

MARIA ISABEL CRISTINA BATISTA MAYRINK

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS
CELULASES NA SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do programa de
pós-graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

MARIA ISABEL CRISTINA BATISTA MAYRINK

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DAS
CELULASES NA SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2010.

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães
(Coorientadora)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof^a. Marli Lourdes de Oliveira

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

A DEUS, sempre presente.

Aos meus queridos filhos Camille e Lucca.

Ao meu marido Rogério.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e Nossa Senhora, pela constante presença em minha vida.

À minha Família, em especial meu Marido Rogério e filhos Camille e Lucca pelo amor, atenção e paciência em todos os momentos.

Aos meus pais, José Batista e Maria José, que sempre acreditaram na minha capacidade.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende, pela orientação, pela oportunidade, pela paciência, pela confiança e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade concedida para a execução deste estudo.

À Professora Valéria Monteze Guimarães pela coorientação, pelo apoio, pelas correções e sugestões.

Ao Professor Olinto Liparini Pereira, pela coorientação e pela

imprescindível contribuição e principalmente pelo trabalho sério e pelas sugestões que certamente contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores Luciano Gomes Fietto e Marli Lourdes de Oliveira, pela participação na banca e pelas correções e sugestões que contribuíram muito para finalização deste trabalho.

À amiga e Professora Marisa Nogueira, pelo apoio, pelos conselhos e pela amizade.

A professora Andréa Ribon, por ter dado todo apoio necessário no início desse trabalho.

Ao estagiário Marcílio, não só por ter sido um dedicado e competente estagiário, mas também pela amizade.

Ao Daniel pela amizade, descontração, pela presença constante e ajuda necessária para superar momentos difíceis e principalmente pelas contribuições indispensáveis durante a realização desse trabalho.

Aos estagiários, Viviane, Samara e Rafael pela ajuda e contribuição no início desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica e do Laboratório de Análises Bioquímicas: Rosilene, Maíra, Sérgio, Dayelle, Camila, Ricardo, Germano, Angêlica, Gabriela e a todos os demais amigos dos Laboratórios, pela disposição em ajudar, e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular em especial ao secretário da pós-graduação, Eduardo Monteiro, pela amizade pela atenção e competência para resolver situações ligadas a minha vida acadêmica.

Aos funcionários Gláucia, Marlene e Cássio do BIOAGRO, Onezina do DEQ, e minha ajudante Lúcia pela atenção e presteza.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução desse trabalho.

BIOGRAFIA

Maria Isabel Cristina Batista Mayrink, filha de José Batista Ferreira e Maria José Batista, nasceu em Ponte Nova-MG, no dia 10 de julho de 1966.

Em 1994, concluiu o curso de Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em 1995, aperfeiçoou-se em Química Ambiental pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 1996, ingressou no curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em junho de 1998.

Iniciou o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em Maio de 2006, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Doctor Scientiae. Submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biomassa lignocelulósica	3
2.2. Organização estrutural de materiais lignocelulósicos.....	6
2.2.1 Celulose.....	6
2.2.2. Hemicelulose	7
2.2.3 Lignina	8
2.3 Hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose	8
2.3.1 Celulases	8
2.3.2 Hemicelulases	10
2.4. Aplicações biotecnológicas das enzimas celulasas e hemicelulasas.....	11
2.5 Sacarificação da biomassa.....	12
2.6 Fungos produtores de celulasas e hemicelulasas	15

2.7 Objetivo geral	17
CAPÍTULO 1.....	18
ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES	18
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1 Reagentes	21
2.2 Coleta das amostras e isolamento dos fungos.....	22
2.3 Cultivo e obtenção de extrato.....	22
2.4. Determinação das atividades	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
3.1 Seleção, cultivo e identificação dos fungos.....	26
3.2 Atividades das enzimas celulases e hemicelulases em cultivo em meio sólido	28
3.2.1 Unidade de papel de filtro - FPase	29
3.2.2 Endoglicanase	30
3.2.3 β -glicosidase e celobiase.....	31
3.2.4 α -galactosidase.....	32
3.2.5 β -xilosidase	32
3.2.6 β -mananase	33
3.2.7 Xilanase.....	33
3.3 Atividades de celulases e hemicelulases em cultivo submerso.....	34
3.3.1 Atividade papel de filtro - FPase	36
3.3.2 Endoglicanase	38
3.3.3 β -glicosidase.....	39
3.3.4 Celobiase.....	40
3.3.5 Xilanase	42
3.3.6 β -xilosidase.....	44
3.3.7 β - mananase.....	45
3.3.8 α -galactosidase.....	46

4 CONCLUSÕES.....	47
CAPÍTULO 2	
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE UTILIZANDO EXTRATOS SIMPLES E MISTURAS	49
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Reagentes.....	51
2.2 Microrganismo.....	52
2.3 Cultivo e obtenção de extrato.....	52
2.4. Determinação das atividades	52
2.5 Caracterização enzimática	54
2.5.1 Efeito do pH.....	54
2.5.2 Efeito da temperatura	54
2.5.3 Análise de termoestabilidade.....	54
2.6 Sacarificação da celulose avicel.....	55
2.7 Determinação de açúcar redutor e glicose.....	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 Produção de enzimas.....	57
3.2 Caracterização enzimática	58
3.2.1 Efeito do pH sobre as atividades das enzimas celulasas	58
3.2.2 Efeito da temperatura sobre as atividades das enzimas celulasas...	60
3.2.3 Estabilidade térmica de endoglicanase.....	62
3.2.4 Estabilidade térmica sobre atividade de papel de filtro - FPase	63
3.2.5 Estabilidade térmica de celobiase	66
3.3. Sacarificação da celulose avicel.....	67
3.3.1 Produção açúcar redutor por tempo de sacarificação	68
3.3.2 Produção de glicose por tempo de sacarificação	69
3.5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

MAYRINK, Maria Isabel Cristina Batista, D Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulasas na sacarificação da celulose.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Olinto Liparini Pereira.

Diferentes isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos, *Aspergillus* e *Penicillium* foram estudados quanto ao potencial de produção de celulasas e hemicelulasas. Os fungos foram cultivados em meio líquido contendo bagaço de cana e farelo de trigo como fonte de carbono, e alíquotas diárias foram analisadas, em relação à produção de enzimas, durante 13 dias. Também foi verificada as atividades de enzimas produzidas por esses fungos em cultivo em meio sólido. Foi utilizado bagaço de cana como fonte de carbono e suporte, sendo as análises realizadas em intervalos de 3 dias, durante 37 dias. As maiores atividades de celulasas foram obtidas em meio líquido, contendo bagaço de cana como fonte de carbono. As maiores atividades de hemicelulasas foram obtidas, em meio líquido, contendo farelo de trigo como fonte de carbono. O isolado T08 (*Trichoderma* sp. endofítico) produziu enzimas

com maiores atividades endoglicanase e FPase, e o isolado TH (*Trichoderma harzianum*) enzimas com maiores atividades de celobiase e β -glicosidase em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. As maiores atividades das hemicelulases como xilanase e mananase foram produzidas pelo isolado T03 e T02 (*Trichoderma* sp. endofítico) respectivamente, e as xilosidase e α -galactosidase pelo TV (*Trichoderma viride*) em meio contendo farelo de trigo. Foram selecionados três extratos enzimáticos C011 (*Trichoderma* sp. T02, cultivado em bagaço), C012 (*Trichoderma* sp. T02, cultivado em farelo de trigo) e C013 (*Trichoderma* sp. T08, cultivado em bagaço). As máximas atividades de endoglicanase e FPase, para todos os extratos, foram observadas a 55°C e 40°C, respectivamente, ao passo que a temperatura ótima para a atividade celobiásica variou entre 50°C e 65°C, nos diferentes extratos. As atividades celulolíticas dos extratos selecionados foram caracterizadas e apresentaram máxima atividade, quando incubadas em pH 4,5 a 5,5. O potencial de sacarificação dos extratos C011, C012 e C013 foi avaliado, utilizando-se celulose Avicel como substrato. Os extratos foram aplicados de forma simples ou combinados, sendo as eficiências de sacarificação avaliadas pela mensuração das velocidades de formação de açúcares redutores e glicose. As taxas de sacarificação para os extratos C011 e C013 foram cerca de três vezes maiores, comparadas às do extrato C012. Não se observou diferença significativa na taxa de sacarificação, quando os extratos foram utilizados na forma combinada.

ABSTRACT

MAYRINK, Maria Isabel Cristina Batista, D Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2010. **Fungal enzyme production and evaluation of cellulases potential in saccharification of cellulose**. Advisor: Sebastião Tavares de Rezende. Co-advisors: Valéria Guimarães Monteze and Olinto Liparini Pereira.

Different strains of the *Trichoderma* spp. Endophytic fungi, *Aspergillus* and *Penicillium* were studied for potential production of cellulases and hemicellulases. The fungi were cultured in liquid medium containing sugarcane bagasse and wheat straw as carbon source, and daily aliquots were analyzed in relation to the activities of the production of enzymes, for 13 days. It was also verified the production of enzymes by these fungi in solid state cultivation. Sugarcane bagasse was used as carbon source and support, and the analysis were done every three days for 37 days. The highest activities of cellulase were obtained in liquid medium containing bagasse as carbon source. The highest activities of hemicellulases were in liquid medium with wheat straw as carbon source. The strain T08 (*Trichoderma* sp. endophytic) highlighted in the production of FPase and endoglycanase and strain TH

(*Trichoderma harzianum*) enzyme with the highest activities of cellobiase and β -glucosidase in a medium sugar cane bagasse as carbon source. The highest activities of hemicellulases such as xylanase and mannanase were produced by strain T03 and T02 (*Trichoderma* sp. endophytic) respectively, and xylosidase and α -galactosidase by TV (*Trichoderma viride*) in medium of a wheat straw. It was selected three enzyme extract C011 (*Trichoderma* sp. T02, cultivated in sugarcane bagasse), C012 (*Trichoderma* sp. T02, cultivated in wheat straw) and C013 (*Trichoderma* sp. T08, cultivated in sugarcane bagasse). The activities of maximum endoglycanase and FPase, for all the extracts, were observed at 50 ° C and 40 ° C, respectively, while the optimum temperature for the cellobiase activity ranged between 50 ° C and 65 ° C in different extracts. The cellulolytic activities of selected extracts were characterized and showed maximum activity when incubated at pH 4.5 to 5.5. The saccharification potential of extracts C011, C012 and C013 was evaluated, using Avicel cellulose as substrate. The extracts were applied singly or in combination, and the efficiency of saccharification was evaluated by measuring rates of formation of reducing sugars and glucose formation. The saccharification rates for the extracts for the extracts C011 and C013 were about three times higher, compared to extract C012. There was no significant difference in the rate of saccharification, when the extracts were used in combination.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação mundial com o aumento nos níveis de emissão de poluentes, ocasionados por um crescente consumo de combustíveis fósseis, evidenciou a importância das fontes de energia renovável para a construção de um futuro energético mais sustentável.

A necessidade de reduzir a emissão de gases poluentes, aliada à diminuição significativa das fontes de energia não renováveis, tem despertado o interesse pela utilização de recursos da biomassa vegetal. Nesse cenário, o uso do chamado etanol de segunda geração, produzido por fermentação dessa biomassa, aparece como atraente fonte substitutiva dos combustíveis fósseis.

Na busca pela produção desse etanol de segunda geração, como fonte alternativa, o Brasil apresenta diferencial em relação a outros países, em virtude da grande disponibilidade de terra adequada para a agricultura e da disponibilidade de biomassa vegetal na forma de resíduos agroindustriais, como bagaço de cana, palha de milho, cascas de laranja, arroz ou café, entre outros. Acresce-se que a produção de etanol, a partir desses resíduos, não implica aumento de área plantada.

Essa biomassa é composta principalmente pelo complexo lignocelulósico, o qual se refere à parte vegetal, que forma a parede celular das plantas, constituída principalmente de polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose e pectina que, em conjunto com proteínas e ligninas, formam uma estrutura rígida e complexa.

Atualmente, a maior parte do etanol é produzida a partir do caldo da cana e do amido, enquanto a nova tecnologia utiliza o processo de sacarificação da biomassa, como o bagaço da cana, para disponibilizar açúcares que possam ser fermentados por microrganismos.

Independente de qual microrganismo é utilizado para a fermentação, haverá sempre grande demanda de enzimas para promover a sacarificação. Muitos microrganismos presentes na natureza, como os fungos e as bactérias, são capazes de fazer a bioconversão dos substratos lignocelulósicos em unidades de fácil assimilação para o seu metabolismo.

As enzimas hidrolíticas têm papel fundamental nessa bioconversão, destacando-se celulasas e hemicelulasas, respectivamente. São também utilizadas em vários setores industriais, como indústria de papel e celulose, alimentos, têxtil e outras. No entanto, uma das maiores dificuldades na implantação de um processo de bioconversão da biomassa consiste no alto custo e na baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose.

O processo de sacarificação é um processo essencial, que antecede a fermentação e disponibiliza os açúcares para a fermentação. Portanto, a redução de custos do processo de sacarificação pode ser feita por meio da prospecção de enzimas celulolíticas, com maior poder de catálise, permitindo a utilização de menor carga de enzimas durante a sacarificação. Ressalta-se, ainda, que o uso de resíduos agroindustriais como substrato para cultivo dos microrganismos também diminui os custos e pode viabilizar o processo de produção de etanol de segunda geração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, constituindo o recurso mais abundante e renovável disponível em nosso planeta, também considerado maior fonte de compostos orgânicos da biosfera (ZHANG e LYND, 2004).

