conídios verdes brilhantes e uma estrutura repetitiva de conidióforos ramificados (GAMS e BISSETT, 1998).

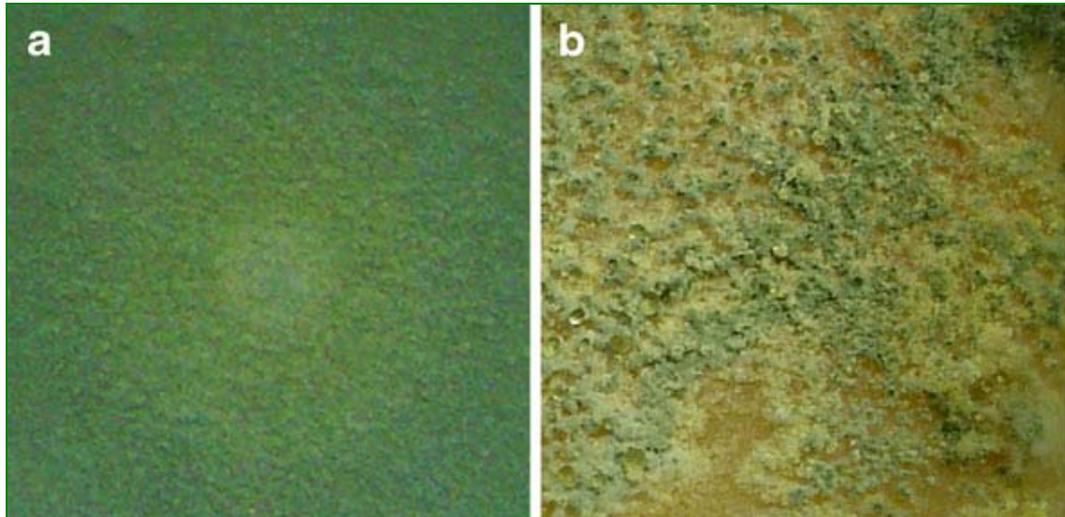


Figura 3.4. Aspecto verde brilhante dos micélios da espécie *Trichoderma*. a) *Trichoderma reesei*; b) *Trichoderma atroviride*. Adaptado de Schuster e Schmoll (2010).

As espécies do fungo *Trichoderma* são colonizadoras altamente bem sucedidas de seus habitats, isso se reflete na utilização eficiente dos substratos, assim como na capacidade de secreção de metabólitos antibióticos e enzimas. Estes fungos são capazes de lidar com diferentes ambientes como o habitat rico e diversificado de uma floresta tropical, bem como o ambiente escuro e estéril de um fermentador biotecnológico ou em frascos agitados (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010). Em todas essas condições, os *Trichoderma* respondem ao meio ambiente por regulação de crescimento, produções de conídios e enzimas, dessa forma adaptam seu estilo de vida as condições atuais o que pode ser explorado em benefício da pesquisa na área biotecnológica.

3.2.2 Gênero *Trichoderma* e a Produção de Celulases

Muitas vezes, os microrganismos que apresentam elevado potencial para a produção de enzimas, incluindo as celulases, são submetidos a técnicas de mutação, com o intuito de aumentar sua produção enzimática. O fungo *Trichoderma reesei* tão

reportado pela literatura científica é um exemplo. Desde o isolamento e a identificação da linhagem selvagem, Qm6a, que chamou a atenção por sua habilidade em degradar rapidamente peças de composição celulósica, esta linhagem vem sendo utilizada em todo o mundo como base para o desenvolvimento de diversos mutantes, com propriedades melhoradas relacionadas à produção de celulases, pela utilização de técnicas a base de nitrosoguanidina, dietilsulfato, irradiação ultravioleta, e fluxo de elétrons de alta voltagem, dentre outras (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1979).

Embora os fungos filamentosos sejam as maiores fontes de celulases e hemicelulases e as cepas mutantes de *Trichoderma* incluindo *T. reesei*, *T. viride* e *T. longibrachium* sejam os melhores produtores conhecidos de enzimas, é também de conhecimento científico que estas espécies de *Trichoderma* têm um baixo nível de atividade da enzima β -glicosidase (SINGHANIA et al., 2010).

O fungo filamentoso *T. reesei* está entre os microrganismos com maiores potenciais para a produção de celulases, além de ser o mais detalhadamente estudado. Este fungo produz duas celobiohidrolases (CHB I e CHB II) e duas endoglucanases (EG1 e EG2), em proporção aproximada de 6:2:1:1, que juntas chegam a somar 90% do coquetel enzimático de celulases, enquanto β -glicosidades tipicamente secretadas por estes fungos juntas chegam a menos de 1% (MARGEOT et al., 2009). A deficiência na expressão da enzima β -glicosidase restringe a conversão de celobiose em glicose, proporcionando inibição da atividade das celulases pelo acúmulo de celobiose. Portanto, para sua efetiva aplicação a suplementação com β -glicosidase se faz necessária, encarecendo o processo de hidrólise (CEN e XIA, 2004; SUKUMARAM et al., 2009; GOTTSCHALK et al., 2010).

Dos sistemas celulásicos melhor estudados, as celobiohidrolases, particularmente as CBH I de *T. reesei*, têm sido consideradas como enzimas essenciais à sacarificação eficiente da celulose. Evidências experimentais indicam que a remoção do gene que codifica para a produção CBH I reduz em 70% a atividade do complexo sobre a celulose cristalina. Além disso, as CBHs apresentam grande interação sinérgica com outras celulases, principalmente aquelas de atividade reconhecidamente endoglucanásica (BELDMAN et al., 1988). Dos vários tipos de sinergismo descritos na literatura a cooperação entre CBH I e CBH II de *T. reesei* é certamente uma dos mais curiosos.

Nos últimos anos, pesquisas com *Trichoderma* têm sido facilitadas significativamente pelo sequenciamento do genoma de três cepas representativas das aplicações mais importantes deste gênero. A seqüência genômica do *T. reesei* surpreendentemente revelou que, apesar da sua importância na produção industrial de celulases, o seu genoma apresenta pouca quantidade de genes que codificam

enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. A análise do genoma das espécies *T. atroviride* e *T. virens*, duas espécies importantes em biocontrole, ainda se encontra em andamento (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010).

A disponibilidade da seqüência genômica também estimulou uma ampla análise do genoma das primeiras linhagens mutantes e a identificação de mutações supostamente benéficas, que causaram sua alta eficiência enzimática (LE CROM et al., 2009). Curiosamente, parece que mesmo os primeiros mutantes, como o *T. reesei* RUT C30 carregam alterações consideráveis em seu genoma (SEIDL et al., 2008). Estas novas ferramentas também facilitaram a caracterização do coquetel enzimático secretado por essa linhagem (HERPOEL-GIMBERT et al., 2008).

Além disso, os esforços na abordagem da engenharia enzimática (BANSAL et al., 2009), a melhoria no maquinário de secreção (CONESA et al., 2001; KRUSZEWSKA et al., 2008), bem como a seleção da enorme variedade de cepas isoladas da natureza que possuem enzimas capazes de degradar a parede celular de plantas (KUBISEK et al., 1996) ou outros organismos que secretam celulasas (DASHTBAN et al., 2009) e a evolução dirigida (NAKAZAWA et al., 2009) complementam a otimização do mecanismo regulatório na produção de linhagens disponíveis.

3.3 Técnicas de *Screening*

Uma etapa importante no desenvolvimento de um processo industrial para a produção de enzimas é isolar linhagens com elevado potencial de produção. O isolamento e as técnicas de *screening* de microrganismos produtores de celulasas são de extrema importância para atender a demanda por novas enzimas e o aumento de suas aplicações biotecnológicas. Um fácil e rápido método qualitativo é descrito por *screening* de microrganismos produtores de celulasas em placas com agar (KASANA et al., 2008).

A estratégia do *screening* é um passo importante para selecionar espécies desejadas de um extenso banco de espécies. O *screening* pode ser dividido em duas categorias: *screening* facilitado, que distingue espécies a partir da diferença de fenótipos, como a cromosfera liberada ou halos formados; e o *screening* ao acaso, que seleciona espécies aleatoriamente (TAYLOR et al., 2001).

A técnica de *screening* para isolamento de fungos é muito utilizada para testar as habilidades de crescimento dos microrganismos em meios de cultura como, por exemplo, meios acidificados (COLLA et al., 2008). Provavelmente, a metodologia mais eficiente para encontrar novas enzimas seja o isolamento e seleção de

microrganismos como consequência das suas características de diversidade e versatilidade (SHIMIZU et al., 1997; OGAWA e SHIMIZU, 2002).

Um típico *screening* facilitado, realizado em agar-sólido, baseia-se na solubilização seguida por uma reação enzimática que dá origem a uma zona de identificação, como um halo formado a partir da degradação do substrato cromogênico (ZHANG et al., 2006). O método de *screening* em placas com substratos cromogênicos proporciona um leque relativamente simples de ferramentas aplicáveis para a detecção específica de microrganismos que degradam polissacarídeos. Tal seleção também pode ser chamada de indireta, o que significa a indicação da presença de determinada substância pela detecção de alguma atividade específica, tal como a detecção de uma atividade enzimática via reação colorimétrica ou fluorimétrica.

A seleção indireta pode ser realizada a partir de testes feitos com corantes. Sendo um deles o Vermelho Congo (RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004; CASTRO, 2006). Estudos realizados por Teather e Wood (1982), demonstraram a forte interação do vermelho Congo com polissacarídeos com ligações β -1,4 – D-glucopiranosil. Esta interação fornece a base para um ensaio sensível para a detecção de colônias de bactérias produtoras de celulasas.

O método do vermelho Congo juntamente com o método do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS), podem ser claramente utilizados para a seleção de linhagens fúngicas produtoras de celulasas. Estudos realizados por Sazci et al. (1986) combinaram os dois métodos citados acima e mostraram que variações ocorreram na conversão da carboximetilcelulose (CMC) e papel de filtro em glicose por diferentes fungos. Os autores concluem que para seis linhagens de fungos das sete estudadas há correspondência com entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram a atividade de celulasas através do *screening* de 80 linhagens de fungos isolados do solo em uma estação ecológica. Primeiramente os fungos foram avaliados em placa de Petri com a técnica do corante vermelho Congo, após esse teste 64 linhagens apresentaram halo de hidrólise e foram avaliadas por meio de fermentação em tubos para a quantificação de endoglucanases e FPase.

Kasana e colaboradores. (2008) realizaram *screening* e a identificação de microrganismos produtores de celulasas em placas com Agar e testaram diferentes métodos de *screening* através da coloração das placas com três corantes vermelho Congo, iodo de Gram e brometo de hexadeciltrimetilamônio. Os melhores resultados obtidos foram com iodo de Gram, devido a melhor visualização da zona de hidrólise do substrato.

Nos estudos realizados por Sandri e colaboradores (2009), os autores isolaram 60 fungos filamentosos e realizaram primeiramente o *screening* em placas e posteriormente fermentações submersa e sólida para selecionar as melhores linhagens produtoras de endopoligalacturonase. Como se observou estudos utilizando *screening* de microrganismos são de suma importância para a viabilidade de todos os processos envolvidos na produção de um complexo enzimático, neste caso especificamente das celulases.

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A Fermentação em estado sólido (FES), fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido, pode ser definida como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, sendo que o substrato deve conter uma umidade suficiente para suportar o crescimento microbiano, na forma adsorvida na matriz sólida (PANDEY, 1992; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; RAHARDJO et al., 2006). Outros autores a descrevem como sendo o crescimento e o metabolismo de organismos em materiais sólidos como uma estrutura organizada na ausência total de líquido na forma livre (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980; CANNEL e MOOYOUNG, 1980).

A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução. Os níveis de umidade relativa variam de acordo com os autores e possuem uma estreita relação com o tipo de substrato ou suporte utilizado e o nível máximo de retenção de água proporcionado por essas matérias primas (LONSANE, 1985).

O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o *habitat* natural destes microrganismos. Na FES, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como materiais lignocelulósicos, na presença de quantidades variáveis de água. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produção quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER et al., 2004). Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de conduzir o processo em condições estéreis, além de ser um processo adequado para a utilização de resíduos agroindustriais (bagaço de cana, farelo de

trigo, entre outros) como próprio substrato, servindo estes como fontes de carbono e energia.

Em função da natureza do suporte, podem-se distinguir dois tipos de FES (BARRIOS-GONZÁLEZ, 1996):

- cultura sólida em uma fase substrato-suporte, onde a fase sólida é constituída por um material que possui função de suporte e fonte de nutrientes, e,
- cultura sólida com uma fase suporte impregnada de um meio líquido. Neste tipo de fermentação, a fase sólida é considerada como um suporte inerte, que não constitui uma fonte de nutrientes para os microrganismos, mas serve de reservatório para uma solução nutritiva que estará adsorvida na matriz sólida.

3.4.1 Substrato sólido para FES

A seleção do substrato adequado para FES depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso (PANDEY et al., 2000a). A biomassa, na sua forma natural ou em resíduos da agricultura e resíduos florestais, é gerada em muitas toneladas anualmente, o que pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo na natureza (PANDEY et al., 2000b). Além disso, a falta de aplicação prática deixa de agregar valor a estes resíduos, que poderiam gerar lucros para os mais diversos setores (visto a possível utilização em FES).

Nos últimos anos, há um crescente interesse no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos e enzimas. Desde que esta biomassa é constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose, existem inúmeras possibilidades de aproveitamento destes resíduos.

Embora muitos fatores relacionados aos substratos para FES tenham importância para o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse, o tamanho da partícula e o nível de umidade e/ou a atividade de água do meio são considerados os mais críticos (PANDEY et al., 2000a; PANDEY, 2003). Frequentemente, partículas pequenas possuem uma maior área superficial para a utilização pelo microrganismo, sendo uma propriedade desejável para as fermentações sólidas. No entanto, partículas muito pequenas podem resultar em compactação do substrato, o que, conseqüentemente, interfere na aeração do sistema, bem como na utilização do oxigênio pelos microrganismos. Por outro lado, a utilização de partículas de tamanho maior leva a um aumento do espaço interpartículas, melhorando os processos relacionados à transferência do oxigênio,

mas limitando a área superficial das partículas, onde ocorrem os processos de transferência de massa (nutrientes e umidade), vitais para o microrganismo (PANDEY et al., 2000b).

Dentre as vantagens da utilização dos resíduos agroindustriais destaca-se o fato de serem recursos naturais renováveis, possuírem produção dependente de outra atividade produtiva e apresentarem uma demanda em grande quantidade, o que normalmente constitui um passivo ambiental, devido a sua inadequada destinação, sem qualquer tipo de tratamento (MACIEL, 2006). Além disso, o uso de resíduos como substrato para a FES agrega ainda a vantagem em relação à especificidade do extrato enzimático obtido para a hidrólise do próprio resíduo. Andrade et al. (2009) realizaram um estudo comparativo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando diferentes coquetéis enzimáticos. Ficou demonstrado neste estudo que a atividade declarada de uma enzima não deve ser utilizada como parâmetro para a seleção de um catalisador. Pois, apesar de um coquetel ter uma atividade 147,5 vezes maior do que o outro quando comparados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (BC) este coquetel apresentou resultados inferiores.

Um grande número de variáveis afeta a produção de compostos por fungos, dentre elas destaca-se a composição do meio de cultura utilizado (SKOWRONEK e FIEDUREK, 2004). Quando o fungo é cultivado em laboratório, se o meio de cultura *in natura* não fornecer uma quantidade necessária de nutrientes, uma suplementação deve ser realizada.

Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes importantes para o processo encontram-se em concentrações muito baixas, sendo necessária a suplementação do meio (NIGAM e SINGH, 1994; PANDEY et al., 2000a).

3.4.2 Fatores que influenciam a FES

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Além disso, existem sérios problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos em consequência a heterogeneidade do sistema (DOELLE et al., 1992).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque nas FES, em virtude do seu elevado grau de interação

com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS e MOLIN, 2003). Na FES a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água (A_w), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas de substratos (PINTO et al., 2005).

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do microrganismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985).

Segundo Narahara e colaboradores. (1982) para cada espécie de microrganismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplos, enzimas. O preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais. A adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo (CORREIA, 2004).

Em FES, a temperatura também é um fator crítico, devido ao acúmulo de calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2003). Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos.

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização de processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro durante a FES, não é fácil de ser realizado. A determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (PALMA, 2003). Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca de pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI et al., 2001).

Os sistemas de FES têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no

meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais. A transferência de oxigênio acontece, fundamentalmente, em duas instâncias: transferências intrapartículas e interpartículas. Para Correia (2004), a aeração cumpre funções básicas como manter condições aeróbicas, eliminar o dióxido de carbono formado, regular a temperatura do substrato e ajustar o nível de umidade.

3.4.3 FES na Produção de Celulases

Na natureza, o crescimento e a utilização da celulose por microrganismos aeróbicos para a produção de celulases se assemelham mais com a fermentação em estado sólido do que com uma cultura líquida. Grande parte dos avanços na produção de celulases microbianas foi desenvolvida para fermentação submersa (FSm), no entanto, o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulases ocorre naturalmente em condições similares à FES (SINGHANIA et al., 2009).

A FES para a produção de celulases está rapidamente atraindo interesse por ser uma tecnologia com custo eficaz e pelo uso de microrganismos, especialmente culturas fúngicas que produzem relativamente altas concentrações de celulases devido às condições da fermentação que mostram similaridade com o meio-ambiente natural (CEN e XIA, 1999). Do ponto de vista do bioprocessamento, a produção de celulases na própria planta a partir do substrato a ser hidrolisado (*in situ*), é uma necessidade uma vez que grandes quantidades de enzimas serão requeridas para a eficiente hidrólise dos abundantes materiais lignocelulósicos, visando à produção de etanol (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Segundo relatos de Chahal (1985), confirmados por estudos realizados por Singhanian e colaboradores. (2010), os maiores rendimentos para a produção de celulases por *Trichoderma reesei* foram encontrados em FES. A comparação da produção de celulases entre fermentação submersa e em estado sólido tem indicado que há uma redução de 10 vezes nos custos de produção quando o uso da FES é empregado. Culturas em estado sólido estão sendo fortemente recomendadas como sistemas para a produção de celulases devido aos menores custos comparados com as culturas submersas, como a concentração do produto permanece bastante alta reduz uma etapa do processo, reduzindo assim o custo total da operação.

Gutierrez-Correa e colaboradores (1999) realizaram estudos com FES utilizando bagaço de cana como substrato para a produção de celulases e xilanases de *T. reesei* LM-UC4 e *T. reesei* LM-UC4E1 isoladamente, e culturas mistas de *T. reesei* LM-UC4 com *A. niger* e *T. reesei* LM-UC4E1 com *A. niger*. Resultados desse estudo mostram que a suplementação do meio de fermentação com farelo de soja,

como fonte de nitrogênio, contribuiu para o crescimento dos fungos e aumento da produção das enzimas apenas para os microrganismos isolados, para culturas mistas um substrato com níveis nutricionais mais baixos foi o mais adequado para a produção de celulases.

Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006) estudaram pelo processo de FES a habilidade da linhagem mutante *T. reesei* QM 9414 de fermentar diferentes substratos celulósicos palha de arroz e BC. Inicialmente a linhagem foi crescida em diferentes fontes de carbono celulose, glicose, xilose e lactose. Posteriormente esses materiais foram combinados entre si. Para a produção de FPase a maior atividade foi obtida utilizando a combinação entre celulose e xilose, assim como para a produção de CMCase.