É constituída por três frações principais, sendo a fração mais abundante a celulose, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose. Uma segunda fração, denominada hemicelulose, apresenta composição hetropolissacarídica, cujas proporções dependem da origem do material. Por último, encontram-se os álcoois aromáticos polimerizados, constituindo a fração denominada de lignina (Figura 1) que, unida à hemicelulose, envolve a matriz celulósica (SUN e CHEN, 2002).

Grande parte da biomassa vegetal está disponível como resíduo agroindustrial, como polpa de madeira, resíduo de papel, bagaço de cana-de-

açúcar, bagaço de laranja e palha de cereais etc., o qual contém material lignocelulósico disponível para a exploração como fontes de matérias-primas. No entanto, somente uma pequena fração dessa biomassa é utilizada, na produção de vários produtos químicos para indústrias (têxtil, farmacêuticas, plásticos, papel etc.), além de ser um material versátil como fonte de energia e e combustível na forma de etanol. (IMAI et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2010).

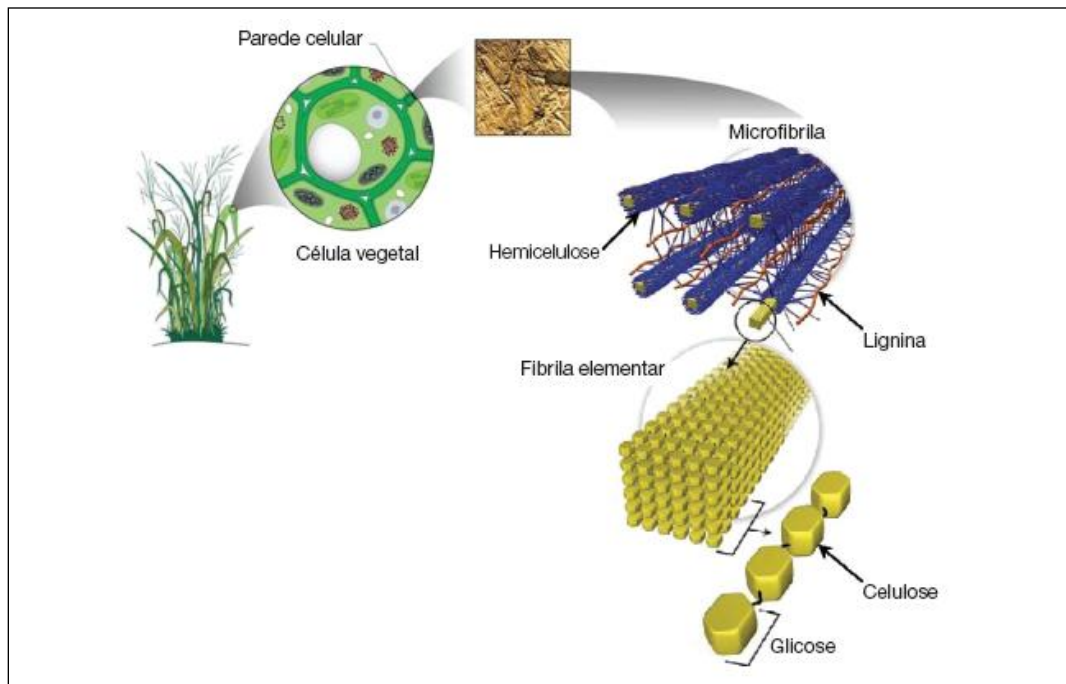
A maior parte dos países tem-se empenhado em buscar fontes alternativas de energia, que permitam minimizar problemas de ordem econômica, dados os preços crescentes dos combustíveis, em razão do esgotamento das reservas de petróleo. Em consequência, agravam-se as questões sociais como demanda por emprego, baixa renda e fluxos migratórios. Evidencia-se, dessa forma, a problemática ambiental proveniente das mudanças climáticas e da poluição, uma vez que a concentração de CO₂ atmosférico teve um aumento de 31% nos últimos anos, reforçando a necessidade do uso de combustíveis produzidos a partir de fontes não fósseis (TAYLOR et al., 2006).

Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, uma vez que o CO₂ produzido durante o uso da biomassa é absorvido novamente no processo de fotossíntese para a sua formação. Nessa perspectiva, foi elaborado um tratado para a diminuição dos gases poluentes no mundo. Trata-se do Protocolo de Quioto, o qual determina que os países industrializados devam reduzir suas emissões totais de gases de efeito estufa em pelo menos 5,2% abaixo dos níveis de 1990, no período de compromisso firmado compreendido entre 2008 e 2012 (UNITED NATIONS, 1998).

Atualmente, o álcool é produzido a partir do caldo da cana e amido, enquanto a nova tecnologia utilizará o processo de hidrólise, transformando o bagaço da cana e outros resíduos agroindustriais em açúcares que, fermentados e destilados, resultarão em álcool. Com o desenvolvimento dessa tecnologia, todo o bagaço de cana-de-açúcar, atualmente utilizado na geração

de energia elétrica, poderá ser também destinado à produção de álcool (LEE, 1997).

Nesse contexto, o Brasil é um dos países que mais produz biomassa, sendo o bagaço da cana-de-açúcar considerado o maior dejetivo da agroindústria nacional, disponível para alto aproveitamento industrial e para contribuir com essa tecnologia, com baixo custo dessa matéria-prima (BON et al., 2008).



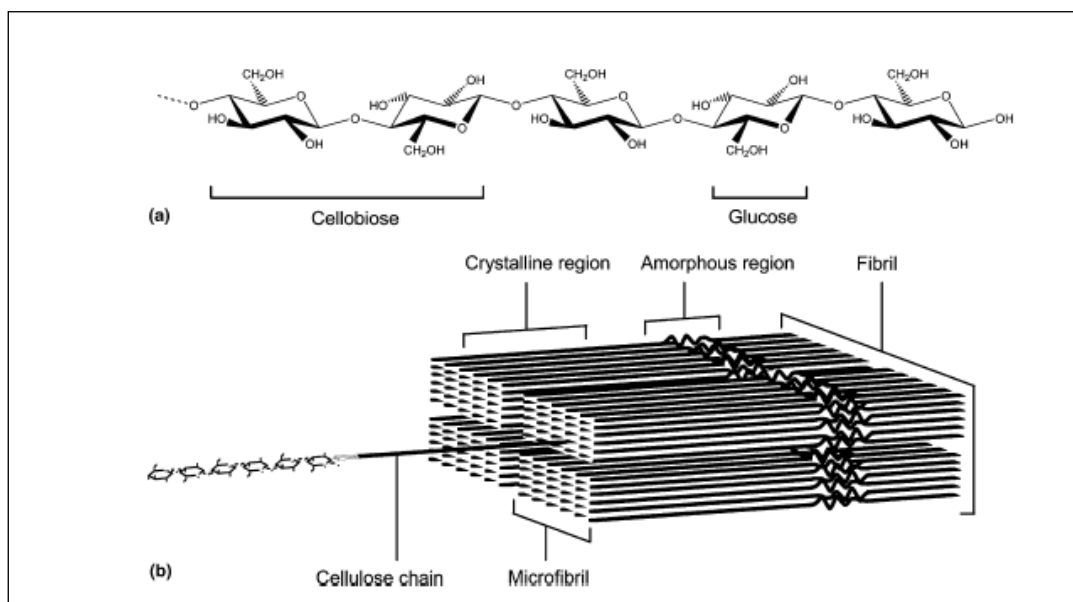
Fonte: Canilha, et al (2010)

Figura 1 - Arquitetura da parede celular vegetal contendo as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina).

2.2. Organização estrutural de materiais lignocelulósicos

2.2.1 Celulose

A celulose é um homopolímero linear composto por moléculas D-glicopiranosose, unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Estudos indicam que a celulose possui um grau de polimerização médio de 9000-10000 podendo em alguns casos atingir números muito maiores do que este. A cadeia de celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lignina, não sendo um substrato facilmente acessível. É formada por microfibrilas que possuem regiões ordenadas (cristalinas), alternadas com regiões menos ordenadas (amorfas), as quais formam as fibrilas (Figura 2) que, por sua vez, ordenam-se para formar as sucessivas paredes celulares (RAMOS, 2003).



Fonte Desvaux (2005).

Figura 2 - Esquema da estrutura primária da celulose (a). Esquema da estrutura das fibras de celulose (b).

A forma cristalina apresenta maior número de ligações intra e intermoleculares como as ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila. Estas tornam a celulose insolúvel e resistente ao ataque químico e à degradação microbiana, enquanto a forma amorfa é mais facilmente hidrolisada, possui menos interação de hidrogênio sendo primeiramente atacada e degradada por ser mais acessível às enzimas (D'ALMEIDA, 1988; RAMOS, 2003; ZHANG et al., 2006).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que, ao contrário da celulose, podem ser formados por diversos açúcares (pentoses e hexoses), dando origem a cadeias moleculares mais curtas e com alto grau de substituição. Cada heteropolissacarídeo geralmente apresenta uma cadeia principal formada por uma única unidade, podendo apresentar diversas outras unidades como substituintes (D'ALMEIDA, 1988), tais como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros e por seus ácidos urônicos (HAN, 1978).

As hemiceluloses são normalmente classificadas de acordo com sua composição, por exemplo, galactoglicomanana (heteropolímero de galactose, glicose e manose) arabinoglicuronoxilana (polímero de xilose com ramificações de ácido D-glucurônico ou arabinose) e outros. As hemiceluloses também contêm como substituintes grupos acetil, ácido ferúlico e metil (JUHÁSZ et al, 2005; ROWEL, et al.,2005). No geral, a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses dependem do tipo de parede celular e do organismo analisado (ROWEL, et al., 2005).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão ligadas covalentemente à celulose e lignina. Por causa do baixo grau de polimerização e de sua natureza amorfa, as

hemiceluloses são degradadas mais facilmente que a celulose. Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para degradação, dada a sua estrutura variável e ramificada (SJÖSTRÖM, 1981)

2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, de elevado peso molecular, formada pela polimerização de unidades fenil-propano (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). É o polímero natural mais complexo em relação a sua estrutura e heterogeneidade (KUHAD et al., 1997).

Sua estrutura trabalha como material incrustante em torno das microfibrilas celulósicas, conferindo rigidez e proteção, atuando como agente de endurecimento e barreira à degradação enzimática ou química da parede celular, podendo formar ligações covalentes com a hemicelulose (FERRAZ, 2001).

2.3 Hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose

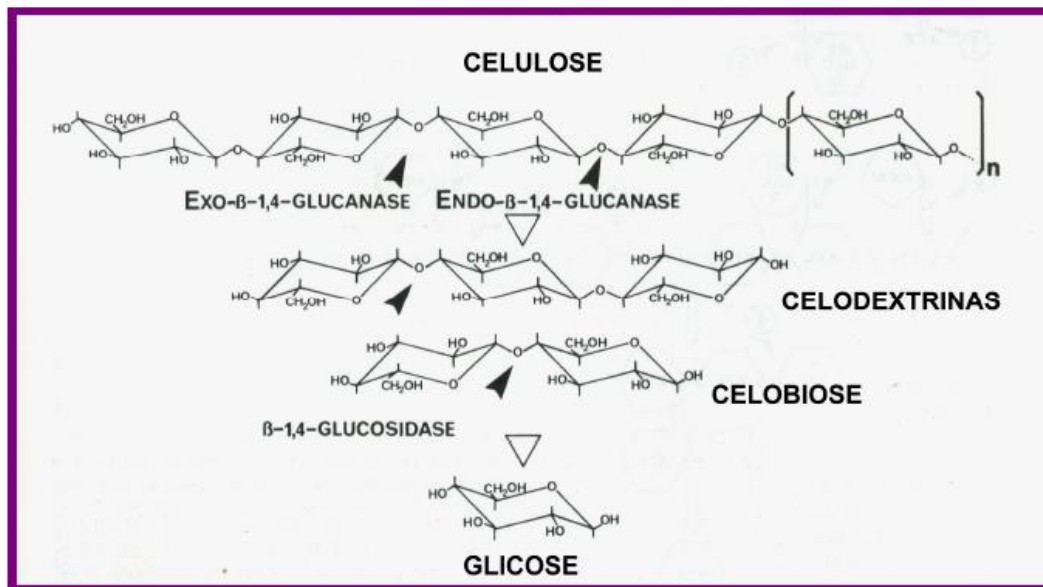
2.3.1 Celulases

Celulase refere-se a uma classe de enzimas catalisadoras da hidrólise da celulose em monômeros de glicose, produzidas por grande variedade de microrganismos, como bactérias e fungos (GUTIERREZ - CORREA et al., 1999; KUMAR et al., 2008). Essas enzimas apresentam diferentes especificidades para hidrolisar as ligações glicosídicas β -(1→4) na celulose, sendo, assim, divididas em três classes: endoglicanases, celobiohidrolases (exoglicanases) e β -glicosidases, formando um complexo enzimático com ação sinérgica para hidrolisar a celulose (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; HAN e CHEN, 2007).

A endoglicanase, ou endo- β -(1→4)-glicanase (EC 3.2.1.4), catalisa aleatoriamente a hidrólise das ligações nas regiões amorfas da celulose e

celulose modificada quimicamente, como a carboxmetilcelulose (CMC) e hidroxetilcelulose, por apresentarem maior presença de regiões amorfas. A celulose cristalina e o algodão, ambos os substratos naturais, com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados, por ser maior o grau de organização molecular. As $\text{exo-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-glicanase}$ (EC 3.2.1.91), atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (ZANDONÁ, 2001).

A celobiase, (EC 3.2.1.21) clivam celobiose em glicose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas (Figura 3). As $\beta\text{-glicosidase}$ têm um papel fundamental para a degradação de materiais lignocelulósicos. A celobiose, principal substrato para a $\beta\text{-glicosidase}$ é um potente inibidor de exocelulases, portanto a inibição dessa enzima diminui o potencial do processo de sacarificação de biomassas. Portanto, as $\beta\text{-glicosidase}$ não são apenas responsáveis pela produção de glicose a partir de celobiose, mas permitem também a ação eficiente da endoglicanase e exoglicanase (KAUR et al., 2007).



Fonte: Fengel e Wegener (1989).

Figura 3 - Ação do complexo celulase na hidrólise da celulose e compostos intermediários.

O efeito do complexo de enzima celulase é expresso pela ação sinérgica dessas três principais enzimas endoglicanases, as celobiohidrolases (exoglicanases) e β -glicosidases, e esse sistema precisa ser mantido estável com altas atividades celulolíticas para eficiência da hidrólise da celulose (LEE, 1997; LYND et al., 2002).

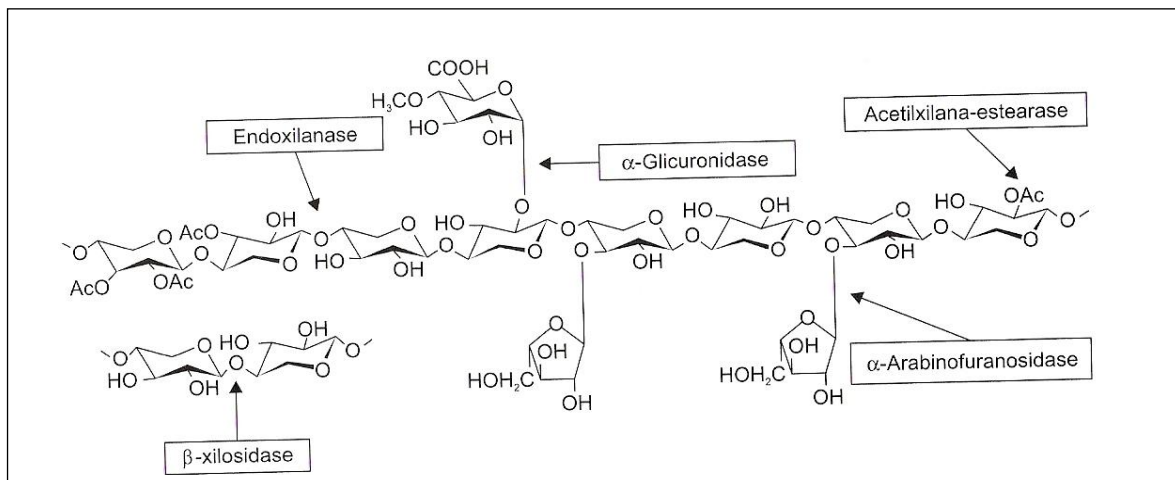
2.3.2 Hemicelulases

Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa também necessita de enzimas específicas.

Para hidrólise completa da xilana, a endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanaase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de hemicelulases envolvidas nesse processo de hidrólise. Esta hidrolisa, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (SHALLOM e SHOHAM, 2003). A xilosidase ou β -1,4-D-xilohidrolase (EC 3.2.1.37) são consideradas exo-enzimas ou exoglicosidase, pois hidrolisam xilobiose e outros pequenos xilo-oligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, resultantes da ação das endoxilanases, liberando xilose (BASARAN e OZCAN, 2007) (Figura 4). Ambas, portanto, têm capacidade de hidrolisar xilo-oligômeros a xilose, uma fonte primária de carbono que pode substituir a glicose como fonte de carbono e ser utilizada por microrganismos (FINELL et al., 2002).

De acordo com Biely (1985), para a hidrólise completa da xilana, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanaase e β -xilosidase), e enzimas que degradam as cadeias laterais (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase). As α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) catalisam a hidrólise de resíduos de α -L-arabinose, do terminal não redutor de cadeias de polissacarídeos como as arabinoxilanas, arabinanas e de outros polímeros contendo L-arabinose.

A hidrólise das galactomananas e outros polissacarídeos contendo D-galactose é feita pela α -galactosidase, ou α -D-galactosidase galactohidrolase (EC 3.2.1.22); e a mananase, também chamada de endo- β -(1 \rightarrow 4)-manosidase (EC 3.2.1.78), promove a remoção de D-manose, a partir do terminal não redutor das mananas e outros polissacarídeos com resíduos desse açúcar (DA SILVA et al., 1997).



Fonte: Sunna e Antranikian (1997).

Figura 4 - Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.

2.4. Aplicações biotecnológicas das enzimas celulases e hemicelulases

Há várias aplicações da celulase e hemicelulases em processos biotecnológicos em diversas indústrias como de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, etc. Para essas indústrias, a aplicação de tecnologia enzimática reduz custos operacionais, aumenta a qualidade do produto, utilizando processos limpos que contribuem para diminuir os impactos ambientais.

Na indústria têxtil, as celulases são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície. Também usadas no tratamento de jeans para retirar o excesso de corante, dão a aparência de

lavado, processo denominado bioestonagem (DIENES, 2003; LYND et al., 2002). Na indústria de papel e celulose, participam do refino da poupa, aumentando sua qualidade e modificam as propriedades das fibras, o que aumenta a velocidade de fabricação do papel e tem a função de colaborar no processo de despigmentação da matriz celulósica, favorecendo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para fabricação das folhas de papel reciclado (BHAT, 2000).

Na indústria de alimentos, as celulases participam na extração de compostos do chá-verde, proteína da soja, óleos essenciais, aromatizantes etc. Atuam também nos processos de produção de vinagre de laranja, inclusive, no processamento de sucos de frutas e vegetais, a ação combinada das hemicelulases e celulases apresenta um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (DA SILVA et al., 1997).

Quanto às hemicelulases, a xilanase é a enzima de maior aplicabilidade. Para Szendefy et al. (2006), essa enzima pode atuar no processo de branqueamento do papel auxiliando no desligamento de lignina da fibra. Isso faz com que o material fique mais suscetível ao tratamento químico, diminuindo, assim, a utilização do cloro durante o tratamento.

Nas últimas décadas, especial atenção tem sido dada aos processos de bioconversão da biomassa lignocelulósica, empregando processos enzimáticos microbianos, incluindo fungos, leveduras e bactérias, para despolimerização da celulose, conversão à glicose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis como etanol (LEE, 1997; HOWARD, 2003).

2.5 Sacarificação da biomassa

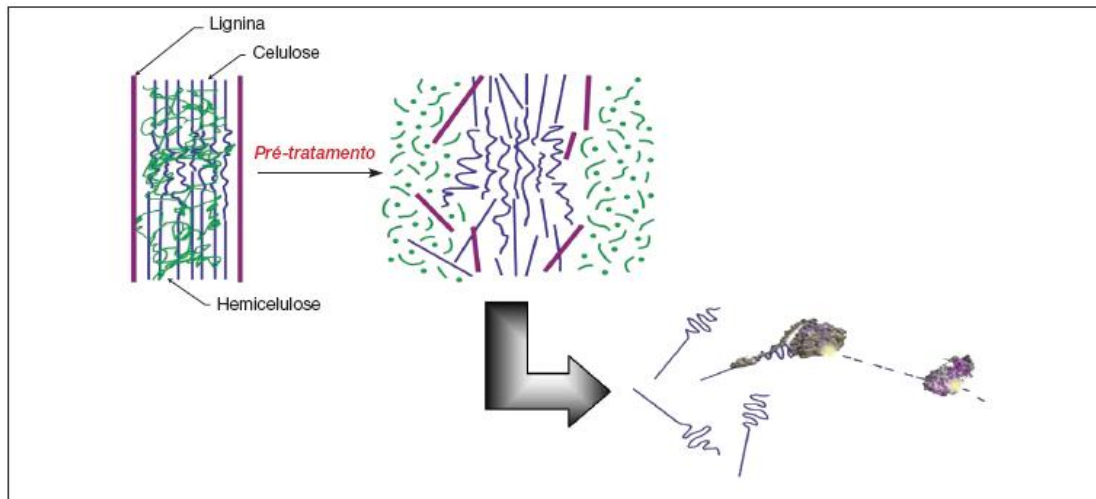
Importantes tecnologias têm sido estudadas mundialmente, com o objetivo de tornar a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol um processo eficiente e economicamente viável. A sacarificação e fermentação enzimática

da celulose tem sido proposta como uma via potencial de produção de glicose e álcool, a partir de rejeitos agroindustriais.

Segundo Lee (1997), o processo biológico para converter os materiais lignocelulósicos em etanol requer, em uma das suas etapas, a despolimerização da celulose para produzir açúcares livres. Para isso, enzimas celulases são produzidas por uma série de microrganismos, porém, o custo para obtenção dessas enzimas é elevado.

O complexo enzimático clássico é composto por endoglicanase, exoglucanase e β -glicosidase. O efeito desse complexo enzimático é expresso pela ação sinérgica dessas três diferentes enzimas (LEE, 1997). No entanto, essa hidrólise pode ser afetada pela porosidade da biomassa lignocelulósica, cristalinidade de fibras de celulose, lignina e hemicelulose. Um processo de pré-tratamento é, portanto, essencial para alterar ou remover a lignina e, ou hemicelulose (Figura 5), diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose e, assim, liberar uma celulose mais acessível à sacarificação (ZHANG e LYND, 2004).

Atualmente, os principais pré-tratamentos com potencial aplicação industrial são: Organosolv que emprega solventes orgânicos recuperáveis, capazes de remover a lignina. A explosão com vapor remove hemicelulose, e, em menor quantia, a lignina (DUFF e MURRAY, 1996). O pré-tratamento ácido diluído, chamado pré-hidrólise, consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, que é mais susceptível ao tratamento ácido, sendo que as frações de celulose e lignina permanecem inalteradas. A hidrólise alcalina provoca aumento na área da superfície interna, diminuição no grau de polimerização e da cristalinidade, separação da ligação estrutural entre lignina e carboidratos e um rompimento da estrutura da lignina (SUN e CHENG, 2002). Nesse contexto, após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática de resíduos agrícolas por celulases torna-se potencial instrumento para sacarificação industrial de biomassa (SINGH et al., 2009).



Fonte: Canilha, et al (2010)

Figura 5 - Alterações estruturais na microfibrila celulósica determinada pelo pré-tratamento com ácido diluído, seguidas pela hidrólise enzimática da celulose.

A sacarificação, realizada após o pré-tratamento, consiste na conversão enzimática dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis. A celulose é hidrolisada, inicialmente, pelas endoglicanases, que clivam aleatoriamente o polissacarídeo, criando terminais livres para a atuação das exocelulases. As celobiohidrolases ou exocelulases atuam sobre cadeias de celulose liberando glicoses e celobioses. A última enzima necessária é a β -glicosidase que cliva celobioses em duas moléculas de glicose. Essa enzima é essencial para a sacarificação, pois celobiose é um inibidor das exocelulases. Para aumentar o rendimento e evitar inibições por glicoses e celobioses, presentes no meio, tem sido utilizado o processo de sacarificação e fermentação simultâneas. Desse modo, os açúcares liberados pela sacarificação são prontamente fermentados por microrganismos, e, assim, não acumulam no meio, evitando a inibição das enzimas (BALAT et al., 2008; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

2.6 Fungos produtores de celulases e hemicelulases

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina sobremaneira a ocorrência e a distribuição desses organismos (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a diversos substratos, entre os quais efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais (TAVARES et al., 1998). Assim, são capazes de degradar a celulose e hemicelulose e utilizá-las como fonte de carbono e energia; inclusive os fungos filamentosos, considerados uma classe de microrganismos de grande significado comercial e amplamente distribuídos na natureza, encontrados em solos, em vegetais e animais, podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas (GRIMM et al., 2005). Também são capazes de viver como microrganismo endofítico, sistematicamente, no interior das plantas, sem causar danos.

As celulases fúngicas têm sido estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (NG, 2004). Entre os produtores de celulases estão os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002). Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados grandes secretores de celulases e hemicelulases, sendo geneticamente os mais estudados. Produz um grupo complexo de celulases capazes de clivar as ligações β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicas presentes na celulose e derivados de celulose (ORTEGA et al., 2001).

Segundo Lee et al. (1996), o complexo celulolítico de *T. reesei* possui no mínimo seis enzimas com atividades de endoglicanases (EGI e II, III, IV, V e VI) e pelo menos dois tipos de celobiohidrolase (CBH I e CBHII). Essas enzimas exoglicanases correspondem a 90% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, contra aproximadamente 1% de β -glicosidases (BGI e BGVII). Para Kanamasa et al. (2003), a celobiohidrolase é considerada a principal enzima do sistema de celulases e desempenha um papel central na degradação de

celulose cristalina. Assim como o *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. são fungos filamentosos com capacidade de produzir um sistema completo de enzimas celulasas e hemicelulasas (JØRGENSEN et al., 2003; WANG et al. 2005).