Alguns autores acreditam que o uso de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas celulolíticas por FES, pode se tornar um método competitivo para a produção destas enzimas, através do uso de tecnologia apropriada, melhora no modelo dos biorreatores e domínio dos controles operacionais. Essa é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de biorreatores em escala industrial, uma vez que a FES, apesar dos elevados rendimentos para a produção de enzimas, apresenta como principal fator limitante a dificuldade de controle nos gradientes das variáveis operacionais inerentes ao processo (FARINAS et al., 2010).

A FES para a produção de enzimas industriais pode ser considerada como uma tecnologia futura para a produção comercial de celulases, considerando o baixo custo de entrada e a habilidade para utilizar naturalmente fontes disponíveis de celulose como substrato (SINGHANIA et al., 2010).

3.5 Material Lignocelulósico (Biomassa)

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza (SZENGYEL, 2000), sendo compreendidas, majoritariamente, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Essas biomassas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes (Figura 3.5). Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais.

A celulose apresenta entre 5.000 e 10.000 unidades do monossacarídeo β -D-glicose ligadas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares são formadas

entre suas longas cadeias de celulose originando microfibrilas cristalinas insolúveis em água (FENGEL e WEGENER, 1989). A segunda fração polimérica, chamada lignina, é uma macromolécula ramificada e amorfa, sua estrutura é bastante heterogênea formando uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aryl-éter (WHETTEN e SEDEROFF, 1995). A lignina se encontra fortemente ligada à hemicelulose e às fibras de celulose, aumentando a resistência da estrutura e a recalcitrância à conversão por agentes químicos e microbianos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Formada por uma mistura de polissacarídeos ramificados de baixa massa molecular, estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (CASTRO, 2006).

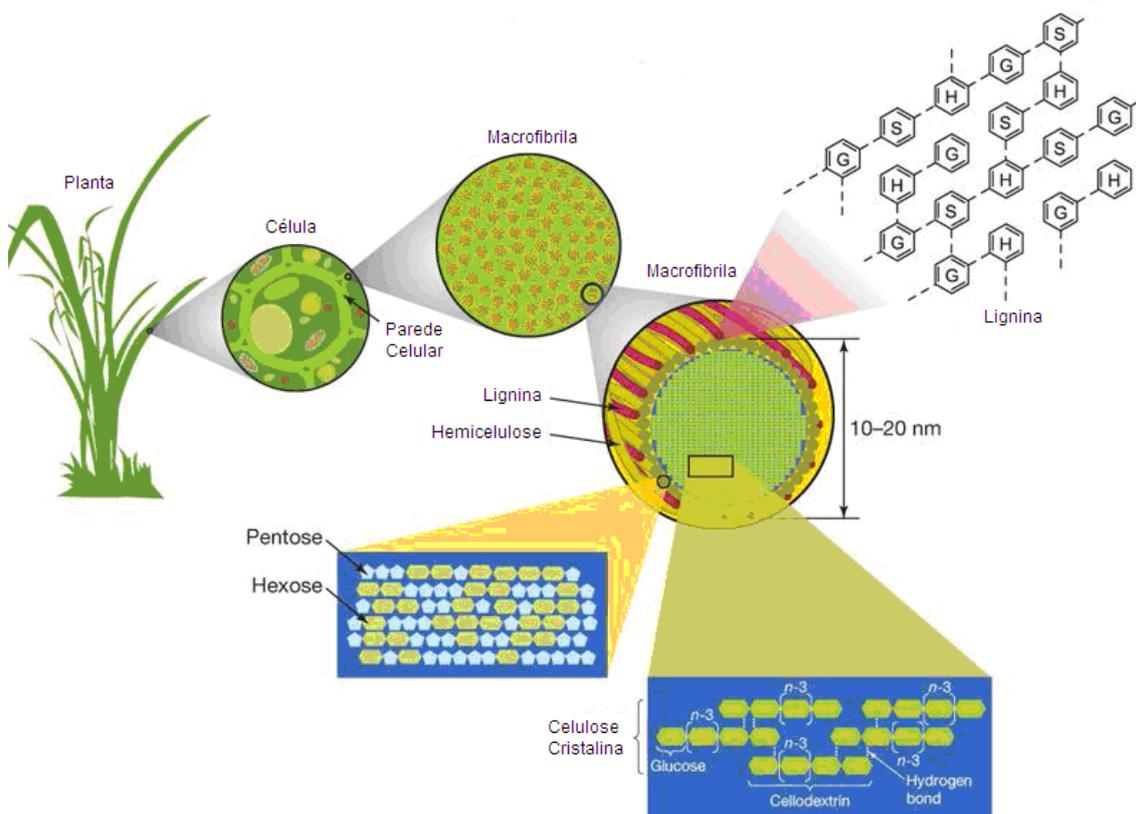


Figura 3.5. Estrutura recalcitrante de biomassa lignocelulósica e apresentação das frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de Rubin (2008).

As paredes da célula vegetal são subdivididas em parede primária e parede secundária. A distribuição de celulose, de hemicelulose e de lignina varia consideravelmente entre estas camadas. A parede preliminar é uma camada fina, permeável e flexível em tecidos fisiologicamente ativos, mas pode tornar-se altamente lignificado dependendo da espécie. A parede secundária é formada por uma

seqüência de três pequenas camadas, S1, S2 e S3, onde a camada central é geralmente mais grossa do que as outras. Em conseqüência, a maioria das propriedades da fibra, particularmente aquelas do interesse para a polpa e para a indústria de papel, são derivadas das características desta camada (RAMOS, 2003). A Figura 3.6 apresenta a estrutura esquematizada de uma fibra vegetal.

A cristalinidade da celulose, a área de superfície acessível, a proteção da celulose pela lignina e o caráter heterogêneo de partículas da biomassa contribuem para o caráter recalcitrante da biomassa lignocelulósica à hidrólise (RYDHOLM, 1965; WENZEL, 1970; HSU et al., 1980; HSU, 1996; CHANG e HOLTZAPPLE, 2000). Entretanto, a cristalinidade sozinha é insuficiente para impedir significativamente a hidrólise se uma concentração suficiente de enzimas for usada. É necessária uma alta concentração de enzimas para que a digestibilidade enzimática tenha rendimento superior a 20%, devido às características estruturais da biomassa lignocelulósica. A variabilidade nestas características esclarece a digestibilidade variada entre fontes diferentes de biomassa lignocelulósicas (MOISER et al., 2004).

No mundo são produzidas anualmente cerca de 6,0 bilhões de toneladas de lignocelulose na forma de resíduos agroindustriais (FAOSTAT, 2010). A utilização de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carboidratos para a produção de etanol vem sendo amplamente estudada, por apresentar um potencial privilegiado para a produção de energia renovável. No contexto nacional, somente a indústria de açúcar e álcool gera 195 milhões de toneladas de BC por ano, parte do qual é queimado de forma ineficiente em usinas para cogeração de energia. Apesar disso, existe um excedente de 12-50% disponível para conversão em etanol celulósico (CONAB, 2010). Com este objetivo, a rota enzimática tem se apresentado como uma tecnologia vantajosa visando à adequada e eficiente bioconversão da lignocelulose em seus componentes.

O bioetanol derivado da biomassa lignocelulósica pode contribuir para a solução da dependência mundial pelas fontes de energia fóssil. Neste sentido, os biocombustíveis de 2ª geração se mostram como alternativas energéticas promissoras, pois utilizam fontes renováveis como matéria prima sem a competição pelo uso da terra com fins alimentares. No Brasil, apesar da grande produção do etanol a partir da sacarose de cana-de-açúcar, a produção de etanol derivado do material lignocelulósico se apresenta como uma alternativa viável e sustentável em contextos de iminente crise energética (ALVIRA et al., 2010; CARDONA et al., 2010).

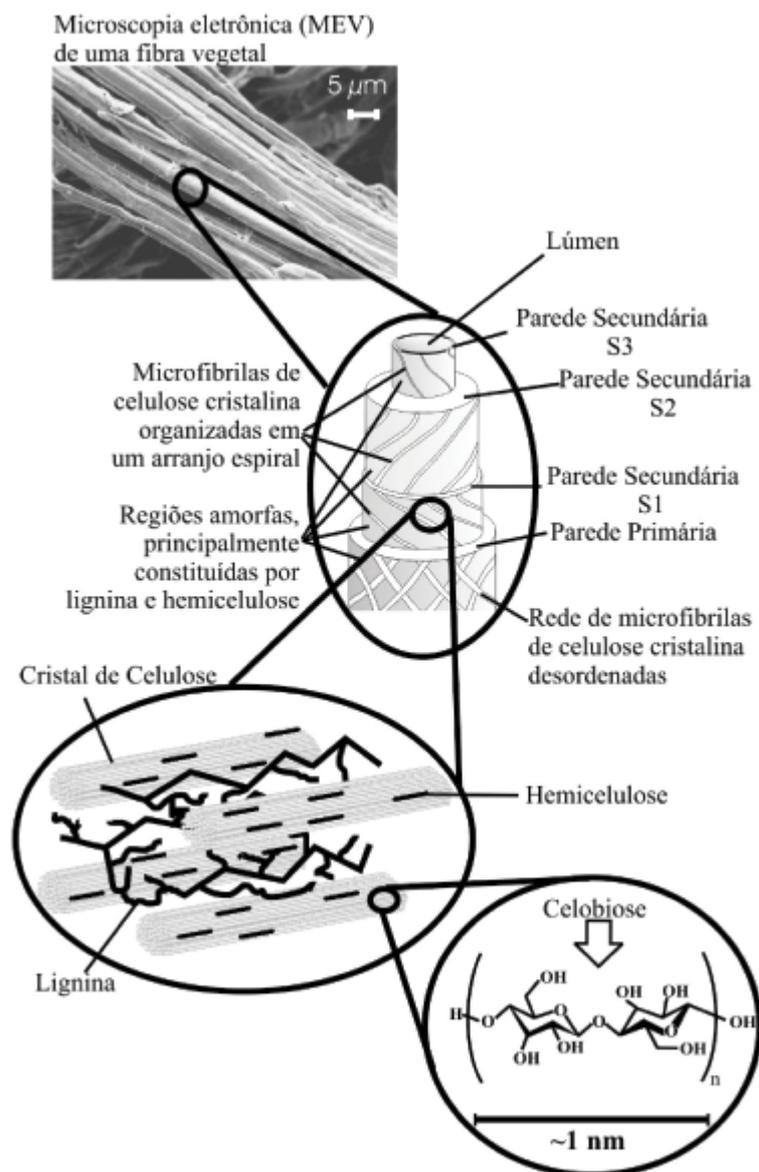


Figura 3.6. Estrutura de uma fibra vegetal e a subdivisão da parede celular. Adaptado de Silva (2009).

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Isolados de Fungos

Para a seleção e avaliação do potencial celulolítico foram estudadas 78 linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* pertencentes às micotecas da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) (Tabela 4.1). Como linhagem de referência, foi usado o mutante hiper-celulolítico *Trichoderma reesei* RUT

C30 adquirido junto ao grupo CABI, (esta coleção de culturas é membro da Coleção de Culturas Nacional do Reino Unido) Número IMI: 345108.

Tabela 4.1 Linhagens estudadas durante o processo de avaliação do potencial celulolítico

Linhagens cedidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.		Linhagens cedidas pela Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP	
Fungos	Identificação por Código	T. sp	CG
<i>T. sp</i>	LCB 46	<i>T. sp</i>	CG 07
<i>T. koningii</i>	LCB 49	<i>T. sp</i>	CG 09
<i>T. sp</i>	LCB 79	<i>T. sp</i>	CG 11
<i>T. harzianum</i>	EI 01	<i>T. sp</i>	CG 16
<i>T. polysporum</i>	EI 02	<i>T. sp</i>	CG 26
Linhagens cedidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.		<i>T. sp</i>	CG 31
Fungos	Identificação por Código	<i>T. sp</i>	CG 37
<i>T. harzianum</i>	CEN 139	<i>T. sp</i>	CG 50
<i>T. koningii</i>	CEN 142	<i>T. sp</i>	CG 51
<i>T. harzianum</i>	CEN 145	<i>T. sp</i>	CG 58
<i>T. harzianum</i>	CEN 151	<i>T. sp</i>	CG 58'
<i>T. harzianum</i>	CEN 153	<i>T. sp</i>	CG 67
<i>T. harzianum</i>	CEN 155	<i>T. sp</i>	CG 68
<i>T. harzianum</i>	CEN 156	<i>T. sp</i>	CG 69
<i>T. harzianum</i>	CEN 159	<i>T. sp</i>	CG 70
<i>T. asperelum</i>	CEN 162	<i>T. sp</i>	CG 71
<i>T. harzianum</i>	CEN 167	<i>T. sp</i>	CG 72
<i>T. koningii</i>	CEN 174	<i>T. sp</i>	CG 73
<i>T. asperelum</i>	CEN 201	<i>T. sp</i>	CG 84
<i>T. harzianum</i>	CEN 202	<i>T. sp</i>	CG 85
<i>T. pseudokoningii</i>	CEN 209	<i>T. sp</i>	CG 87
<i>T. pseudokoningii</i>	CEN 210	<i>T. sp</i>	CG 88
<i>T. atroviride</i>	CEN 219	<i>T. sp</i>	CG 89
<i>T. harzianum</i>	CEN 223	<i>T. sp</i>	CG 90
<i>T. harzianum</i>	CEN 237	<i>T. sp</i>	CG 92
<i>T. harzianum</i>	CEN 238	<i>T. sp</i>	CG 94
<i>T. harzianum</i>	CEN 240	<i>T. sp</i>	CG 98C
<i>T. harzianum</i>	CEN 241	<i>T. sp</i>	CG 98D
<i>T. harzianum</i>	CEN 242	<i>T. sp</i>	CG 100NH
<i>T. harzianum</i>	CEN 248	<i>T. sp</i>	CG 101
<i>T. atroviride</i>	CEN 250	<i>T. sp</i>	CG 104NH
Linhagens cedidas pela Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP		<i>T. sp</i>	CG 109
Fungos	Identificação por Código	<i>T. sp</i>	CG 111
<i>T. sp</i>	CG 01	<i>T. sp</i>	CG 112
<i>T. sp</i>	CG 02	<i>T. sp</i>	CG 122
<i>T. sp</i>	CG 03	<i>T. sp</i>	CG 124
<i>T. sp</i>	CG 04	<i>T. sp</i>	CG 128
<i>T. sp</i>	CG 05	<i>T. sp</i>	CG 138
<i>T. sp</i>	CG 06	<i>T. sp</i>	CG 140
		<i>T. sp</i>	CG 141
		<i>T. sp</i>	CG 141'
		<i>T. sp</i>	CG 144
		<i>T. sp</i>	CG 146

continua

4.2 Meios de Cultura

4.2.1 Meio para Manutenção Celular

A manutenção das linhagens dos fungos filamentosos foi realizada por meio de repiques periódicos (em média a cada três meses) em meio PDA – *Potato, Dextrose, Agar* (Acumedia, Brasil), como pode ser observado na Figura 4.1. O meio foi preparado conforme indicado pelo fabricante, nas seguintes proporções: 39 g de PDA para 1 L de água destilada. Dissolveu-se o meio em água destilada, aqueceu a solução até o ponto de fervura e por fim o meio foi esterilizado por autoclavagem a 1atm por 20 min.

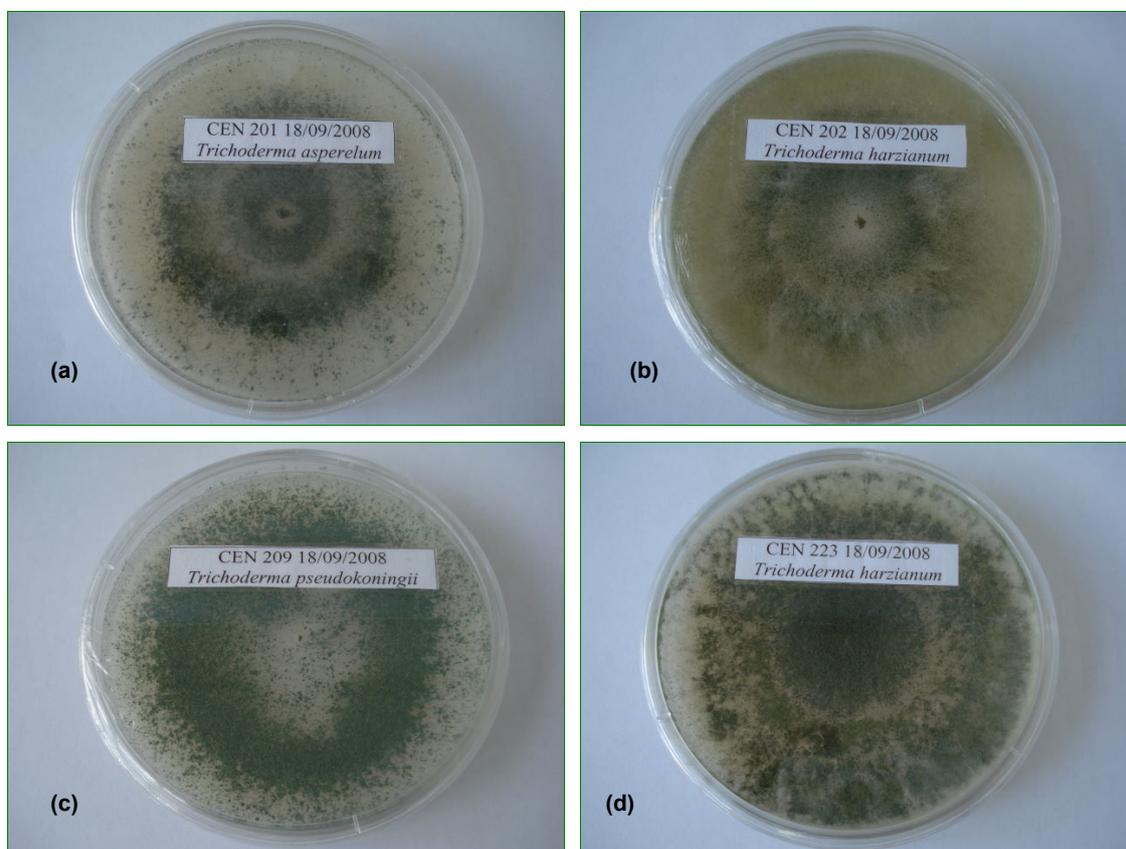


Figura 4.1. Cultivo em placa de Petri de algumas das cepas utilizadas. (a): *Trichoderma asperelum* CEN 201; (b): *T. harzianum* CEN 202; (c): *T. pseudokoningii* CEN 209; (d): *T. harzianum* CEN 223;

4.2.2 Meio para Triagem em placa de Petri

As 78 linhagens de fungos foram cultivadas em meio sintético contendo AVICEL (Fluka Biochemika, Suíça) como única fonte de carbono. A composição do meio é mostrada na Tabela 4.2. Este meio foi esterilizado a 1 atm por 20 min.

Tabela 4.2. Composição do meio de triagem em placas de Petri.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Agar	20,0
Avicel	5,0

4.2.3 Meio para Teste do Vermelho Congo

Apenas as linhagens que obtiveram crescimento no meio de triagem com AVICEL como única fonte de carbono foram selecionadas para o teste do Vermelho Congo. A composição do meio é semelhante ao meio descrito no item 4.2.2, mudando apenas a fonte de carbono para carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma, EUA) (NaNO₃: 3,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄: 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄: 0,5 g.L⁻¹; KCl: 0,5 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O: 0,01 mg.L⁻¹; agar: 20,0 g.L⁻¹; CMC: 5,0 g.L⁻¹). O processo de esterilização seguiu o mesmo procedimento descrito no item anterior.