O gênero *Aspergillus* é caracterizado por apresentar uma reduzida necessidade nutricional, sendo disperso pelo ar em movimento, ou junto a insetos, com possibilidade de ser obtido isolado em ar, solo, material em decomposição e água (HEDAYATI et al., 2007). Durante seu ciclo de vida, várias espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir ampla gama de micotoxinas nocivas aos seres humanos e animais que o consomem (SCOTT, 2004). No entanto, são muito importantes na indústria de alimentos, remédios e agricultura, sendo qualificados como produtores de enzimas úteis (JAVED et al., 2009).

Os *Penicillium* são fungos filamentosos com capacidade de produzir um sistema completo de enzimas celulasas e hemicelulasas semelhante ao do *Trichoderma reesei*. Ambos possuem endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidase, embora difiram na proporção, na quantidade e na especificidade ao substrato de enzimas que apresentam a mesma função (endo-exo).

Bhat et al. (1989) encontraram oito endoglicanases em culturas de *Penicillium pinophytoma* e a maior parte da atividade endoglicanásica foi atribuída a cinco dessas enzimas, as quais foram isoladas e caracterizadas. Entretanto, Lee et al. (2010), estudando uma nova espécie, o *Penicillium purpurogenum*, encontraram somente uma endoglicanase. Jorgensen et al. (2003) encontraram três endoglicanases (EGa, EGb1 e EGb2) duas celobiohidrolases (CBHa e CBHb) e uma xilanase (XYL) em culturas do *P. brasilianum*.

2.7 Objetivo geral

Visando disponibilizar e avaliar novas ferramentas enzimáticas para o processo de produção de etanol de segunda geração, este estudo foi conduzido com dois objetivos:

- ✓ Produzir celulasas e hemicelulasas a partir de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* spp., isolados de diferentes origens utilizando fontes indutoras de baixo valor econômico, como bagaço de cana e farelo de trigo.

- ✓ Selecionar as melhores cepas produtoras de enzimas com alto poder hidrolítico, caracterizar bioquimicamente e avaliar o potencial de aplicação dessas enzimas para sacarificação de substrato celulósico.

Portanto, este trabalho está estruturado em dois capítulos.

Capítulo 1:

Isolamento de Fungos Filamentosos e Produção de Celulasas e Hemicelulasas

Capítulo 2:

Avaliação do Potencial de Sacarificação da Celulose Utilizando Extratos Simples e Misturas

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é o principal resíduo da atividade agroindustrial. Esses resíduos constituem uma fonte praticamente inesgotável e de baixo custo para processos de bioconversão, podendo, assim, serem convertidos numa variedade de produtos economicamente importantes para as indústrias químicas, têxtil, de alimentos, de papel; e para hidrólise enzimática da celulose, com objetivo de obter açúcares fermentáveis utilizados para produção de biocombustíveis (WONG et al., 1988; LYND et al., 2002).

Entretanto, a necessidade de se obter enzimas capazes de catalisar a bioconversão, de maneira economicamente viável, determina a busca de matérias-primas de baixo custo e renováveis para o processo de produção das mesmas. Somado a isso, os resíduos agroindustriais que possuem na sua

composição material lignocelulósico demonstram potencial como meio de cultura, para indução de enzimas produzidas por diferentes populações microbianas, entre elas os fungos filamentosos.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total. São elas: celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY et al., 2000). A celulose é um polímero linear de glicose que pode ser hidrolisado pela ação de endoglicanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e β -glicosidases (EC 3.2.1.21).

As hemiceluloses são heteropolímeros, ramificados e apresentam pentoses e hexoses em sua composição e sua degradação depende da composição da biomassa. A hidrólise enzimática completa da xilana requer a ação das enzimas endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), além de várias enzimas acessórias, como as α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glicuronidase (EC 3.2.1.139), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) e ácido ferrúlico esterase (EC 3.1.1.73), as quais são necessárias para hidrolisar os vários substituintes da xilana (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

Os fungos apresentam complexos enzimáticos capazes de degradar eficientemente materiais lignocelulósicos. Dentre esses, podem ser citados os fungos *Trichoderma reesei* (CASTELLANOS et al., 1995; PANDEY et al., 2000; JØRGENSEN et al., 2003; WEN et al., 2005; CHANDRA et al., 2009), cujo complexo celulolítico tem sido detalhadamente estudado, por sua grande capacidade de secretar altas quantidades dessas enzimas. Os fungos *Aspergillus* (WEN et al., 2005) e *Penicillium* spp. (JØRGENSEN et al., 2003; SINGH et al., 2009; NG et al., 2010) também são capazes de produzir um sistema completo de celulases e hemicelulases.

Tem havido grande interesse em se obter novas celulases e hemicelulases mais específicas e estáveis, utilizando-se fontes indutoras de baixo custo. Nesse contexto, o isolamento de novos microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas e estudos relacionados com sua produção é importante para obtenção de complexos enzimáticos mais eficientes

e economicamente acessíveis. Entre esses novos microrganismos, estão os endofíticos, que colonizam tecidos das plantas, produzem enzimas hidrolíticas extracelulares como mecanismos de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra invasão microbiana e, ou para obter nutrientes do solo (TAN e ZOU, 2001). Tais enzimas incluem pectinases, esterases, celulasas e lipases (PETRINI et al., 1992). Como forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos, faz-se necessário, entre outros fatores, a detecção e o estudo dessas enzimas (CARROLL e PETRINI, 1983).

O objetivo desta pesquisa foi isolar fungos de resíduos vegetais em decomposição, produzir enzimas celulasas e hemicelulasas com alto poder hidrolítico, provenientes principalmente de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* endofíticos, *Penicillium* e *Aspergillus*, sob diferentes condições de cultivo como fontes indutoras de baixo valor econômico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária/BIOAGRO e no Laboratório de Tecnologia Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas II da UFV.

2.1 Reagentes

Da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) foram obtidos os reagentes: para-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NPGal), para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPGlc), para-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPXil), xilana birchwood, celobiose foram comprados da Sigma Chemical Co. (Germany and USA, respectivamente)

Os demais reagentes utilizados para execução deste trabalho apresentavam grau de pureza analítico.

O bagaço de cana utilizado para isolamento de fungos foi fornecido pela Usina Açucareira da Jatiboca, localizada na cidade de Urucânia - MG. Para a

utilização como fonte de carbono, o bagaço de cana foi obtido em unidades experimentais da UFV. O farelo de trigo foi comprado no comércio local.

2.2 Coleta das amostras e isolamento dos fungos

As amostras de bagaço de cana foram coletadas no pátio da Usina, em frascos de polipropileno de 200mL, hermeticamente fechados e encaminhados ao laboratório. O bagaço foi colocado em Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de água destilada esterilizada. Após agitação por 10 min, a 200 rpm, uma alíquota foi adicionada em uma caixa tipo Gerbox de plástico, revestido com papel de filtro e colocado em estufa de incubação por 16 dias a 28 °C. Após o período de incubação, para a obtenção de culturas puras, colônias com morfologias diferentes foram transferidas do gerbox, separadamente, para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), previamente autoclavadas por 30 min, a 120 °C, novamente incubadas em câmara de crescimento por 10 dias, a 28°C e encaminhadas para o Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFV, para identificação.

O meio de cultivo, para manutenção de todos os fungos, foi composto de BDA, autoclavado por 20 min a 121 °C. Foram mantidos por repicagens sucessivas na forma de discos de 8mm de diâmetro para o crescimento radial em placas. As cepas de *Trichoderma* spp. foram incubadas em temperatura ambiente por cinco dias. Os demais fungos foram por sete dias, a 28°C, em estufa de incubação tipo B.O.D. Após cultivo, todos os fungos foram mantidos sob refrigeração a 4°C.

2.3 Cultivo e obtenção de extrato

Os fungos foram cultivados em meio sólido e cultura submersa. Para a cultura submersa, o meio mineral utilizado para crescimento dos fungos em estudo e obtenção de enzimas de interesse continha 0,7% de KH_2PO_4 , 0,2% de

K_2HPO_4 , 0,01% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$; 0,6% de extrato de levedura e 1% da fonte de carbono (bagaço de cana ou farelo de trigo) todas em p/v.

Quatro discos de 8mm de diâmetro contendo micélio fúngico foram transferidos para Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio mineral sob condições assépticas. Os Erlenmeyers foram acondicionados em Shaker, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm, sendo retirado um Erlenmeyer a cada 24 h, durante 13 dias. Posteriormente, essas alíquotas foram filtradas em filtro de poliéster, e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20 °C para análise de atividade enzimática.

Para a fermentação em meio sólido, foi usando o bagaço de cana como suporte e fonte de carbono. A biomassa foi composta por bagaço em lasca e moída na proporção de 22% e 80%, respectivamente. Para compor e umidificar a biomassa, foi utilizado meio mineral composto de (gL^{-1}) 1,0 $(NH_4)_2SO_4$, 0,3 $MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$ e 1,4 de KH_2PO_4 , apresentando umidade final de 68 %. Dessa biomassa, 8 g foram pesadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL e autoclavados por 30 min a 120°C. Após o resfriamento, frascos em duplicata foram transferidos assepticamente com 4 discos, como já descrito, contendo fungos. O crescimento foi conduzido à temperatura ambiente e sem agitação. Após 120 horas de incubação, foram retirados dois Erlenmeyers, em intervalos de 3 dias, durante 37 dias de cultivo. As enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0, sob agitação em shaker a 100 rpm e temperatura ambiente, filtrados em filtro de náilon e armazenados em frascos de poliestileno a -20°C como extrato enzimático.

2.4. Determinação das atividades

Os ensaios para α -galactosidase, β -xilosidase e β -glicosidase consistiram de 250 μ L de tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0), 125 μ L do extrato enzimático e 125 μ L de pNPGal, pNPXyl, pNPGlc 2 mM, respectivamente. A reação foi conduzida em banho-maria por 15 min, a uma

temperatura de 40°C. Ao final do tempo estipulado, a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de uma solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em µmoles de p-NP, utilizando-se uma curva padrão construída com 0-0,2 µmoles de p-NP, a partir de uma solução estoque de concentração 2 µM. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto, nas condições de ensaio.

Para o ensaio da xilanase, foram utilizados 490 µL de xilana birch wood 1% (em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) e 10µL do extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria por 10 min, a uma temperatura de 40°C. A reação foi paralisada com a adição de 500 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) e colocada em banho fervente por 5 min para o desenvolvimento da cor (MILLER, 1956). O DNS tem a função de reagir com os açúcares redutores (produtos da reação enzimática), formando um composto colorido de absorção em 540 nm. A quantificação dos produtos foi realizada por meio de uma curva de calibração, construída com 0-2 µmoles de glicose a partir de uma solução padrão de concentração 1 g/L.

Para a mananase, uma alíquota de 250 µL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, foram adicionados de 125 µL de extrato e 125 mL de *locust bean gum*. A reação foi conduzida em banho-maria por 60 min, a uma temperatura de 40°C. A reação foi paralisada com 500 µL de DNS, como explicado anteriormente.

O ensaio para endoglicanase consistiu de 450 µL de uma solução de carboximetilcelulose 0,625% (m/v), diluído em mesmo tampão citado acima e 50 µL do extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria por 60 min, a uma temperatura de 50°C. A reação foi paralisada com 500 µL de DNS, como explicado anteriormente.

A atividade celulásica total (FPase) foi determinada, utilizando-se como substrato papel de filtro Whatman n°1. Tiras de aproximadamente 1x5 cm (40 mg) foram incubadas a 50°C com 1,450 mL de tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 50 µL do extrato enzimático. O método foi realizado segundo Ghose (1987).

Após 60 min de incubação, a hidrólise foi interrompida com 1 mL de DNS, seguindo-se a quantificação por esse método, como descrito anteriormente.

Para o ensaio da celobiase, foram utilizados 20 μ L do extrato enzimático, o qual foi pré-incubado com 480 μ L de celobiose 8mM (em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0) por 30 min a 50°C. A reação foi paralisada pela imersão dos tubos de ensaios em água fervente, por 5 min, seguindo-se nova incubação, em água gelada, para redução da temperatura do meio de reação. Ao final dessa primeira etapa, 0,5 mL do reativo de glicose oxidase foi adicionado à reação. A mistura foi novamente incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 15 min (BERGMEYER e BERNT, 1974). Os valores de absorbância foram tomados a 510 nm, e convertidos em teores de glicose, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 – 0,15 μ moles de glicose.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de produto por minuto, sob as condições de ensaio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Seleção, cultivo e identificação dos fungos

Foram isoladas cinco espécies fúngicas do bagaço de cana *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium citrinum*. Destes foram estudadas as cepas de *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium citrinum*.

O fungo *Aspergillus japonicus* foi isolado de compostagem de lixo e cedido pelo Laboratório de Análises Bioquímicas (LABQ) do BIOAGRO/ UFV. Dez fungos do gênero *Trichoderma*, isolados de raízes de orquídea, juntamente com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, retirados de solos, foram cedidos pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Juntos, esses fungos foram codificados, identificados (Tabela 1) e analisados quanto à capacidade de produção de enzimas com atividades celulolíticas e hemicelulolíticas.