4.3. Teste do vermelho Congo

Os esporos utilizados para o teste do vermelho foram obtidos a partir da aplicação da técnica do ponto central, com a ajuda da agulha de platina. Uma quantidade mínima de esporos foi retirada da placa contendo o fungo cultivado em meio de triagem e aplicado no centro de outra placa de Petri contendo o meio CMC como única fonte de carbono. As placas inoculadas foram incubadas por 96h (4 dias) a 30°C e o crescimento do microrganismo foi medido através do diâmetro do halo da colônia. Este procedimento foi realizado durante todos os dias do período de incubação, utilizando o mesmo objeto de medição, no mesmo horário da incubação. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (Vetec) (2,5 g.L⁻¹). A estrutura química do corante vermelho congo pode ser observada na Figura 4.2 (C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂). Após 15 min, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 10 mL de solução de NaCl 1 mol.L⁻¹. Aguardou-se 15 minutos para a medição dos halos e colônias. Nas cepas produtoras de celulasas observa-se um halo de cor clara com as bordas laranja, indicativo das áreas de hidrólise. Esse halo foi medido para posterior cálculo do índice enzimático. Os diâmetros das colônias e dos

halos produzidos foram medidos com paquímetro (NOGUEIRA e CAVALCANTI, 1996). Os índices enzimáticos foram calculados a partir da equação (1):

$$\text{Índice Enzimático (i.e.)} = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{diâmetro do halo da colônia}} \quad (\text{Eq. 1})$$

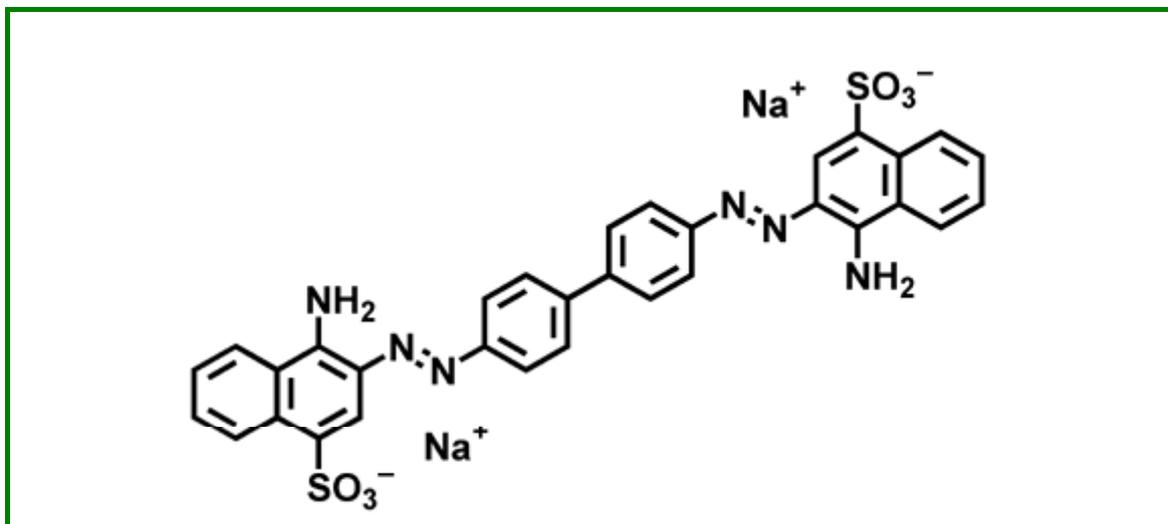


Figura 4.2. Estrutura do corante vermelho congo. Adaptado de Castro, 2006.

As linhagens que apresentaram uma relação diâmetro halo hidrólise/ diâmetro halo colônia maior que 1,50 (i.e.>1,50) foram consideradas como potenciais produtoras de celulasas (MACIEL, 2006).

4.4 Fermentação em Tubos de Ensaio

A composição do meio líquido utilizada da fermentação em tubos foi semelhante as do meio para triagem dos fungos, descritas no item 4.2.2, porém, sem a adição do agar e as fontes de carbono AVICEL e CMC foram substituídas por uma tira de papel de filtro Whatman nº1 de dimensões 1x10cm (correspondente a uma massa cerca de 90mg). Este meio foi esterilizado por autoclavação a 1atm por 20 min. Os tubos contendo o meio foram inoculados com uma alçada cheia de esporos, retiradas de placas de Petri, crescidas por 9-10 dias em meio de manutenção celular (item 4.2.1). Apenas as linhagens selecionadas no teste do vermelho Congo passaram por essa etapa de avaliação. Os esporos foram passados para o papel de filtro não imerso, de forma a promover uma fermentação líquida com substrato insolúvel (Figura 4.3). Os tubos inoculados foram incubados em estufa por 4 semanas a 30°C, seguindo a metodologia adaptada descrita por Castro (2006). A cada semana um tubo de cada linhagem foi retirado da incubação para análises enzimáticas. O papel de filtro com as linhagens crescidas foi levemente macerado no meio líquido, para a dessorção das enzimas da matriz sólida do substrato e da biomassa.



Figura 4.3. Fermentação líquida com substrato insolúvel em tubo de ensaio.

4.5 FES em frascos Erlenmeyer

Os substratos usados como fonte de celulose para esta fermentação foram o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e farelo de trigo, a razão entre BC/FT usada foi de 1:1 devido aos resultados obtidos nos experimentos dos delineamentos experimentais. O total de substrato sólido utilizado foi de 5 g. A composição do meio nutriente descrita por Mandels e Weber (1969), para a produção de celulasas foi utilizada em quantidade necessária para 5 g de substrato e para volume do inóculo calculado (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Composição do meio para FES em frascos Erlenmeyer.

Unidades	Componentes	Concentração
g.L ⁻¹	Uréia	4,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6
	KH ₂ PO ₄	4,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,8
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
	Peptona	1,8
	Extrato de levedura	0,5
mg.L ⁻¹	FeSO ₄ .7H ₂ O	10,0
	MnSO ₄ .4H ₂ O	3,2
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,8
	CoCl ₂ .6H ₂ O	40,0

O teor de umidade inicial do substrato (m/v) após a adição dos nutrientes e do inóculo foi de 80% em base úmida. Esporos de células crescidas em meio de manutenção – PDA, por 9-10 dias foram ressuspensos assepticamente com a

solução de sais nutrientes descrita por Mandels e Weber (1969). Apenas as linhagens selecionadas no processo de fermentação em tubos foram cultivadas em meio de fermentação em estado sólido. O volume do inóculo para fermentação foi calculado visando atingir uma concentração final de 10^7 esporos.g⁻¹. A concentração necessária obtida para inoculação foi determinada em microscópio óptico, para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Para a inoculação em cada frasco Erlenmeyer, de posse da concentração celular, adicionou-se o volume da suspensão necessário a se inocular os esporos na concentração desejada. A distribuição dos quadrantes para contagem pode ser observada na Figura 4.4. Todas as culturas foram incubadas a 30°C em estufa por 8 dias e todos os experimentos foram realizados em duplicata.

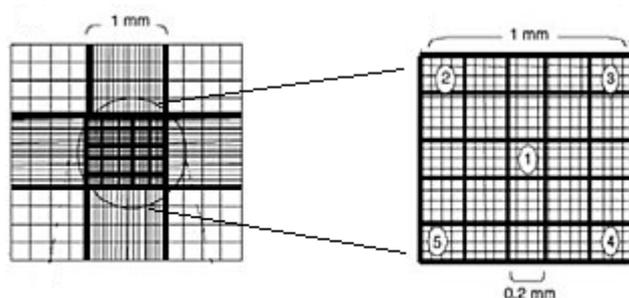


Figura 4.4. Câmara de Neubauer usada para contagem de esporos.

O volume da suspensão de esporos (g) foi calculado pela equação (5).

$$V.\text{inóculo} = m_s \times C.\text{esporos} \times (F \times V_{\text{cam}} \times M)^{-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

V.inóculo = volume inóculo a ser adicionado (mL)

m_s = massa do substrato usado na FES (g)

C.esporos = concentração inicial de esporos desejada na FES (esporos.g⁻¹)

F = fator de diluição;

V_{cam} = volume total da câmara 25×10^4 mL

M = média da contagem de 5 quadrantes (n esporos.mL⁻¹).

4.5.1 Extração das Celulases

À cultura de fermentação em estado sólido de cada frasco, contendo inicialmente 5 g de substrato, foi adicionado e misturado 100 mL de água destilada, ou seja, a proporção massa:volume utilizada foi de 1:20. A mistura foi agitada em incubador rotativo por 40 min à 120 rpm, posteriormente foi filtrada em bomba à vácuo e, o filtrado passou por centrifugação de 10 min à 5000 rpm. O sobrenadante foi colocado em eppendorfs de 2 mL e armazenado em ultra-freezer vertical

(AmericanLab, Brasil) a -80°C . Posteriormente o extrato foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

4.6 Cinética de Produção em FES

O teste cinético foi realizado para estabelecer o melhor tempo de crescimento do fungo *Trichoderma*, visando os melhores índices de produção enzimática em FES nas condições estudadas no presente trabalho. As condições utilizadas para essa fermentação foram baseadas em um estudo realizado por Kekos e colaboradores (2009). Os experimentos iniciais de produção das enzimas do complexo celulolítico por FES e seleção quantitativa foram realizados utilizando 5 g de substrato sólido, composto por 50% de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 50% de farelo de trigo, em frascos Erlenmeyer de 250mL. Ambos os substratos (BC e FT) foram lavados em água e secados em estufa a 50°C por 24h. Foi utilizado o meio nutriente descrito por Mandels e Weber (1969), para esta fermentação (Tabela 4.4). A umidade inicial utilizada foi de 60%, ajustada pela adição de água destilada para que fosse mantida a mesma quantidade de nutrientes em todos os frascos. Para o cálculo de massa de água a ser adicionada para o ajuste da umidade inicial, a seguinte equação (2) foi utilizada:

$$m\text{H}_2\text{O} = \frac{ms(x_2-x_1)}{(100-x_2)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

$m\text{H}_2\text{O}$ = massa de água a ser adicionada;

ms = massa do substrato seco;

x_1 = umidade inicial do substrato;

x_2 = umidade final desejada.

O meio foi autoclavado por 15 min a 121°C . Após o resfriamento, os frascos foram inoculados com uma concentração de 10^7 esporos.g⁻¹ e incubados sob condições estáticas de cultivo a 30°C em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand - Technal). Os testes foram realizados com duas linhagens de *Trichoderma* cedidas pela Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), as quais já haviam passado pelo teste do vermelho congo em placa de Petri (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Linhagens de *Trichoderma* utilizadas no processo cinético da FES.

Fungo	Øc	Øh	Íe
<i>Trichoderma</i> LCB 46	>135	Θ	Θ
<i>Trichoderma</i> LCB 79	98,3	98,3	1,0

Øc=diâmetro da colônia (mm); Øh=diâmetro da hidrólise; Íe=índice enzimático; Θ = halo do tamanho da placa de Petri (135 mm).

O teste cinético foi realizado durante 10 dias, com análises realizadas no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º dias de cultivo. Posteriormente à obtenção dos resultados deste estudo, foi realizada uma seleção dos parâmetros fermentativos significativos, seguida por uma otimização destes parâmetros para a FES.

4.7 Delineamentos Experimentais

Foram utilizados delineamentos experimentais do tipo fatorial completo e composto central rotacional (DCCR) para a seleção dos parâmetros fermentativos e determinação das melhores condições de fermentação em estado sólido para este trabalho. Os experimentos estatísticos e as análises foram realizados utilizando o software Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Utilizou-se para os dois delineamentos a linhagem *T. sp* LCB 46.

4.7.1 Seleção das condições da FES

O delineamento fatorial 2³ completo, resultando em 8 experimentos, incluindo 3 pontos centrais, foi utilizado para determinar o efeito das variáveis: concentração do inóculo, umidade do meio e proporção entre bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) na produção enzimática. As variáveis codificadas e não-codificadas são apresentadas na Tabela 4.5. A seleção dos valores foi baseada em dados da literatura (Maciel, 2006; Mekala et al., 2008) e em experimentos preliminares. Na Tabela 4.6 é apresentada a matriz do planejamento fatorial completo, totalizando 11 experimentos. A seleção das condições da FES foi realizada com a linhagem *T. sp* LCB 46, pois foi a linhagem que apresentou melhores resultados no experimento cinético.

Tabela 4.5. Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2³ completo.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Inóculo (esporos.g ⁻¹) – x1	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Umidade (%) – x2	50	60	70
BC (%) – x3	35	50	65

Os resultados foram ajustados ao modelo linear descrito pela equação (3).

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

O parâmetro y , também denominado de variável resposta, indica a produção da enzima carboximetilcelulase (CMCase), x_1 , x_2 e x_3 são variáveis codificadas para concentração do inóculo, umidade do substrato e proporção entre bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente. Como estamos considerando apenas os níveis baixo e alto para ambos os valores, x_1 , x_2 e x_3 assumem, ambos, os valores -1 e 1. Os parâmetros a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_{12} , a_{13} , a_{23} são do modelo de regressão, estimados através do método dos mínimos quadrados. A estimativa de a_0 é o valor médio de geral das respostas, enquanto as dos demais parâmetros são iguais às metades das estimativas dos efeitos correspondentes.

Tabela 4.6. Matriz do planejamento fatorial 2³ completo.

Experimentos	Variáveis		
	Inóculo	Umidade	BC
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4.7.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Um delineamento composto central rotacional composto de 2² ensaios, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, levando a 11 experimentos no total, foi realizado para se determinar a condição ótima das variáveis umidade e proporção entre bagaço de cana e farelo de trigo. Os valores experimentais foram selecionados a

partir dos resultados obtidos no planejamento anterior, fixando a concentração do inoculo (10^7 esporos.g⁻¹), As variáveis reais e codificadas estão apresentadas na Tabela 4.7. Os resultados foram ajustados pelo modelo quadrático descrito na equação (4).

Tabela 4.7. Variáveis e níveis do delineamento composto central rotacional da FES.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
BC (%) – x1	28	35	50	65	72
Umidade (%) – x2	45	50	60	70	75

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde o parâmetro y (variável resposta) indica a produção da enzima carboximetilcelulase (CMCase), x_1 , x_2 são variáveis codificadas para umidade do substrato e proporção entre bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente. Neste caso estamos considerando além dos níveis baixo e alto, os níveis nos pontos axiais do tipo $\pm\alpha$, onde $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Para ambos os valores, x_1 , x_2 assumem, ambos, os valores -1, 1, -1,41, 1,41. Os parâmetros a_0 , a_1 , a_2 , a_{12} , a_{11} , a_{22} são do modelo de regressão, estimados através do método dos mínimos quadrados. A estimativa de a_0 é o valor médio de geral das respostas, enquanto as dos demais parâmetros são iguais às metades das estimativas dos efeitos correspondentes.

4.7.3 Estudo de influência da variável umidade por *T. reesei* RUT C30

Este estudo permitiu variar os valores do parâmetro, umidade inicial do substrato, acima dos estudados nos delineamentos experimentais realizados anteriormente. Para as outras duas variáveis atingiu-se os melhores valores, desta forma foram mantidas em volume do inóculo a 10^7 esporos.g⁻¹ e concentração BC:FT a 50% cada um totalizando 5 g de substrato. Os valores utilizados para a variável umidade foram de 75, 80 e 85%, a linhagem utilizada para este experimento foi o fungo referência *T. reesei* RUT C30.

4.8 Determinações quantitativas

Para as quantificações enzimáticas descritas a seguir, as atividades foram expressas em unidades internacionais por grama de substrato seco (UI.g⁻¹), tanto para

fins comparativos quanto para a padronização dos resultados. Como pode ser visto na equação (6). Todas as quantificações enzimáticas foram realizadas em duplicata.

$$UI.g^{-1} = [enzima] \times V_{\text{tampão}} \times m^{-1} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

[enzima] = concentração enzimática (UI mL⁻¹)

V_{tampão} = volume do tampão na extração (mL⁻¹)

ms = massa do substrato seco (g)

4.8.1 Atividade CMCase (Endo-1,4-β-Dglucanase)

A atividade celulolítica da endoglucanase (Endo-1,4-β-Dglucanase) foi determinada pelo método do carboximetilcelulose (CMC) de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). Para isto foram incubadas amostras dos complexos enzimáticos (0,5 mL) a 50 °C por 5 min. Depois do período de incubação, 0,5 mL do substrato de CMC (4%) foi acrescentando aos tubos e então colocados novamente em banho ultratermostático (SOLAB SL152, Brasil) a 50 °C por 10 minutos. Após a incubação, 1,0 mL de DNS foi adicionado aos tubos para parar a reação e realizar a determinação dos açúcares redutores como especificado posteriormente no item 4.8.4. O branco reacional foi realizado para todas as determinações enzimáticas, adicionando-se um 1 mL de água destilada e 1 mL de DNS no tubo de ensaio.

4.8.2 Atividade FPase

A quantificação da atividade FPásica foi realizada em papel de filtro de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). O substrato utilizado foi o papel de filtro Whatman No. 1 cortado em tiras de 1,0 x 6,0 cm (cerca de 50 mg). O substrato foi colocado em tubos de ensaio e adicionado 2,0 mL de 0,05 mol.L⁻¹ de tampão citrato e 1 mL do extrato enzimático (diluído quando necessário) e incubado em banho ultratermostático a 50 °C por 60 minutos. A reação é interrompida pela retirada de 1 mL da mistura e adicionada a tubos de ensaio contendo 1,0 mL de DNS, terminando a reação de formação de açúcares. A determinação dos mesmos foi feita segundo metodologia adaptada de Miller (1959) como especificado no item 4.8.4.. Uma unidade de atividade em papel de filtro (FPU) corresponde a 1 mol de açúcares redutores, expresso como glicose, liberados por minuto.

4.8.3 Atividade Xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pela liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a 1% xilana (Sigma) preparada em solução tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,0, a 50°C (BAILEY et al., 1992). A mistura reacional consistiu de 2 mL de uma solução de xilana, aclimatada por 10 minutos na temperatura da reação e 1 mL do complexo enzimático, previamente diluído segundo a necessidade. A reação processou-se em tubos incubados a 50°C por 30 minutos em banho ultratermostático. A reação é interrompida pela retirada de 1 mL da mistura que é adicionada a tubos de ensaio contendo 1 mL de DNS, parando a reação de enzimática. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma unidade (UI) de atividade enzimática correspondeu a $1 \mu\text{mol}$ de xilose liberada por minuto medida por espectrofotometria (leitura a 540 nm), como especificado no item 4.8.4.

4.8.4 Determinação de açúcares redutores por DNS

Os tubos contendo DNS + mistura reacional foram fervidos por 5 minutos, após os quais foram removidos e colocados em banho de gelo para posterior diluição até 15 mL com água destilada. A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 1 mL de água destilada substituíu a amostra, seguindo o mesmo procedimento.

O método foi previamente padronizado por uma curva de calibração de glicose ($0,1$ a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ com intervalos de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Genesys 10 Uv scanning da Thermo Scientific a 540 nanômetros, utilizando cubetas descartáveis. Os valores de absorbância foram convertidos a valores de concentração de glicose (umol.ml^{-1}) mediante interpolação na curva padrão.

Assim, após as determinações analíticas anteriores, as concentrações enzimáticas (UI. mL^{-1}) foram calculadas segundo a equação (6):

$$[\text{enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (t_{\text{reação}})^{-1} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

[AR] = concentração de açúcar produzido (umol.ml^{-1})

V = volume da mistura reacional (mL)

$t_{\text{reação}}$ = tempo de reação enzimática (min)

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Triagem em meio Avicel

A primeira etapa de avaliação do potencial celulolítico das 78 linhagens de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* consistiu na observação do crescimento dos fungos em placa de Petri contendo substrato celulósico, Avicel, como única fonte de carbono. Este teste permitiu eliminar as linhagens que não apresentaram crescimento neste tipo de celulose microcristalina comercial.

Pode-se observar durante esse processo que 49 linhagens avaliadas apresentaram capacidade de hidrolisar o substrato celulósico, Avicel, caracterizando a presença de celulases, especificamente de exoglucanases, produzidas por essas linhagens. A linhagem referência, *T. reesei* RUT C30, também apresentou capacidade de metabolizar o Avicel. Algumas dessas linhagens são apresentadas na Figura 5.1.

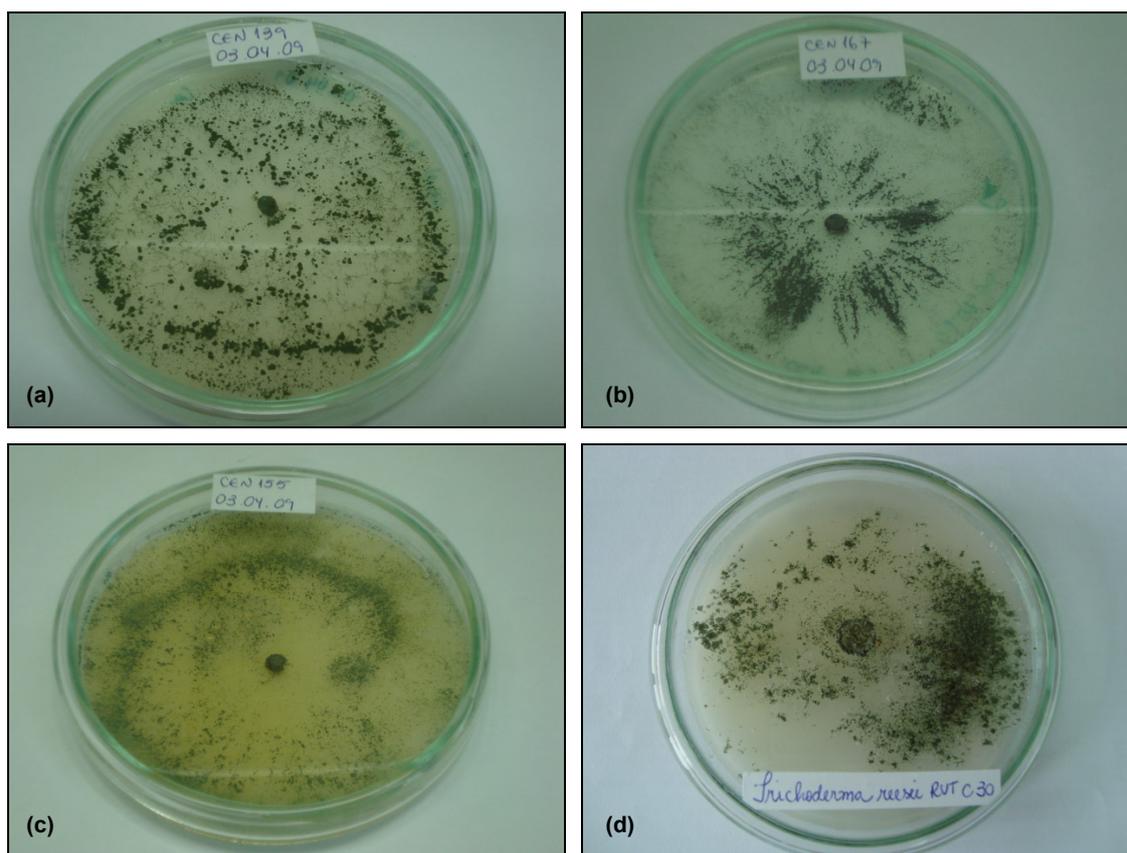


Figura 5.1. Linhagens avaliadas com substrato celulósico, Avicel. (a): *T. harzianum* CEN 139; (b) *T. sp* CEN 167; (c) *T. harzianum* CEN 155; (d) *T. reesei* RUT C30.

A princípio, de acordo com a função catabólica dos fungos filamentosos, as enzimas deveriam ser produzidas na presença da celulose, porém a maioria dos

fungos do gênero *Trichoderma* apresenta enzimas indutivas. Estas enzimas se formam durante o crescimento do fungo e na presença de um indutor (KUBICEK et al., 2009). Portanto, a presença de Avicel no meio de cultura desse experimento em placas de Petri, além de ser fonte de carbono para o crescimento das linhagens de *Trichoderma*, funcionou como um indutor na produção de celulases por esses fungos e permitiu a exclusão dos não produtores para a etapa seguinte do trabalho.

Muitos estudos foram realizados para elucidar o fato de como um polímero insolúvel, como o Avicel, que não pode atravessar a membrana, poderia iniciar a produção de celulases. Várias linhas de explicação foram propostas. Algumas destacaram a presença de um indutor de celulose solúvel com baixo peso molecular. Segundo El-Gogary e colaboradores (1989) e Carle-Urioste e colaboradores (1997) o início da degradação da celulose é a partir da formação de um nível basal muito baixo de celulases que liberam pequenas quantidades de oligossacarídeos e que podem induzir a produção de mais celulases. Portanto, esta característica pode ser considerada uma dificuldade na degradação da celulose microcristalina pelos fungos filamentosos.

As outras 29 linhagens que não apresentaram potencial de degradação do Avicel foram descartadas da etapa seguinte do trabalho, pois mesmo na presença de um indutor não produziram enzimas do complexo celulolítico. Apesar de alguns autores considerarem que na presença de Avicel as enzimas produzidas serão avicelases, para que essa enzima exerça sua função é necessária à presença de endoglucanases para iniciar o processo de hidrólise do substrato. Algumas dessas linhagens podem ser vistas na Figura 5.2. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Segundo Cao e Tan (2002), as exoglucanases ou celobiohidrolases são as enzimas que hidrolisam com maior eficiência a celulose microcristalina, liberando assim, unidades de celobiose. Quando puras, as celobiohidrolases são capazes de degradar Avicel, e em ação sinérgica com as endoglucanases hidrolisam também grande parte da celulose cristalina. Além disso, estudos relatam que a presença de Avicel em determinadas concentrações como indutor em FES podem favorecer a expressão celulásica. Segundo Rodrigues Zúñiga (2010) a atividade enzimática FPase foi efetivamente induzida com o acréscimo de Avicel na concentração de 02% (m/v), as melhores taxas de indução foram às 72h de FES e a atividade aumentou 2,5 vezes quando comparadas aos testes controles.

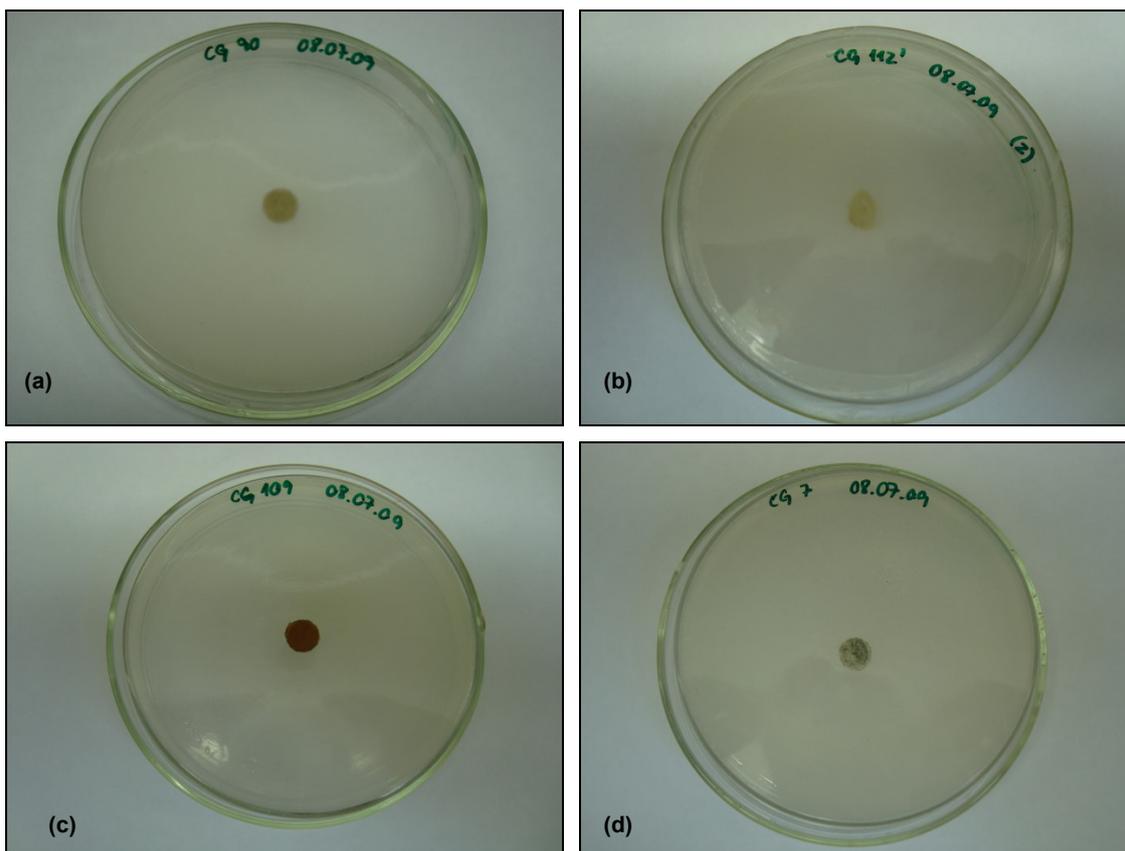


Figura 5.2. Linhagens avaliadas que não apresentaram capacidade de degradação do substrato celulósico, Avicel. (a): *T. sp* CG 90; (b): *T. sp* CG 112; (c): *T. sp* CG 109; (d): *T. sp* CG 07;

As 49 linhagens que conseguiram crescer no meio de cultura com Avicel como única fonte de carbono e com função de indutor, apresentaram habilidade de degradar esse substrato devido capacidade de produção do complexo celulolítico, especialmente das exoglucanases. Portanto, os ensaios em placas com Avicel podem ser utilizados para um *screening* rápido de microrganismos.

5.2 Teste Vermelho Congo

A segunda etapa de avaliação das linhagens contou com o número de 49 fungos filamentosos que foram selecionados no teste de triagem com o substrato celulósico, Avicel. Esta avaliação do potencial celulolítico consistiu na observação do crescimento das linhagens e determinação do diâmetro do halo de hidrólise utilizando o corante vermelho congo.

Em um primeiro momento todas as linhagens testadas apresentaram crescimento da colônia superior a 100 mm após 96h de avaliação, ou seja, todas as linhagens apresentavam o mesmo tamanho que o diâmetro da placa de Petri utilizada no experimento (100x15mm). Dessa forma, não foi possível medir os índices

enzimáticos dos fungos selecionados. Como todas as linhagens apresentaram o mesmo tamanho para a medida halo da colônia, provavelmente, isto implicou em uma limitação física para um crescimento ainda maior dessas linhagens.

Em um segundo momento, para que fosse possível o cálculo do índice enzimático e, conseqüentemente, a seleção das linhagens pelo teste do Vermelho Congo, foi utilizada junto ao meio de triagem a solução Triton X-100 a 10% (m/v). Esta solução é um surfactante não-iônico usado para solubilizar proteínas da membrana (BARBERO et al., 1984). Segundo Fang e colaboradores (2010), a solução Triton-X 100 atua na inibição da expansão da colônia do fungo filamentososo, mas não impede a liberação das enzimas celulasas para que realizem a hidrólise enzimática.

A Figura 5.3 mostra algumas linhagens crescidas em placas de Petri e coradas com vermelho congo, após 4 dias de incubação à 30° C em estufa BOD, utilizando a solução surfactante. Esta fase de seleção foi realizada em três experimentos independentes para que fosse possível a avaliação dos dados estatisticamente.

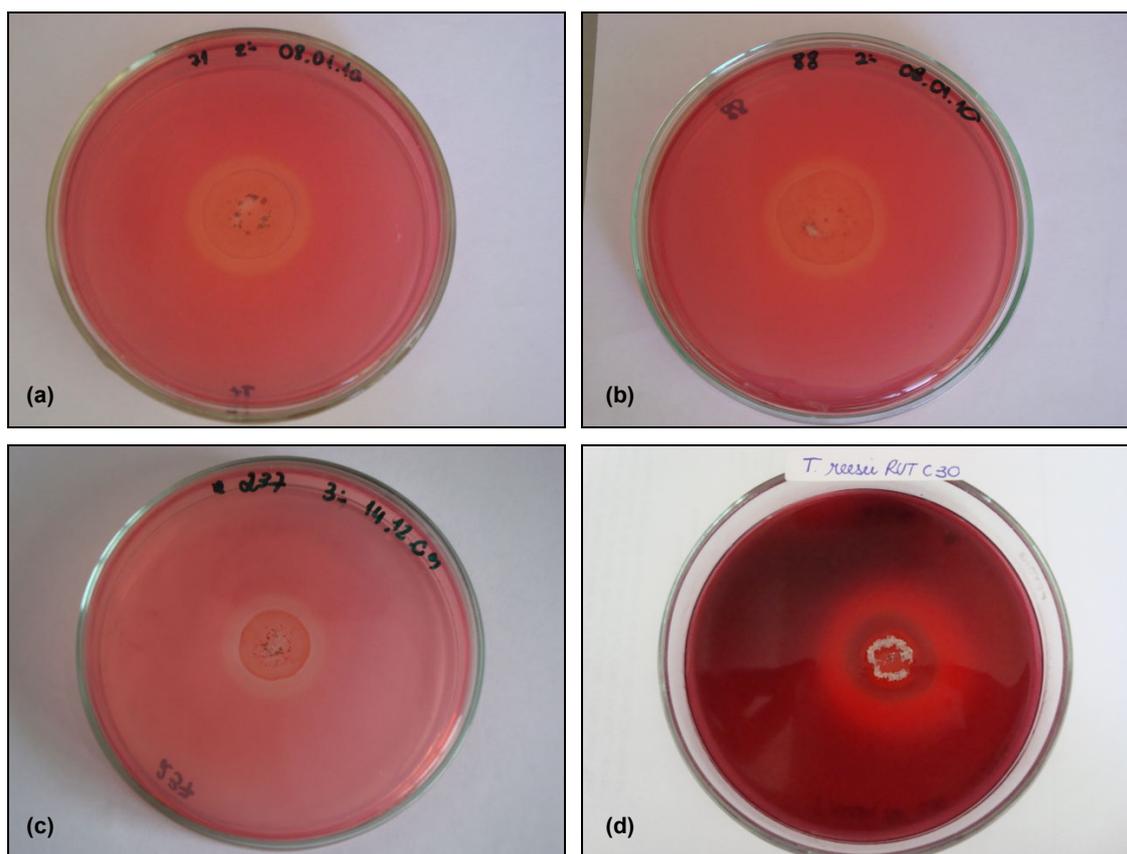


Figura 5.3. Observação dos halos da colônia e de hidrólise após coloração com o vermelho Congo. (a): *T. sp* CG 71; (b): *T. sp* CG 88; (c) *T. harzianum* CEN 237; (d): *T. reesei* RUT C30.

A medida dos diâmetros dos halos de hidrólise observados com o corante vermelho Congo representa uma informação diretamente relacionada à região de atuação das enzimas celulolíticas, visto que o corante vermelho Congo permanece

ligado apenas às regiões onde há ligações β -1,4 glicídicas (CASTRO, 2006). A formação do halo em placas de agar com CMC resulta da clivagem do CMC em fragmentos menores, os quais o corante vermelho Congo não consegue se fixar. Além disso, halos podem resultar da clivagem do CMC em fragmentos suficientemente pequenos para serem lavados das placas durante o processo de coloração.

A zona mais clara ao redor das colônias (Figura 5.3), correspondente ao halo indicador da degradação do CMC, foi observada em 48 linhagens, ou seja, 97,9% dos fungos estudados. A Figura 5.4 mostra a única linhagem que não apresentou halo de degradação do substrato celulósico e que, portanto foi descartada da próxima etapa de seleção das linhagens. Portanto, exceto a cepa *Trichoderma sp.* – CG 87, todas as linhagens apresentaram relação entre o diâmetro do halo de crescimento e o diâmetro do halo de hidrólise do substrato.



Figura 5.4: Observação da linhagem *Trichoderma sp.* CG 87, que não apresentou halo de hidrólise do substrato celulósico.

Alguns estudos realizados para selecionar microrganismos com potencial celulolítico utilizando o corante vermelho Congo observam a formação do halo de hidrólise, porém não fazem o cálculo dos índices enzimáticos. Segundo Sazci e colaboradores (1986) estudos realizados com 7 fungos filamentosos possibilitaram a visualização do halo de hidrólise em todas as linhagens estudadas. Kasana e colaboradores (2008) observaram a formação do halo de hidrólise em bactérias e fungos. Para a linhagem fúngica *Aspergillus niger*, a região clara ao redor da colônia pode ser observada facilmente, porém para a linhagem *Penicillium chrysogenum* o halo de hidrólise foi observado com pouca clareza. A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas podem interferir no corante proporcionando falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (CASTRO, 2006).

A Tabela 5.1 apresenta os resultados das medidas dos halos e cálculo dos índices enzimáticos, obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético contendo CMC como única fonte de carbono, após 4 dias de incubação à 30°C em estufa BOD. Os valores apresentados correspondem à média de medidas de 3 experimentos realizados de forma independente nas mesmas condições.

Tabela 5.1. Cálculo dos Índices enzimáticos dos fungos filamentosos selecionados do gênero *Trichoderma*.

Fungos	Média Øc	Média Øh	i.e.	Desvio Padrão	Fungos	Média Øc	Média Øh	i.e.	Desvio Padrão
Padrão	12,5	35,1	2,98	0,198	06	24,9	34,3	1,38	0,060
139	15,3	27,6	1,74	0,215	11	24,7	31,9	1,31	0,148
145	15,2	22,0	1,45	0,055	50	25,1	34,7	1,39	0,072
151	18,8	27,3	1,46	0,103	51	30,6	37,0	1,21	0,070
153	19,7	27,4	1,39	0,087	58	26,7	36,6	1,37	0,034
155	18,6	29,5	1,61	0,118	58'	26,2	36,7	1,40	0,082
156	18,0	26,4	1,64	0,078	67	25,2	29,2	1,16	0,048
159	17,3	26,5	1,56	0,200	71	25,4	32,8	1,29	0,036
167	19,8	27,0	1,36	0,077	73	27,5	33,9	1,25	0,111
142	16,4	30,2	1,90	0,233	87	21,1	x	x	x
162	18,4	27,1	1,47	0,035	88	22,4	31,1	1,40	0,245
201	16,1	24,0	1,51	0,183	92	24,3	35,2	1,45	0,224
202	16,3	23,2	1,45	0,280	94	18,9	25,5	1,36	0,127
209	17,4	24,2	1,39	0,121	98C	22,5	30,3	1,34	0,048
210	17,1	24,1	1,41	0,084	98D	24,1	32,3	1,35	0,089
219	18,8	27,9	1,48	0,031	100NH	23,3	26,4	1,13	0,026
223	23,0	28,2	1,22	0,021	104NH	18,2	27,3	1,72	0,197
237	15,8	23,3	1,48	0,039	111	21,1	27,9	1,32	0,086
238	17,2	26,7	1,57	0,137	124	29,5	33,5	1,27	0,040
240	12,7	18,4	1,45	0,056	128	25,5	31,4	1,24	0,116
241	10,1	17,2	1,63	0,131	140	22,5	26,9	1,20	0,061
242	13,8	20,3	1,48	0,044	141	23,6	32,6	1,39	0,072
248	15,4	23,3	1,51	0,071	141'	26,0	32,8	1,28	0,133
02	23,8	32,4	1,36	0,053	144	28,1	36,1	1,29	0,077
03	27,8	33,5	1,24	0,251	LCB 46	>135	Ø	Ø	x
05	21,8	30,9	1,42	0,044	LCB 79	96,3	98,3	1,0	0,010

Øc= diâmetro da colônia (mm); Øh= diâmetro do halo (mm); i.e.= índice enzimático; (x)= não produziu halo de hidrólise; Ø=halo do diâmetro da placa de Petri (135 mm).