Tabela 1 - Identificação de fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* spp., isolados de diferentes origens e locais

Código do isolado	Identificação	Origem	Local Cidade/ Estado
PC	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagaço de cana	Urucânia - MG
PT	<i>Penicillium citrinum</i>	Bagaço de cana	Urucânia - MG
AJ	<i>Aspergillus japonicus</i>	Compostagem	Coimbra - MG
TH	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solos	Barreiras-Bahia
TV	<i>Trichoderma viride</i>	Solos	Barreiras-Bahia
T01	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gomesa crispa</i>	Araponga-MG
T02	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia jongheana</i>	Araponga-MG
T03	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia jongheana</i>	Araponga-MG
T04	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia lobata</i>	Rio de Janeiro-RJ
T05	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia lobata</i>	Rio de Janeiro-RJ
T06	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia lobata</i>	Rio de Janeiro-RJ
T07	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia lobata</i>	Rio de Janeiro-RJ
T08	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia lobata</i>	Rio de Janeiro-RJ
T09	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia xanthina</i>	Rio de Janeiro-RJ
T10	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Laelia jongheana</i>	Araponga-MG

Para isso, foram testados cultivos em meio sólido, contendo bagaço de cana como suporte e fonte de nutrientes, e também em meio líquido, contendo farelo de trigo e bagaço de cana como fonte de carbono.

3.2 Atividades das enzimas celulases e hemicelulases em cultivo em meio sólido

Tabela 2 - Atividades de enzimas celulolíticas produzida pelos fungos *Aspergillus japonicus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma* spp., cultivados em meio sólido contendo bagaço de cana

Fungos	Atividade de celulases (U.g ⁻¹)			
	Celobiase	β-Glicosidase	Endoglucanase	FPase
PC	0,06 ²⁶ ± 2E-03	0,02 ³² ± 2E-04	0,05 ¹⁵ ± 4E-04	0,02 ⁵ ± 3E-05
PT	0,10 ¹⁰ ± 3E-03	0,03 ¹⁶ ± 3E-04	0,09 ⁵ ± 4E-04	0,02 ²² ± 7E-03
AJ	0,02 ⁵ ± 4E-05	0,01 ¹⁰ ± 9E-05	0,03 ⁵ ± 7E-05	0,03 ²⁶ ± 3E-03
TH	0,25 ²⁰ ± 5E-05	0,75 ⁵ ± 3E-02	1,00 ¹⁵ ± 3E-04	0,20 ¹⁰ ± 6E-05
TV	0,25 ¹⁵ ± 3E-04	1,00 ¹⁰ ± 1E-04	0,25 ²⁸ ± 3E-04	0,10 ¹⁰ ± 2E-04
T01	0,10 ²⁰ ± 2E-04	5,00²⁸ ± 3E-04	0,10 ²⁰ ± 1E-04	0,75 ¹⁰ ± 2E-04
T02	1,75³¹ ± 1E-04	0,15 ¹⁰ ± 1E-04	2,50²⁶ ± 3E-03	2,00²⁶ ± 3E-03
T03	1,00 ²⁰ ± 5E-05	5,20²⁸ ± 3E-03	1,00 ¹⁵ ± 3E-04	1,00 ²⁰ ± 4E-04
T04	0,13 ²⁵ ± 3E-05	0,13 ¹⁰ ± 3E-03	0,20 ²⁸ ± 4E-04	0,25 ¹⁰ ± 1E-04
T05	0,13 ¹⁵ ± 3E-05	0,08 ⁵ ± 0,04	1,75 ²⁸ ± 3E-05	0,10 ²⁵ ± 3E-04
T06	0,26 ²⁰ ± 2E-04	0,58 ³⁴ ± 5E-05	1,41 ²⁰ ± 2E-03	0,60 ¹⁰ ± 3E-05
T07	0,20 ²⁰ ± 3E-04	0,15 ³¹ ± 4E-05	1,43 ²⁰ ± 5E-03	0,20 ¹⁵ ± 4E-04
T08	0,25 ¹⁵ ± 3E-05	0,07 ³¹ ± 2E-05	1,42 ²⁰ ± 4E-03	0,13 ¹⁰ ± 2E-05
T09	0,60 ²⁵ ± 4E-04	0,18 ¹⁰ ± 6E-05	0,44 ²⁰ ± 3E-04	0,25 ¹⁵ ± 5E-04
T10	0,50 ²⁰ ± 3E-04	0,15 ¹⁰ ± 6E-05	0,40 ²⁰ ± 3E-04	0,30 ²⁰ ± 4E-04

O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).

3.2.1 Unidade de papel de filtro - FPase

No cultivo em meio sólido, contendo bagaço de cana, a maior atividade de FPase foi $2,00 \text{ U.g}^{-1}$ produzida pelo isolado T02 no 26^o dia de cultivo. Os demais isolados produziram de $0,10$ a $1,00 \text{ U.g}^{-1}$. Isso indica que o bagaço de cana induziu a produção de FPase. No entanto, a cinética de produção foi mais lenta, comparando-se a outros trabalhos. Esse fato pode estar associado ao substrato insolúvel de origem lignoselulósica (bagaço de cana), que demandou um período maior de aclimação das células a essa matéria-prima, assim como maior controle de algumas variáveis como temperatura, umidade, ou mesmo adição de outra fonte de carbono para enriquecimento do meio.

Gutierrez-Correa e Tangerday (1997) prepararam cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, em meio contendo bagaço de cana pré-tratado e suplementado com farelo de soja como fonte de nitrogênio e induziram a produção de FPase com pico de atividade de $13,4 \text{ U.g}^{-1}$, após cinco dias de incubação.

Kang et al. (2004) verificaram em seu estudo a máxima atividade de FPase de $19,5 \text{ U.g}^{-1}$, após quatro dias de fermentação, por um mutante *Aspergillus niger* KK2, cultivado em farelo de arroz como suporte sólido e fonte de carbono. No entanto, quando cultivados em misturas contendo farelo de arroz e farelo de trigo, na proporção de 1:4, houve diminuição de 1,8 vezes da atividade de FPase.

Estudo realizado por Brijwani et al. (2010) permitiu concluir que, quanto maior conteúdo de celulose na composição do substrato, melhor será a produção de enzimas celulasas por fungos filamentosos. Outro requisito importante é a relação C/N. Nesse sentido, esses autores estudaram a fermentação sólida composta de casca de soja suplementada com farelo de trigo na proporção de 4:1, para indução de FPase a partir de cultura mista dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, e obtiveram uma máxima atividade de $10,55 \text{ U.g}^{-1}$.

Essa atividade, segundo os autores, é explicada pelas altas quantidades de celulose e hemicelulose em ambos os substratos. Além disso, o farelo de trigo é uma excelente fonte de nitrogênio que, juntamente com a casca de soja, melhorou a relação C/N, apresentando condições ideais para o crescimento de fungos e produção de celulases.

Ng et al. (2010) testaram vários meios como palha de arroz, farelo de arroz, e bagaço de cana, para a indução de FPase por *Penicillium citrinum* YS40-5. O meio que mais induziu a FPase foi a palha de arroz 4,8 U. g⁻¹. No entanto, o meio contendo bagaço de cana não induziu a produção de FPase.

3.2.2 Endoglicanase

Entre todos os fungos estudados, a maior atividade de endoglicanase foi produzida pelo T02 2,50 U.g⁻¹, após 23 dias de cultivo. A atividade enzimática menos significativa foi produzida pelo fungo AJ 0,03 U.g⁻¹, com 5 dias de cultivo.

Gutierrez-Correa e Tengerday (1997) prepararam cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, em meio contendo bagaço de cana pré-tratado e suplementado com farelo de soja como fonte de nitrogênio. Essa otimização do meio de cultivo propiciou aumento de 85% na atividade de endoglicanase.

Ng et al. (2010) testaram vários cultivos sólidos, em meio como palha de arroz, farelo de arroz, e bagaço de cana, para a indução de endoglicanase pelo *Penicillium citrinum* YS40-5. O meio que mais induziu a endoglicanase foi a palha de arroz, apresentando 111,5 U.g⁻¹. O meio contendo bagaço de cana não induziu a produção de endoglicanase. Segundo o autor, o bagaço de cana apresentava teor de proteína muito inferior ao teor de proteína da palha de arroz, podendo esse ter sido um dos fatores para a ausência de atividades.

3.2.3 β -glicosidase e Celobiase

O isolado T03 após 28 dias de cultivo produziu β -glicosidases com máximas atividades $5,20 \text{ U.g}^{-1}$, enquanto a máxima atividade de celobiase foi $1,00 \text{ U.g}^{-1}$. Já o isolado T02 destacou-se por apresentar celobiase com máxima atividade de $1,75 \text{ U.g}^{-1}$ após 31 dias de cultivo, e baixa atividade de β -glicosidases $0,15 \text{ U.g}^{-1}$ em dez dias de cultivo.

Tabela 3 - Atividades de hemicelulases produzidas pelos fungos *Aspergillus japonicus*, *Penicilium citrinum*, *Penicilium chrysogenum* e *Trichoderma* spp., cultivados em meio sólido contendo bagaço de cana.

Fungos	Atividades de hemicelulases (U.g^{-1})			
	Xilanase	β -Xilosidase	β -Mananase	α -Galactosidase
PC	$7,51^5 \pm 1\text{E-}03$	$0,01^{10} \pm 5\text{E-}04$	ns	$0,01^5 \pm 2\text{E-}04$
PT	$7,55^5 \pm 2\text{E-}03$	ns	ns	ns
AJ	$7,53^{10} \pm 2\text{E-}03$	$0,01^{10} \pm 5\text{E-}04$	ns	ns
TH	$7,50^{25} \pm 2\text{E-}03$	$0,25^{20} \pm 1\text{E-}04$	$0,25^{25} \pm 3\text{E-}04$	$0,20^{10} \pm 1\text{E-}04$
TV	$7,51^{20} \pm 1\text{E-}03$	$0,05^{05} \pm 3\text{E-}05$	$0,25^{31} \pm 1\text{E-}04$	$0,10^{10} \pm 1\text{E-}04$
T01	$7,58^{25} \pm 5\text{E-}04$	$0,69^{15} \pm 7\text{E-}05$	$0,75^{28} \pm 1\text{E-}04$	$0,70^{10} \pm 5\text{E-}05$
T02	$30^{15} \pm 2\text{E-}02$	$0,15^{10} \pm 7\text{E-}05$	$1,75^{31} \pm 9\text{E-}05$	$0,01^{28} \pm 2\text{E-}03$
T03	$7,50^{25} \pm 2\text{E-}03$	$0,75^{15} \pm 4\text{E-}05$	$0,75^{15} \pm 1\text{E-}03$	$0,75^{10} \pm 1\text{E-}03$
T04	$2,50^{20} \pm 9\text{E-}04$	$0,13^{15} \pm 2\text{E-}05$	$0,25^{25} \pm 5\text{E-}05$	$0,25^{10} \pm 1\text{E-}04$
T05	$18,00^{31} \pm 1\text{E-}04$	$0,07^{31} \pm 1\text{E-}04$	$1,50^{26} \pm 1\text{E-}04$	$0,07^{31} \pm 1\text{E-}04$
T06	$18,01^{15} \pm 3\text{E-}03$	$0,56^{31} \pm 6\text{E-}05$	$1,63^{31} \pm 3\text{E-}04$	$0,62^{31} \pm 2\text{E-}05$
T07	$18,11^{31} \pm 5\text{E-}03$	$0,33^{31} \pm 8\text{E-}05$	$1,62^{26} \pm 1\text{E-}04$	$0,33^{31} \pm 5\text{E-}05$
T08	$16,01^{15} \pm 1\text{E-}02$	$0,15^{25} \pm 4\text{E-}04$	$1,25^{26} \pm 3\text{E-}04$	ns
T09	$8,50^{20} \pm 1\text{E-}03$	$0,10^{10} \pm 5\text{E-}04$	$0,50^{26} \pm 3\text{E-}05$	$0,05^{20} \pm 4\text{E-}05$
T10	$10,02^{15} \pm 2\text{E-}02$	$0,70^{10} \pm 5\text{E-}05$	$0,70^{26} \pm 6\text{E-}05$	$0,05^{20} \pm 5\text{E-}05$

- ❖ O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).
- ❖ **ns**: valores não-significativos.

Analisando estudos similares, observou-se que Ng et al. (2010) averiguaram que o bagaço de cana não induziu a produção β -glicosidases por *Penicillium citrinum* YS40-5. Brijwani et al. (2010) utilizaram o farelo de trigo e como suplementação a casca de soja, na proporção de 1:4, junto a uma cultura mista composta por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*; nessas condições, a máxima atividade de β -glicosidases obtida foi de 8,13 U.g⁻¹.

3.2.4 α -galactosidase

O bagaço de cana induziu a produção de α -galactosidase. O isolado T03 destacou com máxima atividade em torno de 0,75 U.g⁻¹, após 10 dias de cultivo, pico de atividade próximo foi obtido pelo T01 0,70 U.g⁻¹. Esses resultados foram superiores a outros encontrados na literatura, o que demonstrou que os fungos trichodermas endofíticos têm alta capacidade de produzir enzimas α -galactosidase.

Resultados inferiores a esses foram obtidos por Szendefy et al. (2006), utilizando o mesmo meio de cultivo para *Aspergillus oryzae*, obtendo pico de atividade de 0,19. U.g⁻¹.