As linhagens que apresentaram os índices enzimáticos (i.e.) acima de 1,50 foram dez: *Trichoderma koningii* CEN 142, *T. harzianum* CEN 139, *T. sp* CG 104 NH, *T. sp* CEN 156, *T. harzianum* CEN 241, *T. harzianum* CEN 155, *T. harzianum* CEN 238, *T. sp* CEN 159, *T. koningii* CEN 201, *T. harzianum* CEN 248 com valores iguais a 1,90; 1,74; 1,72, 1,64; 1,63; 1,61; 1,57; 1,56; 1,51 e 1,51 respectivamente. Apenas a linhagem, *T. sp* CG 104 NH, foi doada pela Embrapa Meio Ambiente, as outras nove linhagens foram doadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A linhagem hiper-

celulolítica utilizada como referência neste estudo, *T. reesei* RUT C30, apresentou o maior halo de hidrólise dentre as dez linhagens avaliadas, com i.e. de 2,98.

Estudos realizados por Lopes e colaboradores (2009) analisaram a atividade celulolítica por meio de ensaios em placas e cálculo dos índices enzimáticos. Duas linhagens de *Trichoderma* I (T666) e II (T300) apresentaram índices com valores próximos de 1,04 e 1,08 respectivamente. Apesar dos índices não terem sido considerados altos pelos autores observou-se que o crescimento das colônias de *Trichoderma* apresentaram variação de 3 cm em média a cada medição (24h).

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram a capacidade celulolítica de oitenta linhagens de fungos isolados do solo de uma estação ecológica em São Paulo, através do índice enzimático. De todas as linhagens isoladas, 18 eram do gênero *Trichoderma*, porém apenas 4 apresentaram índices enzimáticos para celulasas e a variação dos índices foi de 1,1 a 6,0, sendo o maior í.e. da linhagem *Trichoderma hamatum* I. Segundo os autores, o valor de i.e. não foi um parâmetro adequado para comparar a atividade enzimática entre diferentes linhagens, porém serviu como uma medida útil para a seleção de linhagens de uma mesma espécie.

De acordo com Ten e colaboradores (2004) o diâmetro do halo de hidrólise é útil como um auxiliar para selecionar linhagens com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos. Além disso, o índice enzimático pode ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial para a produção de enzimas celulolíticas tanto de um grupo dentro da mesma espécie quanto de espécies diferentes.

5.3 Fermentação em Tubos de Ensaio

Depois de verificado o potencial celulolítico dos fungos em placa de Petri, partiu-se para um terceiro conjunto de experimentos com as linhagens selecionadas nas duas etapas anteriores. O objetivo desse experimento foi avaliar quantitativamente o potencial de cada uma das dez linhagens selecionadas. Para tal, os microrganismos foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio nutriente e uma tira de papel filtro como única fonte de carbono. Como mostrado na Figura 5.5, o sistema simula um processo de fermentação líquida com substrato insolúvel, o experimento foi realizado em duplicata. Os microrganismos permaneceram principalmente na interface das fases líquida e sólida, pois se ficassem apenas na fase líquida, não teriam acesso ao elemento essencial para seu crescimento, o carbono. Por outro lado, estando na fase sólida, eles podem captar por difusão os demais nutrientes do meio, através da absorção da fase líquida pelo papel.

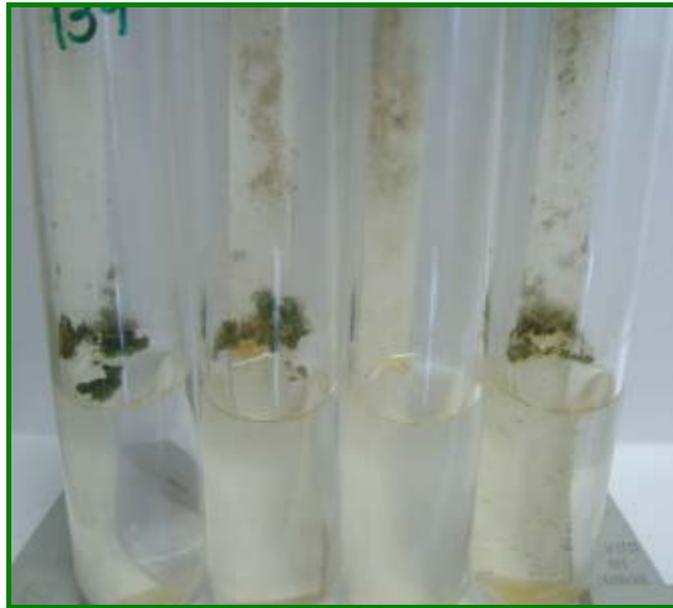


Figura 5.5. Fermentação líquida com substrato insolúvel. *T. harzianum* CEN 139; *T. harzianum* CEN 155; *T. harzianum* CEN 202; *T. atroviride* CEN 223.

Os tubos foram mantidos incubados por quatro semanas e a cada semana um tubo era retirado para ser analisado. Os valores mostrados nas Figuras 5.6, 5.7 e 5.8 são médias de dois ensaios. Diferentemente dos experimentos conduzidos em placas de Petri, a avaliação do potencial celulolítico em tubos de ensaio tem caráter classificatório em relação à seleção das linhagens para a etapa seguinte, FES em Erlenmeyer.

Nos resultados para atividade de CMCCase (Figura 5.6) observou-se que três linhagens *T. harzianum* CEN 139, *T. sp* CG 104NH e *T. harzianum* CEN 155 apresentaram atividades para CMCCase destacadas das obtidas pelas demais linhagens, alcançando após três semanas de cultivo $0,27 \text{ UI.mL}^{-1}$, $0,23 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,22 \text{ UI.mL}^{-1}$ de substrato celulósico (papel de filtro). A linhagem referência, *T. reesei* RUT C30 apresentou atividade de CMCCase de $0,22 \text{ UI.mL}^{-1}$. Em comparação com as melhores linhagens produtoras de CMCCase, a linhagem *T. harzianum* CEN 139 apresentou produção relativamente maior do que a linhagem referência, considerando o desvio-padrão das duas linhagens.

Se compararmos os resultados dos ensaios em placas de Petri com vermelho Congo e a Fermentação em tubos vemos que duas das dez linhagens com maior i.e. foram destaques na produção de CMCCase em fermentação em tubos. As linhagens são *T. harzianum* CEN 139 e *T. sp* CG 104NH.

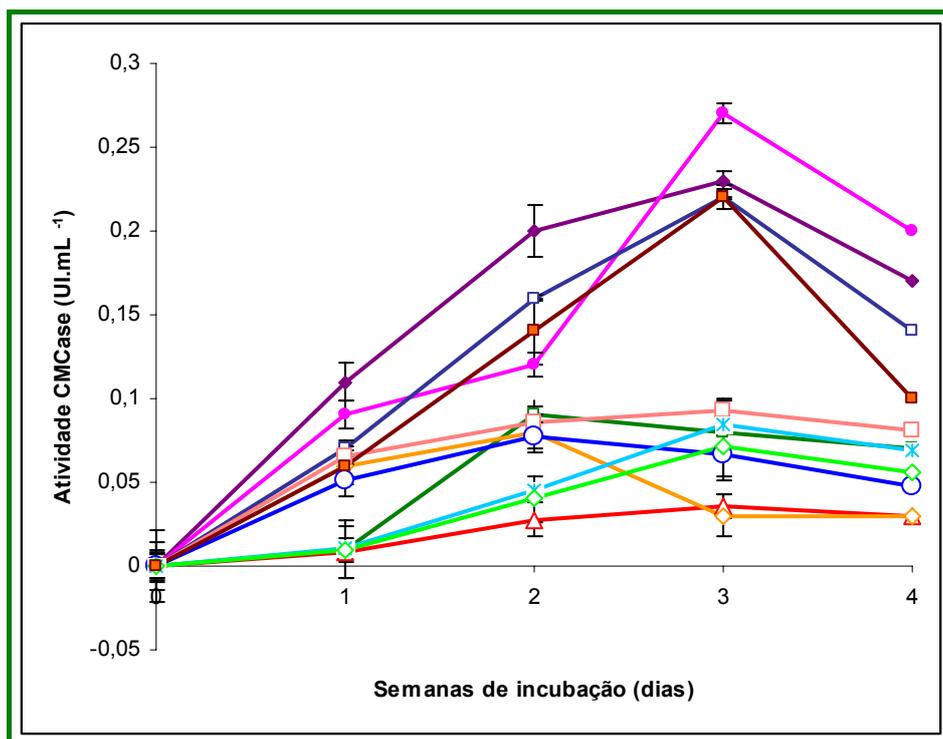


Figura 5.6. Produção de CMCase em fermentação em tubos. (-●-) *T. harzianum* CEN 139; (-□-) *T. harzianum* CEN 155; (-◆-) *T. sp* 104 NH; (-■-) *T. reesei* Rut C30; (- -) *T. asperelum* CEN 201; (-*-) *T. harzianum* CEN 241; (-◇-) *T. harzianum* CEN 248; (-○-) *T. harzianum* CEN 238; (-□-) *T. sp* CEN 156; (-△-) *T. koningii* CEN 142; (-◇-) *T. sp* CEN 159.

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) mediram as atividades para a enzima CMCase e FPase pelo processo de fermentação em tubos utilizando papel filtro, como única fonte de carbono e caldo sintético. Os autores obtiveram resultados interessantes para as linhagens do gênero *Trichoderma* retiradas diretamente do solo, a produção de endoglucanases variou de 0,06 a 1,64 UI.mL⁻¹, sendo a maior produção da linhagem *T. harzianum* V.

Estudos realizados por Castro (2006), apresentaram as maiores atividades enzimáticas em três semanas de cultivo, para a espécie *T. harzianum* IOC 4038, sendo de 0,26 UI.mL⁻¹ para a enzima CMCase. Contudo, para outras espécies do gênero *Trichoderma* os resultados para esta enzima foram menos representativos, sendo de 0,05 UI.mL⁻¹ para *T. harzianum* IOC 4042 e 0,1 UI.mL⁻¹ para *T. harzianum* IOC 3844. Neste estudo também utilizou-se o *Trichoderma reesei* RUT C30 como linhagem referência e obteve-se uma produção de 0,30 UI.mL⁻¹.

A produção da enzima xilanase na fermentação em tubos apresentou valores destacados para algumas linhagens, dentre elas a que apresentou maior produção de xilanase foi *T. harzianum* CEN 155 com 0,22 UI.mL⁻¹, seguida pela linhagem referência *T. reesei* RUT C30 com 0,15 UI.mL⁻¹. A linhagem que se destacou para a produção de CMCase, *T. harzianum* CEN 139, apresentou a terceira maior produção de xilanase, de 0,13 UI.mL⁻¹ (Figura 5.7).

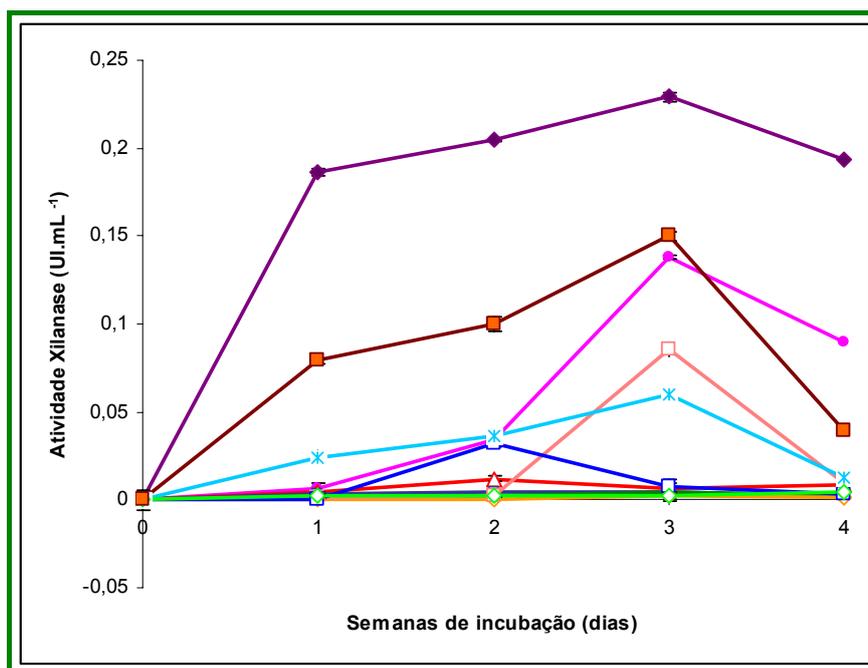


Figura 5.7. Produção de xilanase em fermentação em tubos. (-●-) *T. harzianum* CEN 139; (-□-) *T. harzianum* CEN 155; (-◆-) *T. sp* 104 NH; (- -) *T. reesei* Rut C30; (- -) *T. asperelum* CEN 201; (-*-) *T. harzianum* CEN 241; (-◇-) *T. harzianum* CEN 248; (-○-) *T. harzianum* CEN 238; (-□-) *T. sp* CEN 156; (-△-) *T. koningii* CEN 142; (-◇-) *T. sp* CEN 159.

As análises realizadas para xilanases em fermentação em tubos não puderam ser comparadas a outros trabalhos, pois ainda não foram encontrados estudos que fizessem a medição da atividade enzimática das xilanases pelo processo de fermentação em tubos de ensaio. Sabe-se porém que são poucos os microrganismos que possuem o sistema xilanolítico completo, ou seja, todas as enzimas necessárias para a completa degradação das heteroxilanas (HECK et al., 2005). Os fungos filamentosos *Penicillium capsulatum* e *Talaromyces emersonni* são dois exemplos destes microrganismos (GERBER et al., 1997).

Para a última enzima quantificada no processo de fermentação em tubos, FPase, apresentou a maior produção a linhagem referência *T. reesei* RUT C30 de 0,039 UI.mL⁻¹. Observa-se que *T. sp* CG 104NH apresentou atividade destacada das obtidas pelas demais linhagens selvagens, alcançando em três semanas de fermentação, 0,020 UI.mL⁻¹ de substrato (Figura 5.8). Castro (2006) obteve para a linhagem *T. harzianum* IOC 4042, a produção máxima de 0,040 UI.mL⁻¹ de FPase e para a linhagem usada como referência, *T. reesei* RUT C30, a produção máxima foi de 0,011 UI.mL⁻¹.

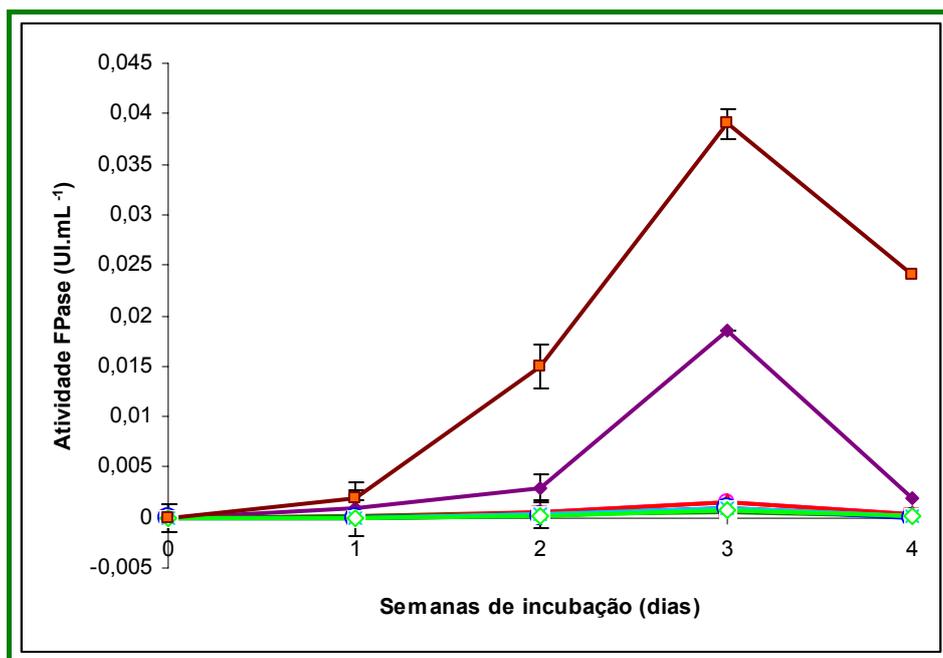


Figura 5.8. Produção de FPase em fermentação em tubos. (-●-) *T. harzianum* CEN 139; (-□-) *T. harzianum* CEN 155; (-◆-) *T. sp* 104 NH; (- -) *T. reesei* Rut C30; (- -) *T. asperelum* CEN 201; (-*-) *T. harzianum* CEN 241; (-◇-) *T. harzianum* CEN 248; (-○-) *T. harzianum* CEN 238; (-□-) *T. sp* CEN 156; (-△-) *T. koningii* CEN 142; (-◇-) *T. sp* CEN 159.

Segundo estudos realizados por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), houve uma variação na atividade FPásica entre as linhagens de *Trichoderma* estudadas, de 0,0 a 0,019 UI.mL⁻¹. Quatro linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* cultivadas em diferentes meios de cultura apresentaram resultados que variaram 0,39 a 1,63 UI.mL⁻¹ (COCHET, 1991). Todavia, o melhor resultado encontrado usando a metodologia de análise similar a descrita anteriormente foi verificado com *Trichoderma sp* A-001 em meio contendo papel de filtro e 0,2% (m/v) do surfactante Tween 80 (GASHE, 1992). Observou-se, portanto, que a atividade das celulases depende não somente da linhagem, mas das técnicas utilizadas para as análises enzimáticas.

Buscando avaliar a existência de uma correlação linear entre os dados obtidos com o teste com vermelho Congo e na fermentação em tubos plotou-se os valores dos índices enzimáticos versus os valores de atividade enzimática das três enzimas quantificadas. Pode-se observar que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,13 e 0,16 para CMCase e Xilanase, respectivamente. Para a enzima FPase apesar do coeficiente de determinação ter sido 0,78, relativamente maior se compararmos as outras duas enzimas, porém os dados para as três enzimas avaliadas não apresentaram correlação linear entre os métodos do vermelho Congo e a fermentação em tubos.

5.4 Cinética de Produção em FES

A primeira etapa para o melhoramento do processo de FES foi a realização do teste cinético, que visou estabelecer o melhor tempo para que o fungo alcançasse os maiores valores de atividade enzimática. Para isso, foram realizados cultivos de FES utilizando frascos Erlenmeyers, nas seguintes condições: concentração do inóculo de 10^7 esporos.g⁻¹; umidade inicial do substrato de 60% e proporção de 50% bagaço de cana-de-açúcar (BC) e 50% farelo de trigo (FT), totalizando 5g de massa seca de substrato. Esta condição foi utilizada no experimento cinético por ser a usada no ponto central do planejamento experimental. Os frascos depois de inoculados, permaneceram em incubação por 10 dias a 30°C, sendo retirado dois frascos a cada dois dias. Apenas a atividade enzimática da CMCase foi determinada (Figura 5.9).

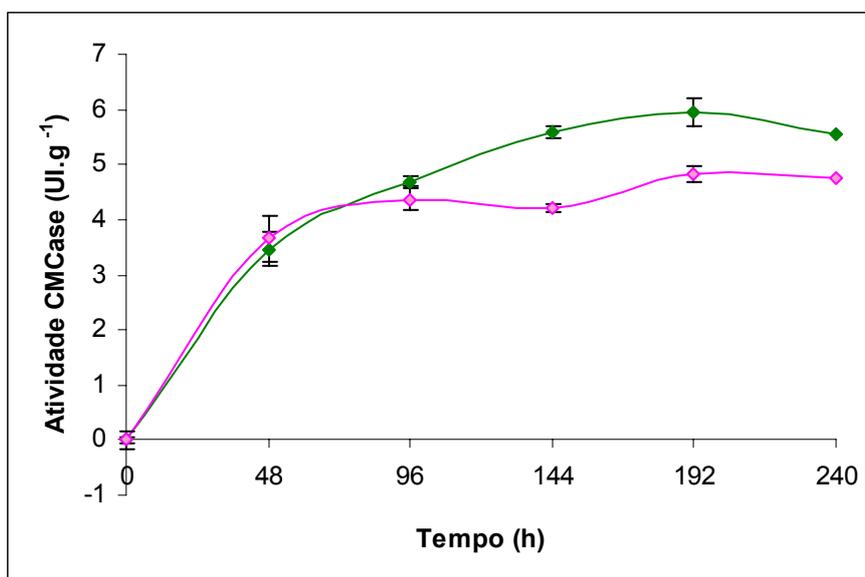


Figura 5.9. Avaliação da máxima produção de CMCase por tempo. (-♦-) *Trichoderma sp* LCB 79 com produção de 4,83 UI.g⁻¹; (-◆-) *Trichoderma sp* LCB 46 com produção de 5,95 UI.g⁻¹.

Foi possível determinar o melhor tempo de cultivo para a produção das enzimas a ser utilizado nos experimentos de avaliação dos parâmetros da FES e do DCCR. Para as duas linhagens testadas foi possível observar (Figura 5.9) que o pico de produção da enzima carboximetilcelulase (CMCase) foi alcançado em 192h (8 dias), com maior produção da enzima CMCase pelo fungo filamentoso *Trichoderma sp* LCB 46 de 5,95 UI.g⁻¹.

Existe uma dificuldade em comparar as atividades enzimáticas obtidas com os dados da literatura, devido aos diferentes substratos utilizados, sua solubilização, diferentes maneiras de expressar a atividade enzimática, e a diferença entre os equipamentos utilizados pelos laboratórios, entre outros fatores (MANDELS et al.,

1976; ENARI e PAAVOLA, 1987; PAVARINA, 1997). Considerando esses fatores, os valores de produção da enzima CMCase, foram comparados a alguns estudos que apresentaram condições aproximadas para a realização da FES.

Resultados recentes utilizando FES e como microrganismo produtor espécies do gênero *Trichoderma* apresentaram valores de atividade enzimática de CMCase próximos, assim como o tempo de cultivo. Segundo estudos realizados por SUN e colaboradores (2010), a produção enzimática de CMCase atingiu valores iguais a 6,2 UI.g⁻¹ em 120h, enquanto estudos realizados por Basso e colaboradores (2010) obtiveram 5,4 UI.g⁻¹ em 216h de processo. Nota-se, portanto, que os valores máximos obtidos da cinética de produção são valores aproximados aos encontrados na literatura.

Uma vez selecionado o melhor tempo para a realização da FES, partiu-se para os delineamentos experimentais, planejamento fatorial completo e delineamento composto central rotacional, a fim de selecionar as melhores condições para a produção das enzimas. Selecionada as variáveis e as condições do processo, estes dados foram utilizados para FES com os fungos pré-selecionados na fermentação em tubos.

5.5 Delineamentos Experimentais

5.5.1 Seleção das Condições da FES

Em processos fermentativos, nos quais cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis, é essencial que seja utilizado um método de análise que permita detectar possíveis interações, de modo que um ponto ótimo seja escolhido, nas condições experimentais. Em qualquer análise experimental deve-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última sendo dependente do tipo de planejamento realizado (ROCHA, 2010). Dessa maneira, a segunda etapa do processo consistiu em avaliar o efeito das variáveis: concentração de inóculo, umidade inicial do substrato e proporção entre bagaço de cana (BC) e farelo de trigo (FT) na produção enzimática. Para tal, conduziu-se experimentos apenas com a linhagem LCB 46, devido ao fato dessa linhagem apresentar os melhores resultados no teste de cinética realizado anteriormente. Os valores codificados empregados no planejamento fatorial 2³ completo, assim como os resultados obtidos para a atividade da enzima (CMCase) são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Planejamento fatorial 2^3 completo com as atividades da CMCase (UI.g⁻¹).

Ensaio	Inóculo	Umidade	BC	CMCase (UI.g⁻¹)
1	10 ⁶ (-1)	50 (-1)	35 (-1)	4,42
2	10⁸ (1)	50 (-1)	35 (-1)	4,75
3	10 ⁶ (-1)	70 (1)	35 (-1)	4,38
4	10 ⁸ (1)	70 (1)	35 (-1)	3,97
5	10 ⁶ (-1)	50 (-1)	65 (1)	1,76
6	10 ⁸ (1)	50 (-1)	65 (1)	0,63
7	10 ⁶ (-1)	70 (1)	65 (1)	1,59
8	10 ⁸ (1)	70 (1)	65 (1)	1,84
9 (C)	10⁷ (0)	60 (0)	50 (0)	4,71
10 (C)	10⁷ (0)	60 (0)	50 (0)	4,73
11 (C)	10⁷ (0)	60 (0)	50 (0)	4,62

Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados apenas para a atividade da enzima CMCase. Observou-se que o máximo valor de produção enzimática alcançado foi de 4,75 UI.g⁻¹, sendo este valor muito próximo dos valores obtidos nos pontos centrais. Além disso, pode-se observar a partir dos valores obtidos nos pontos centrais a reprodutibilidade do processo, como pode ser visto na Tabela 5.2.

As variáveis consideradas significativas para o processo podem ser vistas na Tabela 5.3, sendo considerado neste estudo significativos os valores com $p \leq 0,05$. Neste experimento, os níveis umidade e a concentração do inóculo não mostraram efeito significativo na produção da enzima CMCase, o que pode ser visualizado na Figura 6.0. A proporção entre bagaço de cana-de-açúcar no processo de FES foi a única variável considerada significativa, com efeito negativo quando aumentada a proporção de bagaço de cana no processo. Esse fato, provavelmente se deve a baixa quantidade de nitrogênio presente no BC e ao fato de ser um resíduo com alta recalcitrância, dificultando a hidrólise do BC pelo microrganismo e a produção enzimática e que, portanto, a fonte de nitrogênio e sua quantidade afetam a produção de celulases (PARK et al., 2002; MACIEL, 2006).

Tabela 5.3. Variáveis consideradas significativas através dos efeitos e p-valor.

	Efeitos Estimados	Desvio Padrão	t(4)	p-valor
Média	3,401	0,411	8,284	0,001
(1) Inóculo	-0,243	0,963	-0,253	0,813
(2) Umidade	0,055	0,963	0,057	0,957
(3) BC *	-2,921	0,963	-3,034	0,039
1 x 2	0,158	0,963	0,164	0,877
1 x 3	-0,201	0,963	-0,209	0,845
2 x 3	0,462	0,963	0,480	0,656

* variável considerada significativa a um nível de confiança = 95%.

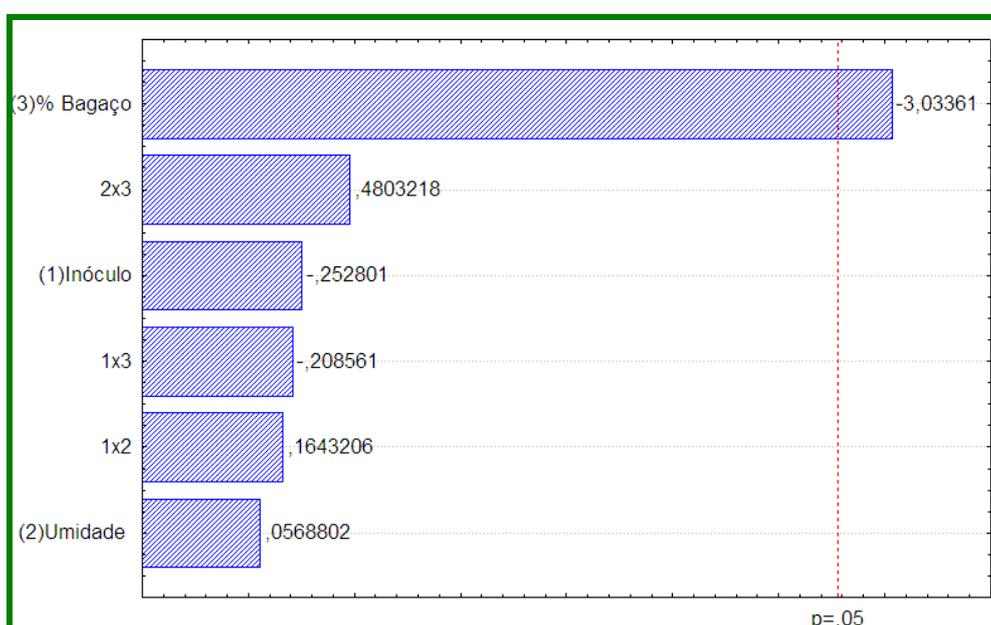


Figura 6.0. Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com $p \leq 0,05$.

Estudos realizados por Mekala e colaboradores (2008), indicam que a concentração usada na maioria dos trabalhos realizados com fungos do gênero *Trichoderma* é de 10^7 esporos.g⁻¹, portanto para o próximo experimento, que visa o melhoramento das condições da FES, a concentração do inóculo foi mantida constante na concentração descrita acima, além de ser o valor já utilizado nos pontos centrais.

5.5.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR), através de um planejamento fatorial completo 2², com quatro pontos axiais e três pontos centrais e os resultados de atividade de CMCase obtidos nesse segundo experimento de

planejamento estão presentes na Tabela 5.4. Os valores nos pontos centrais e nos níveis -1 e 1 para umidade inicial do substrato e proporção BC:FT foram mantidos iguais aos do primeiro planejamento, sendo acrescentado os valores nos pontos axiais descritos e calculados no item 4.5.2. O volume do inóculo utilizado durante a fermentação foi fixado no valor do ponto central, 10^7 esporos.g⁻¹.

Tabela 5.4. Valores reais e Níveis de BC, umidade e atividades de CMCCase (UI.g⁻¹).

Experimentos	BC (x1)	Umidade (x2)	Produção CMCCase (UI.g⁻¹)
1	35 (-1)	50 (-1)	5,87
2	65 (1)	50 (-1)	7,79
3	35 (-1)	70 (1)	8,81
4	65 (1)	70 (1)	9,17
5	28 (-1,41)	60 (0)	2,70
6	72 (1,41)	60 (0)	6,65
7	50 (0)	45 (-1,41)	11,09
8	50 (0)	75 (1,41)	11,16
9 (C)	50 (0)	60 (0)	10,21
10 (C)	50 (0)	60 (0)	9,50
11 (C)	50 (0)	60 (0)	10,21

Alguns ensaios apresentaram valores para atividade da enzima CMCCase muito próximos aos valores exibidos pela triplicata realizada no ponto central. Porém, nota-se nesse planejamento que os maiores valores da produção enzimática duplicaram em relação ao primeiro planejamento realizado.

A Tabela 5.5 mostra os valores encontrados para os efeitos estimados, desvio padrão, teste *t* e *p*-valor, com todas as variáveis estudadas sem a exclusão dos termos não significativos. Os termos lineares estão representados pela letra L e os termos quadráticos estão associados a letra Q. Pode-se observar nessa tabela o efeito negativo do termo quadrático para variável proporção BC.

A análise de variância foi realizada para avaliar o ajuste dos dados experimentais ao modelo quadrático proposto. A Tabela 5.6 mostra a análise de variância dos fatores estudados e descreve os dados de acordo com o modelo quadrático. A significância da falta de ajuste, do erro e do modelo foram utilizadas para avaliar se o modelo proporcionou um ajuste satisfatório. O teste F mostrou que o modelo utilizado se ajustou adequadamente com os dados experimentais, sendo 20,98 vezes maior que o *F* tabelado. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o

modelo foi 0,90. A máxima atividade de CMCase obtida nesse estudo foi de 11,16 (UI.g⁻¹).

Tabela 5.5. Resultados do efeito estimado, desvio padrão, teste *t* e p-valor obtidos no DCCR para a atividade da CMCase.

	Efeito Estimado	Desvio Padrão	t(5)	p-valor
Média *	9,978	0,512	19,480	0,000
(1) BC(L) *	1,968	0,627	3,137	0,026
BC(Q) *	-5,291	0,747	-7,086	0,001
(2) Umidade (L)	1,103	0,627	1,759	0,139
Umidade (Q)	1,155	0,747	1,547	0,182
1L x 2L	-0,782	0,887	-0,882	0,418

* variáveis significativas a 90% de confiança.

Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) das respostas da proporção BC:FT e umidade.

Variáveis Estatísticas	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados
Regressão	59,17	3	59,18
Resíduo	6,43	7	0,91
Total	65,61	10	
$F_{(Modelo)}$		64,41	
R^2		0,901	
Nível de confiança		90%	
$F_{tab(3; 7; 0,1)} =$		$F_{Tabelado} =$	3,07
		$F_{Modelo} / F_{Tabelado} =$	20,98

Posteriormente ao ajuste dos dados experimentais através da análise da variância é apresentada a Tabela 5.7 apenas com as variáveis consideradas significativas. Os valores dos coeficientes de regressão mostraram, assim como o p-valor, a variável proporção BC:FT linear e quadrático, como sendo significativas a um $p \leq 0,1$. A umidade inicial do substrato, dentro da faixa estudada, não se mostrou um parâmetro significativo na produção enzimática. Porém, analisando o planejamento no contexto geral o valor de *p* encontra-se muito próximo de 0,1, indicando que um aumento no valor da umidade inicial poderia aumentar a produção das celulasas. O modelo após a eliminação dos parâmetros não significativos está descrito na equação quadrática (4.1).

$$\text{Atividade CMCase (UI.g}^{-1}\text{)} = 10,52 + 0,98(BC) - 2,81(BC)^2 + 0,55(\text{Umidade}) \quad (\text{Eq. 4.1}).$$

Tabela 5.7. Variáveis consideradas significativas através dos efeitos estimados e p-valor, com exclusão dos termos não significativos.

	Efeito Estimado	Desvio Padrão	t(7)	p-valor
Média	10,521	0,403	26,129	0,000
(1)BC (L)	1,96	0,678	2,904	0,023
BC(Q)	5,63	0,771	-7,303	0,000
(2)Umidade (L)	1,10	0,678	1,628	0,148

Nível de confiança = 90%; p-valor \leq 0,1.

Estudos realizados por Souza e colaboradores (1999) e confirmados por Maciel (2006) indicam que o planejamento realizado para otimizar condições da FES mostrou que as variáveis umidade inicial e a proporção de bagaço de cana foram os efeitos mais importantes na produção de enzimas do complexo celulolítico. A Figura 6.1 mostra as regiões consideradas ótimas para as duas variáveis estudadas, com o modelo ajustado. A umidade inicial do substrato influenciou a produção de CMCase a qual mostrou uma tendência de melhora com o aumento no conteúdo de umidade.

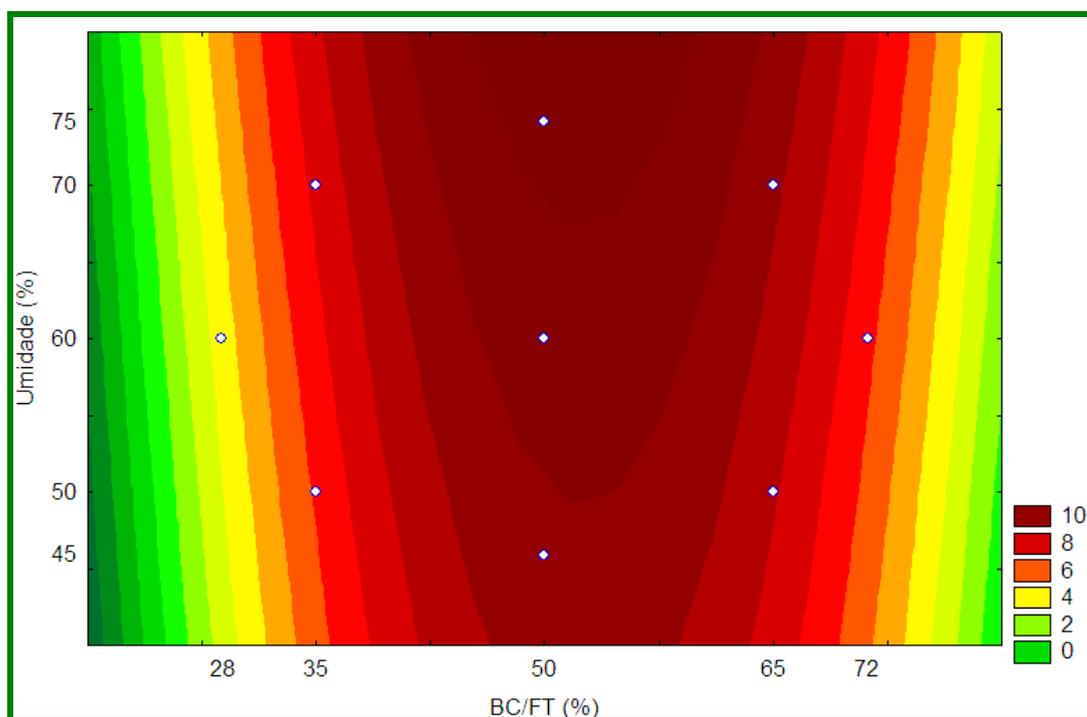


Figura 6.1. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade e razão BC/FT.

A importância crítica do nível de umidade em FES e sua influência na biossíntese e liberação de enzimas pode ser atribuída à interferência da umidade nas propriedades físicas das partículas sólidas. Um aumento no nível de umidade não

deve interferir nas ligações entre água e substrato sólido, onde se forma uma fina camada na superfície das partículas, podendo reduzir a porosidade de alguns substratos, e assim limitando a transferência de oxigênio. Por outro lado, um conteúdo baixo de umidade causaria a redução da solubilidade dos nutrientes do substrato e baixo grau de turgescência (ELLAIAH et al., 2002). Desta forma, estudos de otimização deste parâmetro são bastante relevantes em FES.

5.5.3 Estudo da Variável Umidade com *Trichoderma reesei* RUT C30

Nos experimentos anteriores a variável umidade inicial do substrato não atingiu os melhores valores de produção, por isso, foram realizados experimentos com outros níveis de umidade utilizando a linhagem referência *T. reesei* RUT C30. As condições da FES permaneceram as selecionadas nos experimentos anteriores de delineamentos experimentais, como, volume do inóculo 10^7 esporos.g⁻¹, 5 g de substrato, sendo 50% BC e 50% FT. A Figura 6.2 mostra os valores obtidos para atividade da CMCase na faixa estudada para a variável umidade.