Shankar e Mulimani (2007) utilizaram vários meios de cultivo (resíduo de grama vegetal, farelo de trigo, bagaço de cana, casca de maçã, casca de laranja, farelo de arroz e outros). Os resultados encontrados mostraram que a maior atividade dessa enzima foi obtida, utilizando-se resíduo de grama vegetal 3,4 U.g⁻¹, enquanto com bagaço de cana foi obtido 0,28 U.g⁻¹.

3.2.5 β -xilosidase

A β -xilosidase é importante na degradação de xilanas, considerando-se que as xilanas não são hidrolisadas completamente apenas por xilanases. Muitos microrganismos podem produzir β -xilosidase; no entanto, somente

poucas espécies de leveduras e um número limitado de bactérias e fungos produzem essa enzima em quantidades elevadas (BASARAN e OZCAN, 2007).

De acordo com os resultados obtidos, conforme mostrado na Tabela 3, os isolados T01, T03 e T10 foram os que mais produziram atividade de β -xilosidase com máxima atividade variando de 0,69 a 0,75 U.g⁻¹, após 15 dias de cultivo, para os dois primeiros fungos; e 10 dias para T10.

Considine et al. (1988) cultivaram *Penicillium capsulatum* em polpa de beterraba, encontrando a máxima atividade de β -xilosidase de 1,20 U.g⁻¹.

3.2.6 β -mananase

Muitos microrganismos, fungos e bactérias são capazes de produzir enzimas mananases, entretanto, entre os fungos *aspergillus niger* (ADEMARK et al., 1998), o *Trichoderma harzianum* (FERREIRA e FILHO, 2004) destaca-se pela alta capacidade de produção dessa enzima. Neste estudo, os fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* apresentaram também alta capacidade para produção de enzimas mananases.

O bagaço de cana foi eficiente na indução de β -mananase. Os isolados T02, T05, T06 T07 e T08 destacaram-se com picos de atividades variando de 1,25 a 1,75 U.g⁻¹. As demais espécies mantiveram valores variando de 0,25 a 0,75 U.g⁻¹. Observou-se que o tempo necessário para a indução de mananase por todos os isolados foram longos, em torno de 26 a 31 dias.

3.2.7 Xilanase

A xilanase foi induzida em quantidades significativas em todos os fungos estudados. Entretanto, o isolado T02 destacou-se com pico de atividade 30,00 U.g⁻¹. Os demais isolados tiveram uma variação de 7,50 a 18,00 U.g⁻¹. O isolado T04 foi o que menos produziu, ou seja, mostrou 2,50 U.g⁻¹. Podemos afirmar que o bagaço de cana utilizado tem um enorme potencial como

substrato para a produção de xilanase. Os resíduos da agricultura contêm de 20 a 30% de material hemicelulítico. Esses resíduos, na forma natural, são fonte de xilana e xilo-oligômeros (KULKARNI et al., 1999) favorecendo a atividade de xilanase. É importante ressaltar que o isolado T02 destacou-se também na produção de mananase, comparado aos outros fungos. No entanto, o tempo de cultivo foi praticamente o dobro, em relação à produção de xilanase.

Camassola e Dillon (2007) cultivaram *Penicillium echinulatum* em bagaço de cana pré-tratado quimicamente e suplementado com farelo de trigo, obtendo-se 10 U.g⁻¹. Segundo eles, o pré-tratamento, juntamente com o acréscimo de farelo de trigo, foram fatores importantes para a alta atividade de xilanase. Comparando a este estudo, as atividades de xilanase dos *Trichoderma* endofíticos T02 superaram em três vezes as atividades produzidas pelo *Penicillium echinulatum*. Além disso, o bagaço de cana utilizado não passou por nenhum tipo de pré-tratamento. Esse fator é de extrema relevância em termos de custo na produção dessa enzima.

3.3 Atividades de celulasas e hemicelulasas em cultivo submerso

As referidas atividades são mostradas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Atividades de enzimas celulolíticas produzidas pelos fungos *Aspergillus japonicus*, *Penicilium citrinum*, *Penicilium chrysogenum* e *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono

Fungos	Atividades de celulasas (U _{mL} ⁻¹)			
	Celobiase	β-Glicosidase	Endoglicanase	FPase
PC	0,47 ⁷ ± 5E-03	1,50 ⁷ ± 3E-02	0,34 ¹¹ ± 7E-05	0,14 ¹⁰ ± 6E-05
PT	0,33 ¹⁸ ± 6E-04	1,34 ⁸ ± 2E-02	1,34 ⁸ ± 3E-03	0,11 ² ± 8E-05
AJ	0,35 ¹⁷ ± 2E-05	1,79⁷ ± 3E-02	2,19⁵ ± 5E-02	3,26⁵ ± 1E-02
TH	0,40 ¹⁰ ± 5E-03	1,00 ⁹ ± 9E-02	0,80 ² ± 3E-03	0,20 ⁶ ± 4E-03
TV	0,58 ⁷ ± 3E-03	0,30 ¹³ ± 9E-03	0,20 ¹⁰ ± 2E-03	0,06 ⁶ ± 7E-04
T01	0,10 ² ± 6E-04	0,40 ⁸ ± 7E-03	0,48 ² ± 1E-02	0,60 ² ± 1E-03
T02	0,60¹⁰ ± 6E-03	0,96 ⁶ ± 2E-02	0,60 ² ± 8E-03	0,04 ⁶ ± 1E-03
T03	0,15 ⁴ ± 7E-04	0,40 ⁷ ± 4E-03	0,30 ⁴ ± 4E-03	0,78 ⁴ ± 6E-04
T04	0,20 ¹² ± 6E-03	0,33 ⁶ ± 1E-02	0,40 ⁴ ± 8E-03	0,06 ⁴ ± 8E-03
T05	0,18 ⁸ ± 2E-03	0,30 ⁶ ± 5E-02	0,41 ² ± 1E-02	0,05 ⁴ ± 3E-05
T06	0,40 ¹⁰ ± 2E-02	1,00 ⁸ ± 2E-02	0,24 ⁴ ± 6E-03	0,10 ⁴ ± 1E-03
T07	0,34 ¹⁰ ± 8E-02	0,40 ⁴ ± 2E-02	0,38 ² ± 3E-02	0,07 ⁴ ± 1E-03
T08	0,25 ¹⁰ ± 5E-02	0,34 ⁷ ± 9E-03	0,63 ² ± 4E-02	0,14 ² ± 2E-03
T09	0,23 ⁸ ± 4E-03	0,32 ⁸ ± 1E-02	0,60 ² ± 2E-02	0,16 ² ± 1E-03
T10	0,20 ¹⁰ ± 5E-02	0,34 ⁷ ± 1E-02	0,62 ² ± 4E-02	0,08 ⁷ ± 3E-03

❖ O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).

Tabela 5 - Atividades de enzimas celulolíticas produzidas pelos fungos *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido contendo bagaço de cana como fonte de carbono

Fungos	Atividade de Celulases (U.mL ⁻¹)			
	Celobiase	β -glicosidase	Endoglicanase	FPase
TH	0,20⁶ ± 5E-03	3,0⁹ ± 2E-02	1,00 ² ± 1E-02	0,60 ⁸ ± 1E-03
TV	0,13 ¹³ ± 3E-04	0,40 ¹³ ± 2E-02	0,04 ¹¹ ± 1E-03	0,40 ¹⁰ ± 3E-02
T1	0,14 ⁴ ± 3E-03	0,42 ⁸ ± 3E-03	1,02 ¹² ± 1E-03	1,00 ⁶ ± 5E-03
T02	0,15 ⁷ ± 5E-04	1,40⁸ ± 1E-03	1,40¹³ ± 2E-02	0,60 ⁸ ± 2E-02
T03	0,18 ¹² ± 6E-03	0,63 ¹¹ ± 6E-03	0,20 ⁶ ± 3E-03	0,20 ¹² ± 1E-03
T04	0,12 ¹³ ± 6E-03	0,61 ¹¹ ± 1E-02	1,01 ² ± 4E-03	0,20 ² ± 6E-03
T05	0,13 ¹³ ± 2E-03	0,62 ¹¹ ± 9E-03	0,80 ⁶ ± 2E-03	0,60 ⁶ ± 2E-02
T06	0,08 ⁷ ± 2E-04	0,40 ¹² ± 2E-03	0,06 ¹³ ± 2E-04	0,20 ¹² ± 8E-04
T07	0,13 ¹⁰ ± 1E-03	0,60 ⁴ ± 2E-02	0,60 ² ± 3E-03	0,40 ⁴ ± 4E-03
T08	0,14 ¹¹ ± 8E-03	1,60⁷ ± 7E-03	1,50² ± 1E-03	1,24² ± 6E-03
T09	0,12 ¹² ± 4E-04	0,61 ⁶ ± 5E-03	1,10 ² ± 1E-02	1,22 ² ± 1E-02
T10	0,11 ¹¹ ± 5E-03	0,63 ⁶ ± 3E-03	0,40 ⁴ ± 2E-03	1,20 ² ± 1E-02

❖ O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).

3.3.1 Atividade papel de filtro - FPase

A fonte de carbono que mais induziu a atividade de FPase foi o farelo de trigo, pelo isolado AJ, produzindo 3,26 U.mL⁻¹, enquanto o isolado T02 produziu FPase com menor atividade 0,04 U.mL⁻¹ (Tabela 4). No entanto, o meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono apresentou maior eficiência como indutor de FPase para a maioria dos outros isolados (Tabela 5). O

destaque foi o isolado T08, produzindo 1,24 U.mL⁻¹, enquanto o isolados T03, T04 e T06 produziram FPase com menor atividade 0,20 U.mL⁻¹(Tabela 5).

Nos trabalhos de AGUIAR e MENEZES (2002), foi estudada a produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ9, usando fermentação submersa sobre três tipos de bagaço de cana: um sem tratamento químico, os outros dois com tratamento à base de solução de hidróxido de sódio a 4%, sendo um neutralizado com lavagens sucessivas com água destilada, e o outro neutralizado com solução de ácido fosfórico. Os autores verificaram que a produção de atividade de FPase foi maior em bagaço de cana tratado com solução de hidróxido de sódio a 4% e neutralizado com lavagens sucessivas com água destilada. As atividades de FPase foram 0,25 U.mL⁻¹ (bagaço tratado) e de aproximadamente 0,15 U.mL⁻¹ (bagaço não tratado), alcançadas após sete dias.

O resultado obtido no presente trabalho, para todos os fungos, foi superior ao de Aguiar e Menezes. Acresce-se que a concentração do bagaço usado no referido trabalho foi de 4%, enquanto neste estudo a concentração foi de 1,0%.

Liming e Xueliang (2004) utilizaram 4% de sabugo de milho como fonte de carbono para indução de celulasas em *Trichoderma reesei*. A máxima atividade obtida foi de 5,2 U.mL⁻¹, após sete dias de cultivo. Recentemente, Siqueira et al. (2010) estudaram 21 espécies de fungos filamentosos, cultivados em meio contendo fonte de carbono, caule de bananeira e resíduo de algodão para produção de celulasas. As máximas atividades encontradas foram 0,120 U.mL⁻¹ por *Emericella nidulans* e *Aspergillus tamariz* em resíduo de algodão, e 0,175 U.mL⁻¹ em caule de bananeira para o *Fusarium verticillioides*. As atividades de FPase produzidas pelo o *Trichoderma harzianum* foram 0,03 U.mL⁻¹ em resíduo de algodão e 0,04 U.mL⁻¹ caule de bananeira.

3.3.2 Endoglicanase

A maior atividade de endoglicanase, $2,19 \text{ U.mL}^{-1}$, foi induzida em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono pelo isolado AJ, após cinco dias de cultivo (Tabela 4). No entanto, para a maioria dos fungos, as atividades de endoglicanase foram superiores em bagaço de cana como fonte de carbono, destacando-se o isolado T08, que produziu enzima com máxima atividade $1,50 \text{ U.mL}^{-1}$, após dois dias de cultivo (Tabela 5).

Resultados inferiores foram obtidos por Olsson et al. (2003), com pico de atividade $0,06 \text{ U.mL}^{-1}$ de endoglicanase por *T. reesei* Rut C-30, quando cultivado em meio contendo como fonte de carbono celulose de polpa de beterraba.

Utilizando substratos puros como fonte de carbono, Marques et al. (2003) produziram endoglicanase com atividade $0,20 \text{ U.mL}^{-1}$ por *Trichoderma viride* cultivado em celulose Avicel. Comparado ao presente trabalho, conforme (Tabela 4), o isolado *Trichoderma viride* (TV) produziu endoglicanase com atividade semelhante, no entanto, o substrato utilizado era composto de farelo de trigo.

De acordo com Adsul et al. (2004), a atividade de endoglicanase das linhagens fúngicas, de *Trichoderma viride* e *Penicillium janthinellum*, aumenta bastante quando desenvolvida em meio acrescido de fonte de carbono contendo bagaço de cana pré-tratado com NaClO_2 . Isso permite maior acessibilidade do microrganismo, facilitando a hidrólise da celulose do bagaço.

Camassola e Dillon (2009) pré-trataram o bagaço de cana biologicamente, utilizando o fungo da podridão branca *Pleurotus sajor-caju* PS 2001. Posteriormente, a biomassa foi utilizada na produção de celulasas e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum*; a atividade máxima de endoglicanase apresentada foi $1,0 \text{ U.mL}^{-1}$. Embora realizado o pré-tratamento, seu resultado foi semelhante ao encontrado no presente trabalho para a cepa de *Trichoderma harzianum* (TH) e inferiores em relação a outras cepas.