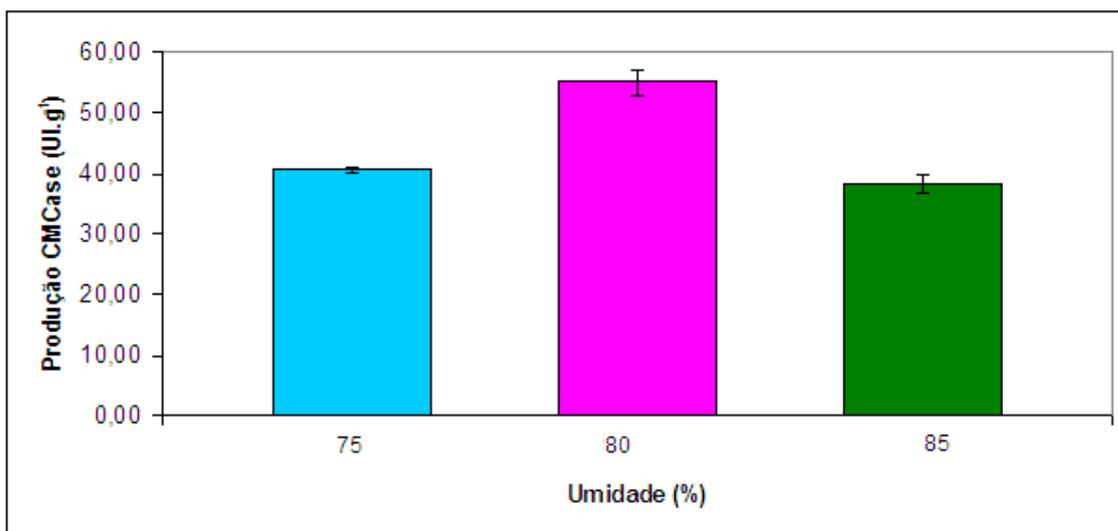


Figura 6.2. Atividade CMCásica em diferentes níveis de umidade por *T. reesei* RUT C30.

Observou-se nesses resultados que a produção de CMCase foi melhor para umidade inicial do substrato em 80%, considerando o desvio-padrão de 2%. A umidade inicial na maioria dos casos não pode ser considerada em valores acima de 85%, devido aos níveis de retenção de água dos substratos utilizados. Por isso, a partir da Figura 6.2 é possível visualizar uma queda na produção da enzima quando se utiliza a umidade inicial de 85%. Dessa forma, fixou-se o parâmetro umidade inicial do

substrato a 80% nos experimentos de FES com os fungos selecionados na fermentação em tubos.

5.6 FES em frascos Erlemeyers

Com o objetivo de selecionar as melhores linhagens produtoras de celulases por FES, apenas os fungos selecionados na etapa de fermentação em tubos de ensaio passaram por esse processo de seleção. As linhagens *T. harzianum* CEN 139, *T. harzianum* CEN 155, *T. sp* CG 104NH foram as utilizadas no processo de FES, pois se destacaram pela produção das três enzimas estudadas anteriormente. As condições de cultivo utilizadas no processo de FES foram as selecionadas nos delineamentos experimentais realizados anteriormente. Utilizou-se 5 g de substrato, sendo 50% BC e 50% FT, 80% de umidade inicial do substrato e inóculo de 10^7 esporos.g⁻¹.

A Figura 6.3 apresenta as atividades enzimáticas de CMCase para as três linhagens selecionadas nas etapas anteriores. A linhagem com a atividade enzimática mais elevada para a produção de CMCase foi *T. sp* CG 104NH com 25,9 UI.g⁻¹. O fungo referência, linhagem essa mutante, apresentou valor igual a 70,2 UI.g⁻¹.

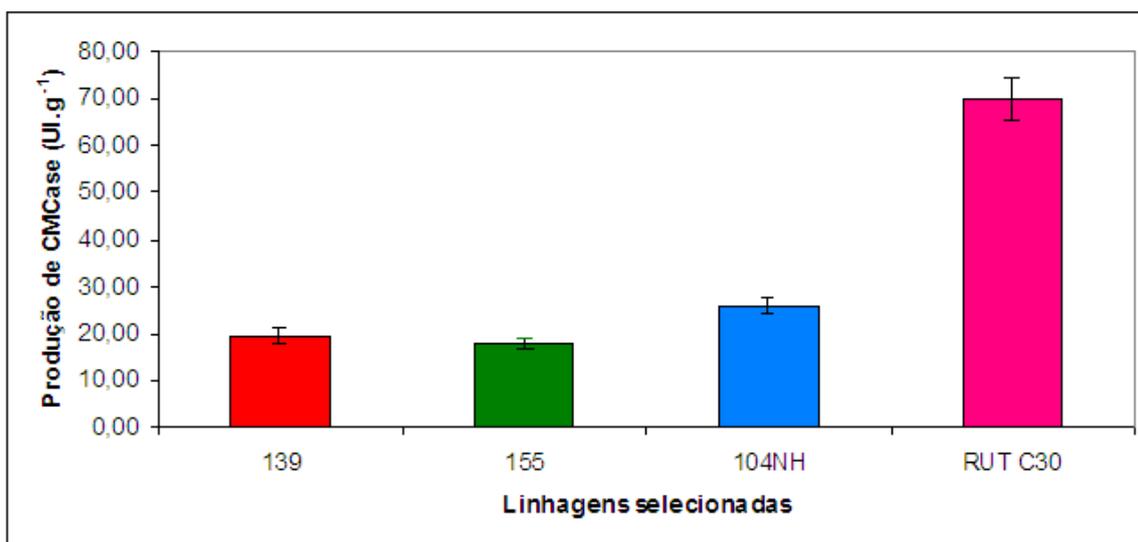


Figura 6.3. Resultados das atividades CMCásica obtidas por FES

Estudos realizados com linhagens de *Trichoderma* apresentam variação nos valores devido a algumas características do próprio fungo filamentoso ou bem como características do processo de FES. A Tabela 5.8 compara dados de produção da celulase, CMCase, por processo de FES por fungos do gênero *Trichoderma* variando principalmente o substrato utilizado no processo. Os valores para linhagens mutantes são próximos aos encontrados no presente estudo pela linhagem referência,

Trichoderma reesei RUT C30. Para as linhagens não modificadas geneticamente, como é caso das selecionadas no presente trabalho os valores encontrados na literatura também foram menores.

Tabela 5.8. Comparação nos valores de Produção de CMCase por *Trichoderma* em FES.

Autores	Linhagem	Substrato	CMCase (UI.g⁻¹)
Basso et al., (2010)	<i>T. reesei</i> QM 9414	BC	5,4
Zhao et al., (2010)	<i>T. sp</i> 32942	FT + CA	13,9
Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)	<i>T. reesei</i> LM-UC4	BC	18,8
Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)	<i>T. reesei</i> LM-UC4E1	BC	22,6
Oberoi et al., (2008)	<i>T. reesei</i> RUT C30	FT+PC	25,2
Presente estudo	<i>T. sp</i> CG 104NH	BC+FT	25,93
King et al., (2009)	<i>T. reesei</i> RUT C30	Avicel	55,71
Presente estudo	<i>T. reesei</i> RUT C 30	BC+FT	70,24
Chandra et al., (2009)	<i>T. reesei</i> QM 9414	FT	94,13

FT=farelo de trigo, CA=casca de arroz, BC=bagaço de cana, PC=polpa cítrica.

Os resultados obtidos em termos de produção de xilanase foram menos expressivos se comparados à linhagem referência. A produção enzimática das linhagens selecionadas não passou de $67,17 \pm 0,70$ UI.g⁻¹ para o fungo *Trichoderma* sp CG 104NH. A linhagem *T. reesei* RUT C30 alcançou a produção de 533,38 UI.g⁻¹ de atividade xilanásica. A Figura 6.4 compara a produção de xilanase entre as três espécies selecionadas para o processo de FES e a linhagem utilizada como referência.

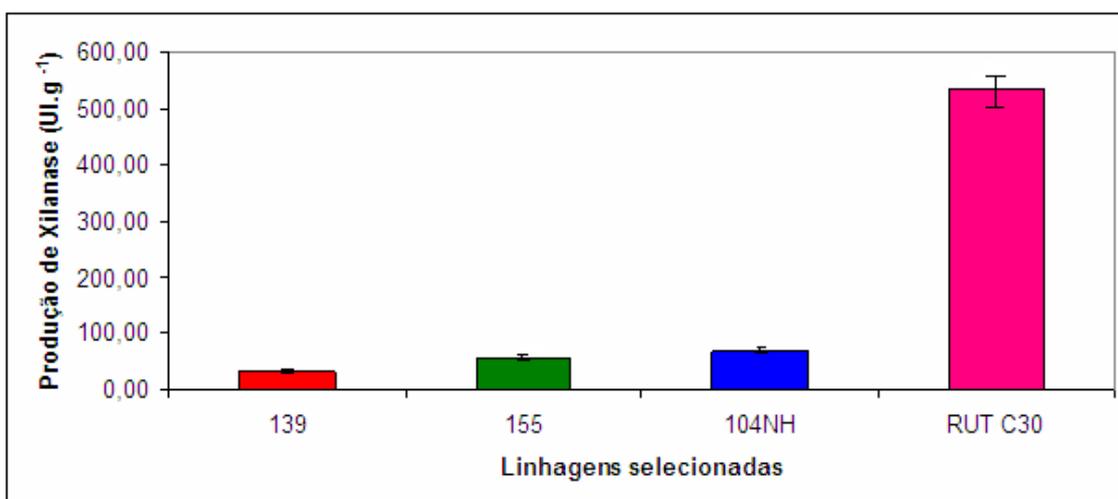


Figura 6.4. Resultados das atividades Xilanásica obtidas por FES

A Tabela 5.9 compara alguns valores para a produção de xilanase encontrados na literatura, utilizando linhagens do gênero *Trichoderma* e FES. Existe uma grande variação entre as atividades enzimáticas desta enzima, pois as condições do processo de FES se diferenciam em cada trabalho. A produção alcançada por Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998) de 1968,0 UI.g⁻¹ por processo de FES apresentou uma suplementação do substrato bagaço de cana por uma fonte de nitrogênio, que neste caso foi o farelo de soja. Outros estudos confirmam que as utilizações de culturas mistas de fungos e suplementação do meio aumentam o rendimento na produção de celulases (Purkathofer et al., 1993; Ghandi et al., 1994, Haltrich e Steiner, 1994).

Tabela 5.9. Comparação nos valores de Produção de Xilanase por *Trichoderma* em FES.

Autor	Linhagem	Substrato	Xilanase (UI.g⁻¹)
Presente estudo	<i>T. sp</i> CG 104NH	BC+FT	67,17
Deshpande et al., (2008)	<i>T. reesei</i> QM 9414	FT	165,5
Rezende et al., (2002)	<i>T. harzianum</i>	BC	391,9
Presente estudo	<i>T. reesei</i> RUT C30	BC+FT	533,38
Simões et al., (2008)	<i>T. viride</i>	FT	1047,0
Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)	<i>T. reesei</i> LM-UC4E1	BC+FS	1968,0

FT=farelo de trigo, BC=bagaço de cana, FS=farelo de soja.

A produção de xilanase também pode sofrer variação devido ao tipo de xilana utilizada na quantificação das enzimas. A origem das xilanas pode influenciar diretamente na faixa de variação enzimática, pois sua cadeia principal pode apresentar diferentes ramificações. Por exemplo, a xilana originada de Angiospermas apresentam uma alta taxa de substituição (70-80%) de glucanoroxilanas por grupos acetil, diferentemente da xilana de gimnospermas (POLIZELI et al., 2005).

Para a atividade enzimática de FPase pode-se observar na Figura 6.5 a linhagem *T. sp* CG 104NH com a maior produção, de 1,87 UI.g⁻¹, dentre os três fungos selecionados para o processo de FES. A linhagem referência apresentou a maior produção de FPase, 7,28 UI.g⁻¹, assim como nas atividades medidas para as outras enzimas do complexo celulolítico.

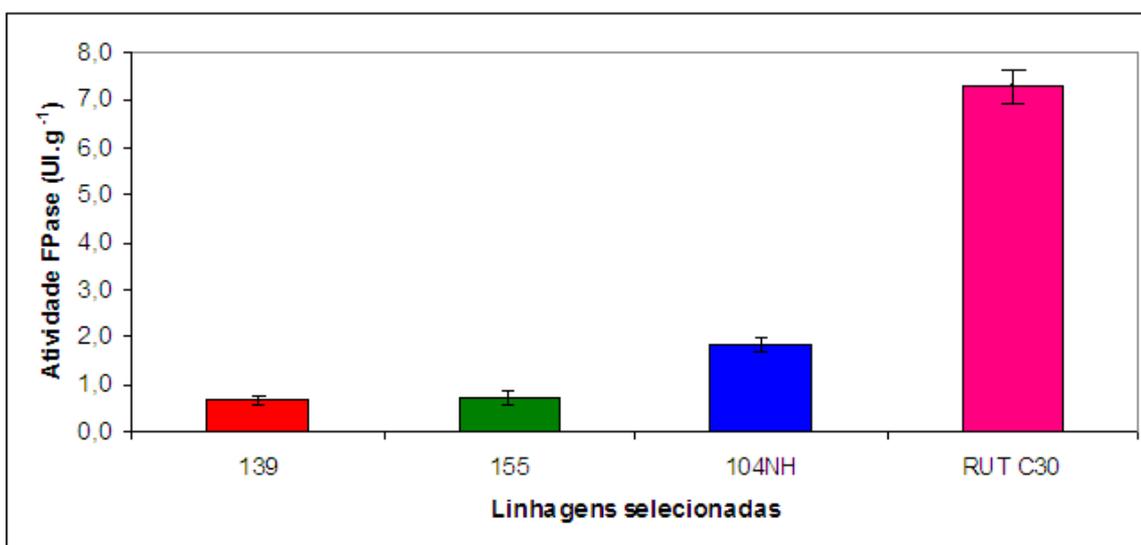


Figura 6.5. Resultados das atividades FPásica obtidas por FES

Comparativamente a faixa de variação entre a produção de Fpase é menor do que o das outras enzimas celulolíticas. A Tabela 6.0 traz resultados obtidos por alguns autores para a produção de FPase por fungos do gênero *Trichoderma* em FES. O substrato utilizado no processo de FES influencia relativamente na produção da enzima FPase, visto que a quantificação desta enzima nos mostra o sinergismo das celulases.

Tabela 6.0. Comparação nos valores de Produção de FPase por *Trichoderma* em FES.

Autor	Linagem	Substrato	FPase (UI.g ⁻¹)
Latifian et al., (2007)	<i>T. reesei</i> QM 9414	FA	1,0
Presente estudo	<i>T. sp</i> CG 104NH	BC+FT	1,87
Basso et al., (2010)	<i>T. reesei</i> QM 9414	BC	4,0
Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)	<i>T. reesei</i> LM-UC4	BC	5,3
King et al., (2009)	<i>T. reesei</i> RUT C30	Avicel	5,94
Presente estudo	<i>T. reesei</i> RUT C30	BC+FT	7,28
Zhao et al., (2010)	<i>T. sp</i> 32942	FT + CA	7,69
Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)	<i>T. reesei</i> LM-UC4E2	BC	10,0
Brijwani et al., (2010)	<i>T. reesei</i> QM 2124	CS + FT	10,55

FA=farelo de arroz, BC=bagaço de cana, FT=farelo de trigo, CA=casca de arroz, CS=casca de soja.

A maioria dos estudos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em FES focam na recalcitrância que esse resíduo agroindustrial apresenta, por isso a dificuldade em hidrolisar esse produto. Desta maneira, os resíduos de BC utilizados por todos os autores citados neste trabalho passaram por pré-tratamentos, isso facilita

a ação das enzimas na celulose do BC e quando quantificadas, o valor de produção das mesmas é maior. Ressalta-se, que no presente trabalho foi utilizado BC *in natura*, ou seja, este resíduo não passou por nenhum tipo de pré-tratamento.

Após a quantificação das enzimas celulolíticas vistas anteriormente, pode-se observar que das três linhagens selecionadas para o processo de FES, a linhagem *T. sp* CG 104NH apresentou a maior produção para as três enzimas estudadas, CMCase, Xilanase e FPase.

A maioria dos estudos realizados em placas com corantes apenas são realizados para verificar se as linhagens estudadas apresentam capacidade de degradar o substrato testado, conseqüentemente sua capacidade em produzir tais enzimas. Porém, o presente trabalho buscou além de verificar a produção de enzimas celulolíticas, uma possível correlação existente entre a metodologia em placas com corante vermelho Congo e o processo mais complexo da FES. A Figura 6.6 mostra a correlação obtida entre as duas metodologias, as medidas dos índices enzimáticos do teste do vermelho Congo e a FES com os valores de produção das três enzimas estudadas.

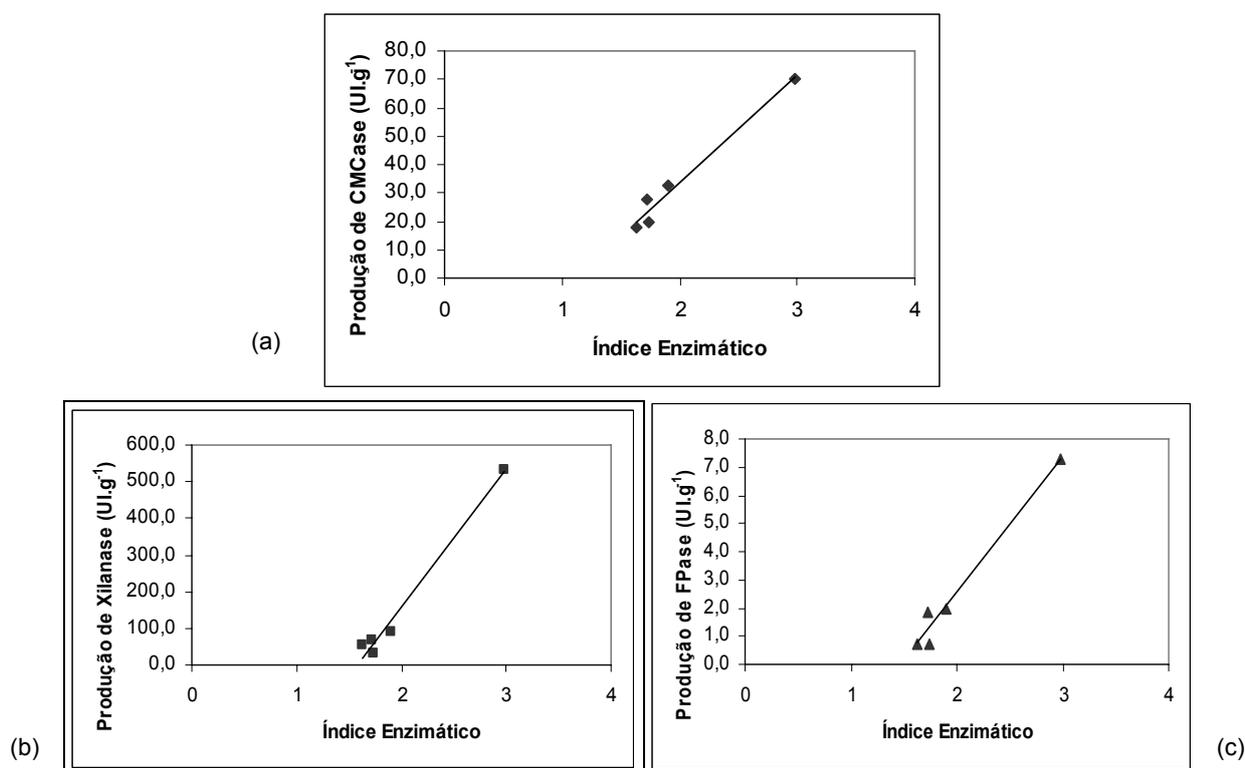


Figura 6.6. a) Produção de CMCase (UI.g⁻¹) das 3 linhagens de *Trichoderma*, incluindo *T. reesei* RUT C30 como referência e os i.e. de cada linhagem respectivamente. b) Produção de Xilanase (UI.g⁻¹) e os i.e. c) Produção de FPase (UI.g⁻¹) e os i.e.. Os pontos individuais representam a média de dois experimentos independentes e a linha reta representa o ajuste da regressão linear.

A correlação entre os dados obtidos entre a metodologia qualitativa (VC) e quantitativa (FES) também foi determinada para as três enzimas quantificadas e diferentemente dos resultados com a fermentação em tubos, o coeficiente de determinação (R^2) foi próximo a 1, apresentando valores iguais a 0,97; 0,98 e 0,97 para as enzimas CMCase, Xilanase e FPase respectivamente. Portanto, esses resultados mostram que há uma correlação linear entre as metodologias e que é interessante o uso de um *screening* inicial em placas com a utilização de corante vermelho Congo seguido de processo fermentativo em estado sólido para a seleção de linhagens de *Trichoderma* produtoras de celulases.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho visou avaliar e selecionar linhagens do fungo *Trichoderma* com capacidade de produção de enzimas do complexo celulolítico. Com base nos resultados obtidos, chegou-se as seguintes conclusões:

- A avaliação qualitativa da capacidade das linhagens hidrolisarem o meio sintético e cristalino, Avicel, como única fonte de carbono, selecionou 49 linhagens das 78 iniciais. Portanto, o teste qualitativo pode ser empregado para uma seleção inicial das linhagens produtoras de enzimas celulolíticas;
- O segundo experimento realizado, teste do vermelho Congo, com as 49 linhagens selecionadas na primeira avaliação, mostrou que 97,9% das linhagens possuíam habilidade de expressar celulases. Porém, apenas dez linhagens apresentaram índices enzimáticos acima de 1,50 e foram selecionadas para a terceira etapa do trabalho. Essa segunda avaliação também com caráter qualitativo, comprovou que é possível selecionar linhagens produtoras de celulases dentro de um mesmo gênero de fungo filamentoso através da medida do índice enzimático;
- A análise do potencial celulolítico das dez linhagens selecionadas para a fermentação em tubos de ensaio, indicou *T. sp* CG 104NH, *T. harzianum* CEN 139 e *T. harzianum* CEN 155 como as linhagens melhores produtoras das enzimas CMCase, Xilanase e FPase. Porém, notou-se que não houve correlação linear entre a habilidade de produzir celulases pelo método qualitativo (teste vermelho Congo) e a produção das enzimas analisadas por fermentação em tubos de ensaio.
- O teste cinético realizado estabeleceu o melhor tempo de produção de enzimas por fungos do gênero *Trichoderma* em 192h (8 dias);

- A seleção das condições da FES avaliou três parâmetros fermentativos no primeiro planejamento experimental, fatorial 2^3 completo. A única variável considerada significativa dentro dos níveis estudados foi a proporção de bagaço de cana, apresentando um efeito negativo sobre o processo;
 - O Delineamento Central Composto Rotacional 2^2 , apresentou boa resposta para o modelo. O parâmetro fermentativo proporção BC continuou como sendo significativo, e a umidade inicial do substrato apesar de não se apresentar como variável significativa pelos dados estatísticos, mostrou-se importante no processo de FES. Podendo ser visto este efeito, através do aumento expressivo na produção da enzima CMCase, que chegou a $11,16 \text{ UI.g}^{-1}$ de CMCase;
 - O teste de umidade realizado com a linhagem referência, *T. reesei* RUT C30, confirmou a importância da variável umidade no processo de FES, sendo o valor com maior produção de enzimas 80%;
 - O processo de FES selecionou a linhagem *T. sp* CG 104NH como a principal entre as três estudadas, pois se destacou na produção das enzimas celulolíticas (CMCase, Xilanase e FPase). Além disso, foi verificada a correlação entre esta metodologia e a do teste com vermelho Congo. A correlação linear estabelecida gerou um coeficiente de $R^2=0,97$; 0,98 e 0,97 para as enzimas CMCase, Xilanase e FPase, respectivamente.
 - A linhagem *T. sp* CG 104NH foi a selecionada dentre as 78 linhagens avaliadas como melhor produtora de celulasas, pois foi a linhagem que passou por todas as etapas de seleção. E nos processos quantitativos foi a que se destacou com os melhores valores de produção das enzimas celulolíticas estudadas.
- De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de *screening* para selecionar linhagens de um extenso banco de fungos e posteriormente a utilização de um processo fermentativo com a utilização de resíduos agroindustriais.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Classificar até o nível de espécie a linhagem de *Trichoderma* selecionada;
- Realizar FES utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos pela linhagem que se destacou no presente estudo, *T. sp* CG 104NH;

- Determinar a produção das enzimas celulolíticas no reator instrumentado de bancada, nas mesmas condições e comparar com os resultados obtidos em erlenmeyers;
- Realizar melhoramento genético da linhagem *T. sp* CG 104NH, visto que seus resultados para a produção de celulasas foram expressivos diante das outras linhagens selvagens;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ANDRADE, L.P.; GALVÃO, C.M.A.; ATALA, D.I.P.; CASTRO e SOUZA, M.A. de; BAUDEL, H.M.; TOMÉ, J.A.T.R. **Estudo comparativo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando diferentes coquetéis enzimáticos**. SINAFERM, Natal-RN, 2009.

ARANTES, V.; SADLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. 2010 Article in press. doi:10.1186/1754-6834-3-4.

AWAFO, V.A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics**. 1997. 255f. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

BAILEY, M.J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**. v, 23, n. 3, p. 257-271, 1992.

BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M.J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 833–848, 2009.

BARBERO, M. C.; VALPUESTA, J.M.; RIAL, E.; GURTUBAY, J.I. GOÑI, F.M.; MACARULLA, J.M. Effect of the nonionic detergent Triton X-100 on mitochondrial succinate-oxidizing enzymes. **Archives Biochemistry Biophysics**. v.228, n.2, p. 560–568.1984.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MEJÍA, A. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. **Biotechnology Annual Review**. v. 2, p. 85-121, 1996.

BASSO, T.P.; GALLO, CR.; BASSO LC. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.11, p. 1282-1289, 2010.

BÉGUIN, P.; AUBERT J. The biological degradation cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**. v.13, n. 1, p 25-58, 1994.

BELDMAN, G. et al. Synergism in cellulose hydrolysis by Endoglucanases and Exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnology Bioenergy**. v. 13, p. 173-178, 1988.

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

BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado.** 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E.P.S. et al.(eds). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. 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.

BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIIKARI, L.. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Harman GE, Kubicek CP. (Eds). London & Bristol, PA: Taylor & Francis Ltd. Vol. 2, 343-363, 1998.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research.** v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology.** v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARLE-URIESTE, J.C.; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; TORIGOI, E.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; EL-DORRY, H: Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **J Biol Chem.** v. 272, p.10169-10174, 1997.

CASTRO, A.M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*).** 2006. 212f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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

CEN P.; XIA L. **Production of cellulase in solid state fermentation.** In: Scheper T, editor. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics Advances in biochemical engineering /biotechnology. Berlin: Springer. v. 65, p. 69, 1999.

CHAHAL, D.S. Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production, **Applied Environ Microbiol.** v. 49, p. 205–210, 1985.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S. Cellulase production by six *Trichoderma spp* fermented on medicinal plant process. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.36, p. 605-609, 2009.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S.. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy.** v.34, n.5, p.805-811, 2010.

CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** Clifton, v.84, p.5–37, 2000.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L.. Directed Evolution of Industrial Enzymes: an Update. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

COCHET, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. **Enzyme and Microbial Technology.** v.13, p. 104-109, 1991.

COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; LIMA, M. de; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia.** [online], v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO AVALIAÇÃO DA SAFRA AGRÍCOLA DE CANA-DE-AÇÚCAR - CONAB 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso: out/2010.

CONESA, A.; PUNT, P.J.; LUIJK, N.V.; HONDEL, C.A.M.J.J.V.D. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology**. v. 33, p. 155–171, 2001.

CORREIA, R.T.P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. 2004. 118f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

COUGHLAN, M. P. AND HAZLEWOOD G. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology Applied Biochemical**. v.17, p.259-289, 1993.

DASHTBAN M.; SCHRAFT H.; QIN W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 578–595, 2009.

DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher. v. 2, 2001.

DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABART, T.; SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**. v. 15, p. 449-456, 2008.

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

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**. v. 20, p. 11-21, 2004.

DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. Solid substrate cultivation. **Elsevier Science Publishers LTD**. 1992.

EL-GOGARY, S.; LEITE, A.; CRIVELLARO, O.; EVELEIGH, DE; EL-DORRY, H: Mechanism by which cellulose triggers Cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 86, p. 6138-6141, 1989.

ELLAIAH, P.; PREMKUMAR, J.; KANTHACHARI, P.V. and ADINARAYANA, K. Production and optimization studies of cephalosporin C by solid state fermentation. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 44, n. 1-4, p. 1-7, February-November 2002.

ENARI, T.M.; NIKU-PAAVOLA, M.L. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Is the current theory of the mechanism of hydrolysis valid? **Critical Reviews in Biotechnology**. v.5, p.67-87, 1987.

FANG, H., ZHAO, C., SONG, X-Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**. v.101, p.4111-4119, 2010.

FAOSTAT. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: Novembro 2010.

FARINAS, C.S.; MARTIN-NETO, L.; GIORDANO, R.C. **Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol**. In: Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. Editora Blucher, São Paulo, 2010.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions**, Walter de Gruyter, Berlin.1989.
- GALANTE, Y.M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. **Application of Trichoderma enzymes in the textile industry**. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, pp 311–326, 1998.
- GAMS, W.; BISSETT, J. **Morphology and identification of Trichoderma**. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London. p. 3–34, 1998.
- GASHE, B.A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. **Journal of Applied Bacteriology**. 73:79-82, 1992.
- GERBER, P.J.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. **Bioresource Technology**. v. 61, p. 127–140, 1997.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid.state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, p. 85-101, 2003.
- GANDHI, J. P.; KOTESWARA, R. K. AND DAVE, P. J, Characterization of extracellular thermostable xylanase from *Chaetomium globosum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, **60**, 55-60, 1994.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem**. v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BOM, E.P.S. Cellulases, xylanases,-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemistry Engineering Journal**, 2010, doi:10.1016/j.bej.2010.05.003.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENDERDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation on *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 68, p. 173-178, 1999.
- 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.
- GUTIERREZ-CORREA, M., TENDERDY, R.P.. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology Letters**. v. 20, p. 45-47, 1998.
- HALTRICH, D. STEINER, W.. Induction of Xylanase and Cellulase in *Schizophyllum commune* **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 229–235, 1994.
- HECK, J.X.; FLORES, S.H.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z.. Optimization of cellulase–free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid–state cultivation. **Process Biochemistry**, 40, 107–112, 2005.
- HERPOEL-GIMBERT, I.; MARGEOT, A.; DOLLA, A.; JAN, G.; MOLLÉ, D.; LIGNON, S.; MATHIS, H.; SIGOILLOT, J.C.; MONOT, F.; ASTHER, M. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.18, 2008.
- HERRERA, J.A.H.; PÉREZ-AVALOS, O.; SALGADO, L.M.; PONCE-NOYOLA, T. Cyclic AMP regulates the biosynthesis of cellobiohydrolase in *Cellulomonas flavigena* growing in sugar cane bagasse. **Archives of Microbiology**. v. 191, n. 10, p. 745-750, 2007.
- HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, p. 358-364, 1999.

HOLKER U, HOFER M, LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 64, p. 175–186, 2004.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology.** v. 8, p. 301-306, 2005.

HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, [S. l.], v.10, n.5, p.315–319, 1980.

HSU, T.A. Pretreatment of biomass. In: WYMAN, C.E. (Ed.). **Handbook on bioethanol, production and utilization.** Washington: Taylor & Francis, 1996.

JAKLITSCH, W.M. European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. **Stud Mycol.** v. 63, p.1–91, 2009.

KASANA, R.C. SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A Rapid and Easy Method for Detection of Microbial Cellulases on Agar plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology.** v. 57, p. 503–507, 2008.

KEKOS, D.; DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products.** v.29, p.404–411, 2009.

KING, B.C.; DONNELLY, M.K.; BERGSTROM, G.C.; WALKER, L.P.; GIBSON, D.M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering.** v.102, p.1033–1044, 2009.

KRUSZEWSKA, J.S.; PERLINSKA-LENART, U.; GÓRKA-NIEC, W.; ORLOWSKI, J.; PALAMARCZYK, G. Alterations in protein secretion caused by metabolic engineering of glycosylation pathways in fungi. **Acta Biochimica Polonica.** v.55, p. 447–456, 2008.

KUBICEK, C.P.; BÖLZLBAUER, U.M.; KOVACS, W.; MACH, R.L.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E.; BÖRNER, T.; SAMUELS, G.J. Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. Longibrachiatum and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. **Fungal Genetics and Biology.** v. 20, p.105–114, 1996.

KUBICEK, C.P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I.S. Fungal genus *Hypocrea* /*Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal Zhejiang University Science B.** v. 9, p. 753–763, 2008.

KUBICEK, C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnol. Biofuels**, 2: 19, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** v, 35, p. 377–391, 2008.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v.98, p.3634–3637, 2007.

LE CROM, S. et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academic of Sciences U S A.** v. 106, p.16151–16156, 2009.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v.7, n.6, p.258-265, 1985.

LOPES, V.R.; JUNIOR, G.F.; BRAGA, R.; JESUS, M.A. de; MARTINS, C.; PINTO, G. **Atividade da Xilanase em Cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma***. SINAFERM, Natal, RN, 2009.

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

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Xilanases por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Bagaço de Cana de Açúcar e Farelo De Soja**. 2006. 133f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MANDELS, M., ANDEROTTI, R., ROCHE, C. Measurements of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioengng. Symp**. v.6, p.21–23, 1976.

MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MARGEOT A, HAHN-HAGERDAL B, EDLUND M, SLADE R AND MONOT F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion Biotechnology**. v.30, p.372-380, 2009.

MENEZES, G.D.G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. 2006. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências em Engenharia Química – Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

MEKALA, N.K.; SINGHANIA R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY. A. Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.151, p.122-131., 2008

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOISER, N.S. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v.96, n.2005, p.673-686, 2004.

MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. **Advances in Chemistry Series**. v. 181, p. 289-301. 1979.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative Production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.

NAKAZAWA, H.; OKADA, K.; ONODERA, T.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 83, p. 649–657, 2009.

NARAHARA, H. KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANIGKURA, SUMALEE.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**. v. 6, n. 4, p. 311-319, 1982.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiol.** v.34, p. 405-414, 1994.

NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

OBEROI, H.S.; BANSAL, S.; DHILLON, G.S. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1499-1504, 2008.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 1-9. 2002.

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

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PALOMER, X.; DOMÍNGUEZ, E.P.; VENDRELL, M.; LLOPI.T.. Study of the strawberry Cel1 endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science**. v. 167, p. 509-518. 2004.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v.35, p.1153-1169, 2000b.

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

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.58, n.6, p.761-766, 2002.

PAVARINA, E.C. **Estudo dos sistemas celulolítico e fermentativos de fungos microaeróbios facultativos**. 1997. 82f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia – Volume 1**. Rio de Janeiro: MAKRON Books, 1980.

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G.; KOLEV, D.N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**. v, 24, p. 2104-2111, 2002.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S. de; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Comunicado Técnico on line Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

POLIZELI, M. L. T.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, H. F.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 67, p. 577-591, 2005.

PURKARTHOFFER, H.; SINNER, M.; STEINER, W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. **Enzyme Microb. Technol.**, 15: 677-682, 1993.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology** [online], 1(3). Retrieved August 28, 2001 from <http://www.ejbiotechnologyinfo/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF>. ISSN 0717-3458.1998.

RAJOKA, M.I.; BASHIR, A.; MALIK, K.A. Mutagenesis of *Cellulomonas biazotea* for enhanced production of xylanases. **Bioresource Technology**. v. 62, n. 3, p. 99-108, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut oil cake - a potential raw material for the production of amylase. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 169-174, 2004.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1749-1754, 2005.

RAMOS, L.P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

REZENDE, M.I.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; ENDO, A.S. Xylanase Production by *Trichoderma harzianum* Rifai by Solid State Fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 67-72, 2002.

ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 622-644, 1989.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora. Campinas - SP, 2005.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; ROSALES, E.; GUNDÍN, M.; SANROMÁN, M.A. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* sp. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 423-428, 2004.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA U.F. **Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção de Celulases Específicas na Cadeia Produtiva do Etanol de Segunda Geração**. 2010. 197f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841-845, 2008.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORSINIELO, 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, abr-jun. 2004.

RYDHOLM, S.A. **Pulping processes**. New York: Interscience; John Wiley, 1965. p.3-90. & Sons, New York, p. 3-90, 1965.

SALLENAVE, C.; POUCHUS, Y.F.; BARDOUIL, M.; LASSUS, P.; ROQUEBERT, M.F.; VERBIST, J.F.. Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment. **Toxicon**. v. 37, p. 77–83, 1999.

SALLENAVE-NAMONT, C.; POUCHUS, Y.F.; ROBIOU du PONT, T. ; LASSUS, P.; VERBIST, J.F.. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. **Mycopathologia**. v. 149, p. 21–25, 2000.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SAZCI, A.; RADFORD, A.; ERENLER, K. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. **Journal Applied Bacteriol.** v. 61, p. 559–562, 1986.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v, 87, p. 787-799, 2010.

SEIDL V. et al. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. **BMC Genomics**. v. 9, p. 327, 2008.

SHIMIZU, S.; OGAWA, J.; KATAOKA, M.; KOBAYASHI, M. Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 58, p. 45-87. 1997.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova** [online], v.32, n.3, p.661-671, 2009.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5a. Edição. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda,1995.

SIMÕES, M.L.G.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; TAPIA, D.M.T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 22, p. 6317-6326, 2009.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**. n.100, p.6679–6681, 2009.

SINGHANIA R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.010. 2010.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.142, p. 60-70, 2007.

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

SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Optimization of inulinase production by *Aspergillus niger*. **Food Technology Biotechnology**, Lublin, v.42, n.3, p.141-146, 2004.

SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J-M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.41, p.330-336, 1994.

- SOUZA, M.C.O., ROBERTO, I.C., MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.52, p.768-772, 1999.
- SUBRAMANIYAN, S. and PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. 183, 1-20, 2000.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renew. Energy**. v. 34, p. 421-424, 2009.
- SUN, H.; GE, X.; HAO, Z.; PENG, M. Cellulase production by *Trichoderma* sp. On apple pomace under solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 2, p. 163-166, 2010.
- SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood**: Cellulase enzyme production. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.
- TAO, Y.M.; ZHU, X.Z.; HUANG, J.Z.; MA, S.J.; WU, X.B.; LONG, M.N.; CHEN, Q.X. Purification and Properties of Endoglucanase from a SugarCane Bagasse Hydrolyzing Strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 6126-6130, 2010.
- TAYLOR, S.V.; KAST, P.; HILVERT, D. Investigating and engineering enzymes by genetic selection. **Angew /chen Int Ed Engl**, v. 40, p. 3310-35, 2001.
- TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 777-789, 1982.
- TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**. v.56, p.375-382, 2004.
- VAN BEILEN, J.; LI, Z. Enzyme Technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.
- WENZEL, H.F. **The Chemical technology of wood**. New York: Academic Press. p.32-245, 1970.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. **Lignin biosynthesis**. **The Plant Cell**, v. 7, p.1001-1013, 1995.
- WILSON, D.B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.
- YODER, J.A.; GLENN, B.D.; BENOIT, J.B.; ZETTLERL.W.. The giant Madagascar hissing-cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) as a source of antagonistic moulds: concerns arising from its use in a public setting. **Mycoses**. v. 51, n. 2, p. 95-98, 2008.
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.
- ZHANG Y-H.P; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p. 797-824, 2004.
- ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G. Microwave pretreatment of substrates for cellulase production by solid-state fermentation. **Applied Biochem. Biotechnol.** v. 160, p. 1557-1571, 2010.