Segundo Siqueira et al. (2010), das 21 espécies de fungos filamentosos cultivados em meio contendo como fonte de carbono caule de bananeira e resíduo de algodão para produção de celulases, a máxima atividade de endoglicanase encontrada foi produzida pelo fungo por *Aspergillus terreus* 0,213 U.mL⁻¹ em resíduo de algodão e 0,519 U.mL⁻¹ em caule de bananeira.

As cepas de *Trichoderma harzianum* apresentaram uma atividade 0,1 UmL⁻¹ em resíduo de algodão contra 0,012 U.mL⁻¹ em caule de bananeira. *Penicillium citrinum* produziu essa enzima com máxima atividade de 0,05 e 0,1 U.mL⁻¹ em resíduo de algodão e caule de bananeira, respectivamente.

3.3.3 β-glicosidase

Tanto o bagaço de cana quanto o farelo de trigo induziram significativamente os isolados a produzirem β-glicosidase. No entanto, as maiores atividades foram induzidas em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. O isolado TH destacou-se por produzir enzimas com atividades de 3,00 U.mL⁻¹ no nono dia de cultivo, seguido pelo T02 1,40 U.mL⁻¹ após onze dias de cultivo. Entretanto, no meio contendo farelo e trigo, ambos os fungos produziram β-glicosidase com máxima atividade, em torno de 1,0 U.mL⁻¹, mas a maior atividade dessa enzima foi 1,79 U.mL⁻¹ produzida pelo isolado AJ. As menores atividades foram 0,40 e 0,30 U.mL⁻¹ em bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente, pelo isolado TV.

Estudos feitos por Latif et al. (1995) em *Aspergillus fumigatus* e *Sporotrichum thermophile*, ambos cultivados em resíduo de grama como fonte de carbono, produziram β-glicosidase com 0,14 e 0,47 U.mL⁻¹ de atividades, respectivamente. Em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, esses autores encontraram atividades ainda menores.

Bisaria et al. (1997) encontraram máxima atividade para β-glicosidase 0,60 U.mL⁻¹, após 15 dias de cultivo, por *Pleurotus sajor-caju* cultivado em palha de arroz.

Jorgensen e Olsson (2006), na produção de β -glicosidase por *P. brasilianum* IBT 20888, cultivados em meio contendo fonte de carbono celulose pura, alcançaram um pico de $2,2 \text{ U.mL}^{-1}$, na mistura de xilana oat spelts, xilana birchwood e celulose pura $2,6 \text{ U.mL}^{-1}$; e em madeira da prúcia pré-tratada com explosão a vapor $3,5 \text{ U.mL}^{-1}$, após sete dias de cultivo.

Rodrigues (2009), estudando a produção de enzimas por duas espécies de *Aspergillus* e um *Penicilium*, nas mesmas condições de cultivo do presente trabalho, encontraram que o fungo *A. niger* LTB e *A. glaucus* LTB apresentaram baixas atividades de β -glicosidase, quando crescidos em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, tendo picos de atividades de $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ no décimo primeiro dia e de $0,03 \text{ U.mL}^{-1}$ no quinto dia respectivamente.

3.3.4 Celobiase

As atividades de celobiase foram induzidas com maior eficiência no meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono, quando comparadas ao bagaço de cana nas mesmas condições de cultivo. A maior atividade de celobiase $0,60 \text{ U.mL}^{-1}$ foi detectada pelo isolado T02 em meio contendo farelo de trigo, enquanto em bagaço de cana foi $0,15 \text{ U.mL}^{-1}$. A máxima atividade de celobiase, $0,20 \text{ U.mL}^{-1}$, em meio contendo bagaço de cana, foi produzida pelo isolado TH.

De Marco et al. (2003), produzindo enzimas hidrolíticas do fungo *Trichoderma harzianum* 39.1, cultivado em meio contendo celulose microcristalina como fonte de carbono, encontraram a máxima atividade de $0,62 \text{ U.mL}^{-1}$. No estudo de Chandra et al. (2009), durante a produção de celulases por mutante de *Trichoderma citrinoviride*, obtiveram-se as atividades de $1,94 \text{ U.mL}^{-1}$.

Tabela 6 - Atividades de enzimas hemicelulolíticas (U.mL⁻¹) produzidas pelos fungos *Aspergillus japonicus*, *Penicilium citrinum*, *Penicilium chrysogenum* e *Trichoderma* spp., cultivados em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono

Fungos	Atividade de Hemicelulases (U.mL ⁻¹)			
	Xilanase	Xilosidase	Mananase	αGalactosidase
PC	23,10 ⁵ ± 0,4	0,09 ⁸ ± 3E-04	ns	0,76 ¹⁰ ± 2E-02
PT	11,10 ¹¹ ± 0,1	0,03 ⁵ ± 4E-05	ns	0,60 ¹⁰ ± 2E-03
AJ	49,20 ⁵ ± 0,8	0,09 ⁵ ± 2E-04	ns	0,12 ⁵ ± 4E-05
TH	96,60 ⁴ ± 1,3	0,24 ⁶ ± 1E-04	0,60 ¹³ ± 2E-02	0,20 ¹⁰ ± 2E-02
TV	127,20² ± 0,9	0,30¹² ± 9E-04	0,40 ¹² ± 1E-02	0,80⁶ ± 3E-03
T01	57,20 ² ± 0,7	0,06 ² ± 1E-03	0,60 ¹³ ± 1E-03	0,20 ² ± 2E-03
T02	93,80 ² ± 4,2	0,20 ² ± 2E-03	1,30⁸ ± 1E-02	0,30 ⁷ ± 9E-04
T03	155,60⁸ ± 2,4	0,08 ⁶ ± 7E-04	0,83 ¹² ± 8E-03	0,30 ¹² ± 8E-04
T04	48,00 ² ± 0,8	0,22 ⁷ ± 4E-04	0,40 ¹² ± 8E-03	0,20 ¹⁰ ± 4E-04
T05	59,80 ¹² ± 0,6	0,22 ² ± 9E-05	0,40 ⁷ ± 1E-02	0,20 ¹⁰ ± 8E-05
T06	95,80 ⁴ ± 0,8	0,20 ¹² ± 1E-03	0,80 ¹² ± 3E-03	0,20 ¹² ± 1E-03
T07	57,20 ¹² ± 0,3	0,16 ⁷ ± 5E-04	0,50 ¹⁰ ± 5E-03	0,12 ⁸ ± 2E-02
T08	62,40 ² ± 0,5	0,06 ² ± 1E-03	1,00 ¹¹ ± 1E-03	0,34 ⁷ ± 1E-03
T09	94,40 ² ± 1,9	0,12 ² ± 4E-04	0,60 ¹⁰ ± 4E-04	0,20 ⁶ ± 2E-03
T10	122,40² ± 2,5	0,20 ⁶ ± 1E-03	0,80 ¹² ± 1E-02	0,34 ⁸ ± 7E-04

❖ O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).

❖ ns: valores não-significativos.

Tabela 7 - Atividades de enzimas hemicelulolíticas produzidas pelos fungos *Aspergillus japonicus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma* spp. cultivados em meio líquido contendo bagaço de cana como fonte de carbono

Fungos	Atividade de Hemicelulases (U.mL ⁻¹)			
	Xilanase	β-Xilosidase	Mananase	α-Galactosidase
TH	62,00 ⁶ ± 3,7	0,40¹³ ± 2E-04	0,20 ⁶ ± 3E-04	0,04 ⁸ ± 4E-03
TV	32,00 ⁷ ± 0,4	0,20 ¹¹ ± 2E-02	0,04 ¹¹ ± 1E-04	0,12¹⁰ ± 2E-03
T01	46,00 ² ± 2,9	0,04 ⁶ ± 1E-03	0,60 ² ± 2E-03	0,03 ² ± 3E-04
T02	70,00⁴ ± 4,3	0,04 ¹ ± 8E-04	0,80⁶ ± 1E-03	0,02 ¹² ± 3E-04
T03	46,00 ⁸ ± 3,1	0,01 ¹¹ ± 1E-04	0,14 ⁶ ± 1E-05	0,04 ⁸ ± 4E-03
T04	30,00 ² ± 0,6	0,01 ¹¹ ± 8E-03	0,40 ⁹ ± 2E-03	0,01 ⁵ ± 2E-05
T05	28,00 ² ± 0,5	0,03 ² ± 1E-03	0,60 ⁶ ± 3E-03	0,10 ² ± 2E-03
T06	38,00 ¹³ ± 2,8	0,01 ¹³ ± 1E-03	0,04 ¹⁰ ± 5E-04	0,02 ⁶ ± 3E-04
T07	32,00 ² ± 0,3	0,02 ¹³ ± 3E-04	0,40 ⁹ ± 2E-03	0,02 ⁶ ± 3E-03
T08	51,00 ⁴ ± 1,8	0,04 ⁹ ± 1E-03	0,64 ² ± 5E-03	0,03 ⁹ ± 4E-04
T09	50,00 ² ± 1,4	0,10 ⁴ ± 1E-03	0,60 ⁷ ± 4E-03	0,04 ⁴ ± 3E-05
T10	54,00 ⁴ ± 3,5	0,22 ¹¹ ± 2E-03	0,61 ⁷ ± 1E-03	0,03 ⁶ ± 1E-03

❖ O número sobrescrito indica o dia em que se obteve o maior valor de atividade enzimática (número de dia variável).

3.3.5 Xilanase

As duas fontes de carbono analisadas induziram quantidades extremamente altas de xilanase. Entretanto, as maiores atividades dessa enzima foram obtidas, quando se utilizou o farelo de trigo como fonte de carbono, destacando-se o isolado T03, que produziu altas atividades de xilanases 155,60 U.mL⁻¹, após oito dias de cultivo (Tabela 6). Em média, a produção dessa enzima pelos 15 isolados analisados foi 76,92 U.mL⁻¹.

Considerando somente as cepas de *Trichoderma* spp., a menor atividade foi 48,00 U.mL⁻¹ para isolado T04. Isso demonstra que o farelo de trigo, nas condições de cultivos utilizadas, comprovou ser excelente indutor de xilanase produzidas por fungos *Trichoderma* endofíticos.

Em meio contendo como fonte de carbono bagaço de cana, a maior atividade de xilanase foi de 70,00 U.mL⁻¹ produzida pelo isolado T02 após quatro dias de cultivo, sendo a menor atividade 28,00 U.mL⁻¹ pelo isolado T05. Em média, encontrou-se 44,80 U.mL⁻¹, o que significa que o bagaço de cana também é um excelente indutor de xilanase (Tabela 7).

Marques et al. (2003) analisaram o cultivo de duas cepas: *Aspergillus tereus* 498 cultivados em xilana oat spelts como fonte de carbono e *Trichoderma viride* cultivados em meio contendo fonte de carbono celulose microcristalina, ambos os meios na concentração de 4%. A máxima atividade de xilanase foi 26,9 U.mL⁻¹ para a cepa *Aspergillus tereus* 498. O *Trichoderma viride* produziu xilanase com máxima atividade 1,8 U.mL⁻¹.

No presente trabalho, o *Trichoderma viride* produziu xilanase com pico de atividade 127,2 e 32 U.mL⁻¹, durante o cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana, respectivamente, na concentração de 1%.

Qinnghe et al. (2004) estudaram a produção de xilanase em fermentação líquida por *Pleurotus ostreatus* CY012. A máxima atividade de xilanase foi 24.98 U.mL⁻¹, obtida quando utilizaram a mistura contendo sabugo de milho e farelo de trigo, ambas com a mesma concentração 2,5%. No entanto, Oliveira et al. (2005) produziram xilanase, utilizando vários meios de cultivo (sabugo de milho, casca de aveia, bagaço de cana, palha de trigo e casca de mandioca). Os resultados mostraram que os melhores indutores de xilanases por *Penicillium janthinellum* foram sabugo de milho 54,8 U.mL⁻¹ e casca de aveia 54,0 U.mL⁻¹. As atividades xilanolítica em bagaço de cana e palha de milho foram 23,0 e 23,8 U.mL⁻¹, respectivamente. Não houve resultado significativo quando se utilizou a casca de mandioca.

Siqueira et al. (2010) estudaram 21 espécies de fungos filamentosos cultivados no meio contendo fonte de carbono caule de bananeira e resíduo de

algodão. A máxima atividade encontrada foi 3,5 U.mL⁻¹ por *Aspergillus terreus* em resíduo de banana e 2,6 U.mL⁻¹ por *Aspergillus oryzae* em resíduo de algodão. No entanto, foram resultados extremamente inferiores, comparados aos encontrados neste trabalho, conforme Tabelas 5 e 6.

3.3.6 β-xilosidase

Os dois meios utilizados induziram a produção de β-xilosidase. O isolado TH destacou-se por produzir alta atividade de β-xilosidases em bagaço de cana 0,40 U.mL⁻¹ (Tabela 7). Em farelo de trigo, o TV produziu as maiores atividades de xilosidase 0,30 U.mL⁻¹ (Tabela 6). Dentre os *Trichoderma* spp., destacou-se o isolado T10, com máxima atividade 0,22 U.mL⁻¹ em bagaço de cana.

Lemos e Pereira (2002) avaliaram os efeitos da adição de xilose e glicose, em diferentes concentrações, na síntese de xilanase e β-xilosidase por *Aspergillus awamori* cultivado em bagaço de cana e observaram que a produção de β-xilosidase foi estimulada; porém, isso não ocorreu, quando baixos níveis de açúcares foram utilizados (1 g de xilose ou glicose / 4 g de bagaço de cana). Em estudos de Marques et al. (2003), foi analisado o cultivo de duas cepas: *Aspergillus terreus* 498 cultivados em xilana oat spelts como fonte de carbono e *Trichoderma viride* cultivados em meio contendo fonte de carbono celulose microcristalina. Não foi detectada atividade de xilosidase para *Aspergillus terreus*, enquanto *Trichoderma viride* produziu β-xilosidase com máxima atividade 0,53 U.mL⁻¹. Basaran e Ozcan (2007) cultivaram e caracterizaram β-xilosidase de mutante *Pichia stipitis* em meio de cultivo contendo xilana birchwood, aveia, e sabugo de milho. A máxima atividade obtida foi 0,18 U.mL⁻¹ para todos os meios testados.

3.3.7 β - mananase

O isolado T02 apresentou a maior atividade de mananase, quando cultivado em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono $1,30 \text{ U.mL}^{-1}$, após 8 dias de cultivo (Tabela 6) e maior atividade em meio contendo bagaço de cana, $0,80 \text{ U.mL}^{-1}$ após 6 dias de cultivo (Tabela 7). Observou-se que a produção de mananase e obtenção de picos de máximas atividades em meio farelo de trigo foram superiores, comparado ao meio contendo bagaço de cana.

Lin e Chen (2004) testaram várias fontes de carbono para o cultivo de *Aspergillus niger* para produção de mananases (Locust bean gum, goma guar, semente de coco e semente de coco desengordurada). A maior atividade enzimática foi proporcionada quando se utilizou a semente de coco desengordurada 27 U.mL^{-1} , e esta foi dez vezes maior comparada à semente de coco, quatro e cinco vezes maior que o meio contendo goma de alfarroba e goma guar, respectivamente. Segundo esses autores, a relação entre manose e galactose da goma de alfarroba e goma guar são 1:4 e 2:1, respectivamente, enquanto no coco desengordurado 14:1. Assim, o alto teor de galactomanana foi o fator determinante para aumento da atividade de mananase. Siqueira et al. (2010) estudaram 21 espécies de fungos filamentosos cultivados em meio contendo como fonte de carbono caule de bananeira e resíduo de algodão para produção de hemicelulose. A máxima atividade de mananase encontrada foi $0,455 \text{ U.mL}^{-1}$ por *Emericella nidulans* em resíduo de algodão.

Em caule de bananeira, o *Aspergillus sydowii* produziu mananase com máxima atividade $1,2 \text{ U.mL}^{-1}$. O *Trichoderma harzianum* produziu $0,095$ e $0,002 \text{ U.mL}^{-1}$ em resíduo de algodão e caule de bananeira, respectivamente. No entanto, no presente trabalho, a máxima atividade de *Trichoderma harzianum* foi $0,60$ e $0,20 \text{ U.mL}^{-1}$ em meio contendo farelo de trigo e bagaço de cana, respectivamente.

3.3.8 α -galactosidase

Para todos os fungos analisados, os níveis de α -galactosidase foram maiores, quando se utilizou o farelo de trigo como fonte de carbono. O isolado TV destacou-se por produzir α -galactosidase com melhores atividades, comparado aos demais $0,80 \text{ U.mL}^{-1}$ em farelo de trigo e $0,12 \text{ U.mL}^{-1}$ em bagaço de cana (Tabelas 6 e 7). Entre os *Trichoderma* spp. endofíticos, a máxima atividade dessa enzima foi $0,34 \text{ U.mL}^{-1}$ em meio farelo de trigo produzido pelos isolados T08 e T10.

Jorgensen e Olsson (2006), no cultivo de *P. brasilianum* IBT 20888, utilizando como fontes de carbono celulose microcristalina, obtiveram a máxima atividade $0,7 \text{ U.mL}^{-1}$. No entanto, em mistura contendo 2,5% de celulose microcristalina e xilana birchwood e oat spelt xylan, a máxima atividade de α -galactosidase foi $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$. Segundo os autores, o acréscimo de xilana contribui para o aumento da atividade.

4 CONCLUSÕES

- O cultivo em meio sólido, contendo bagaço de cana, induziu a produção de celulases e hemicelulases. Dentre os quinze isolados analisados, o T02 foi o que apresentou maiores atividades para FPase, endoglicanase, celobiase, e baixas atividades de β -glicosidase. O T03 foi o isolado que produziu maior atividade de β -glicosidase.
- Quanto à produção de hemicelulases, o isolado T02 produziu altas atividades de xilanase e mananase. As altas atividades de xilosidase e α -galactosidase foram produzidas pelo isolado T03.
- No cultivo submerso as celulases foram induzidas com mais eficiência em meio contendo bagaço de cana comparado ao farelo de trigo. No entanto, o meio farelo de trigo induziu altas atividades de hemicelulases comparada ao bagaço de cana pela maioria dos fungos analisados.

- Os isolados TH, T08 e T02, destacaram-se com picos de máximas atividades para FPase, endoglicanase e β -glicosidase cultivado em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. No meio farelo trigo o isolado AJ produziu altas atividades de FPase, endoglicanase e β -glicosidase. A atividade de celobiase foi produzida em maior quantidade pelo isolado T02.
- Quanto às hemicelulases, todas as cepas produziram altas atividades de xilanases, destacando o isolado T03 em cultivo contendo farelo de trigo como fonte de carbono. O isolado TV produziu maiores quantidades de α -galactosidade e xilosidase, enquanto, T02 produziu altas atividades de mananase. Em meio bagaço de cana o isolado T02 destacou-se por produzir xilanases e mananases com altas atividades. As maiores atividades de xilosidade e α -galactosidade foram produzidas pelos isolados TH e TV, respectivamente.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE UTILIZANDO EXTRATOS SIMPLES E MISTURAS

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise de material celulósico por celulasas é uma abordagem promissora para obtenção de altos rendimentos de produtos orgânicos e açúcares, os quais são matéria-prima para produção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, considerado de grande importância quanto aos aspectos econômicos e ambientais. No entanto, uma das maiores dificuldades na implantação desse processo de bioconversão reside no alto custo das enzimas, necessárias à sacarificação da celulose em açúcares fermentáveis (ADSUL et al., 2004; SINGH et al, 2009; NG et al., 2010).

Trichoderma reesei e seus mutantes são os fungos ascomicetos mais estudados, e é utilizado para a produção comercial de hemicelulases e celulases (JØRGENSEN et al, 2003). Geralmente, os isolados de *Trichoderma* são obtidos de solo ou resíduo vegetal em decomposição. Raízes de plantas representam um nicho ecológico pouco pesquisado, que pode abrigar microrganismos endofíticos. Esses microrganismos, que colonizam plantas, requerem grande número de enzimas hidrolíticas para degradar a parede celular (BISCHOFF et al., 2009).

O complexo celulolítico secretado por *Trichoderma* é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. Essas enzimas, individualmente, promovem alterações diferenciadas na estrutura da celulose, mas, por apresentarem propriedades complementares, atuam sinergisticamente na hidrólise ou sacarificação da celulose (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999).

A sacarificação da celulose é uma alternativa interessante para a utilização de biomassas residuais, como bagaço de cana, para produção de bioetanol (CAMASSOLA et al., 2004). Uma das formas de estudar as propriedades da sacarificação é baseada na avaliação do potencial mecanismo das celulases, assim como a comparação da capacidade hidrolítica dos sistemas de enzimas celulolíticas de diferentes fontes (ORTEGA et al., 2001).

Os objetivos deste estudo foram utilizar isolados do gênero *Trichoderma* spp. endofíticos isolados de raízes de orquídeas, cultivados em resíduos vegetais, caracterizar bioquimicamente suas enzimas celulases. Também foi avaliado o potencial de sacarificação dessas celulases, de forma simples ou misturadas, sobre o substrato celulose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Tecnologia Bioquímica, localizado no Centro de Ciências Biológicas II, Laboratório de Análises Bioquímicas, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária/BIOAGRO, situados na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

2.1 Reagentes

Da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) foi obtido o reagente para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p NP β Glc), celobiose foi adquirida da Sigma Chemical Co. (Germany and USA). O bagaço de cana foi obtido em unidades experimentais da Universidade Federal de Viçosa. O farelo de trigo adquirido no comércio local.

Os demais reagentes utilizados para execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analítico.

2.2 Microrganismo

Entre os fungos *Trichodermas* spp. cedidos pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFV foram selecionados dois extratos, um contendo o isolado T02 e outro contendo o isolado T08 sob diferentes condições de cultivo, pelo fato de serem as cepas que apresentaram maiores atividades celulolíticas nos diferentes cultivos para o processo de sacarificação.

2.3 Cultivo e obtenção de extrato

O meio de cultivo, para manutenção os dois isolados de *Trichoderma* spp., foi composto de (BDA) Batata Dextrose Agar, previamente autoclavado a 121°C por 20 min, incubado em temperatura ambiente por cinco dias, posteriormente, mantido sob refrigeração a 4°C.

O meio mineral utilizado para cultivo e obtenção de enzimas continha 0,7% de KH_2PO_4 , 0,2% de K_2HPO_4 , 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6% de extrato de levedura e 1% da fonte de carbono bagaço de cana e farelo de trigo. Frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio mineral foram inoculados sob condições assépticas, com 4 discos (8mm de diâmetro), acondicionados em Shaker, a 28°C, sob agitação de 180 rpm, sendo retirado um Erlenmeyer a cada 24 h, durante 13 dias. Posteriormente, essas alíquotas foram filtradas em filtro de poliéster, e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20 °C para análise de atividade enzimática.

2.4. Determinação das atividades

O ensaio para, β -glicosidase foi executado a partir da mistura de 325 μL de tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0), 50 μL do extrato enzimático 125 μL de pNPGlc 2 mM. A reação foi conduzida por 15 min a 40°C. A reação foi paralisada pela adição de 500 μL de uma solução de Na_2CO_3 0,5 M. Os valores

de absorvância foram lidos a 410 nm em espectrofotômetro. O ensaio para endoglicanase consistiu em 50 µL do extrato enzimático e 450 µL de uma solução de carboximetilcelulose 0,625% (m/v), diluídos no mesmo tampão citado acima. A reação foi conduzida por 60 min a 50°C, e paralisada com a adição de 500 µL do reagente DNS (Miller, 1956). Os valores de absorvância foram tomados a 540 nm e convertidos em quantidade de açúcar redutor produzido, uma curva padrão construída com 0-2 µmoles de glicose a partir de uma solução padrão de concentração 1 g/L. A atividade de celulase total (FPase) foi determinada segundo Ghose (1987), utilizando como substrato papel de filtro Whatman n°1 (1x5cm, 40 mg) incubadas a 50°C com 1,450 mL de tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 50 µL do extrato enzimático. Após 60 min de incubação, a hidrólise foi interrompida com 1 mL de DNS e seguiu-se a quantificação pelo método descrito anteriormente.

Para o ensaio da celobiase foram utilizados 20 µL do extrato enzimático, 480 µL de celobiose 8mM (em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0) por 30 min a 50°C. A reação foi paralisada pela imersão dos tubos de ensaios em água fervente por 5 min, resfriada em banho de gelo. Ao final dessa etapa, 0,5 mL do reativo de glicose oxidase foi adicionado à reação. A mistura foi incubada a 37 °C, por 15 min (BERGMEYER e BERNT, 1974). Os valores de absorvância foram tomados a 510 nm e convertidos em teores de glicose, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 – 0,15 µmoles de glicose.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de produto por minuto, sob as condições de ensaio.

2.5 Caracterização enzimática

2.5.1 Efeito do pH

Foi avaliada a influência do pH sobre a taxa de hidrólise das enzimas endoglicanases, celobiase e celulase total. As atividades enzimáticas foram determinadas em uma faixa de pH variando de 2,5 a 8,0. Para a determinação dos valores de pH ótimos para essas enzimas, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.4, exceto que os ensaios foram realizados em diferentes valores de pH, utilizando-se tampões citrato-fosfato (McILVAINE, 1921).

2.5.2 Efeito da temperatura

A influência da temperatura sobre a taxa de hidrólise das enzimas endoglicanases, celobiase e celulase total foram avaliadas. Para a determinação das temperaturas ótimas dessas enzimas, a mistura de reação e as condições de ensaio foram às mesmas descritas no item 2.4, exceto que os ensaios foram conduzidos em diferentes temperaturas, entre 20 e 80° C em pH 5,0.

2.5.3 Análise de termoestabilidade

Para determinação da termoestabilidade, os extratos enzimáticos foram pré-incubados em várias temperaturas (endoglicanases: 40, 45 e 50 °C, FPase: 45, 50 e 55 °C, celobiase: 45, 50 e 55 °C), em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A atividade residual foi determinada usando ensaio padrão como descrito no item 2.4. Os valores de meia-vida das celulases foram calculados a partir do ajuste de uma equação, utilizando-se o programa Sigma Plot[®], versão 9.0.

2.6 Sacarificação da celulose avicel

Para sacarificação da celulose, foram utilizados os extratos fúngicos produzidos por *Trichoderma* sp. T02, cultivado em bagaço (C011), *Trichoderma* sp. T02, cultivado em farelo de trigo (C012) e *Trichoderma* sp. T08, cultivado em bagaço (C013). Os extratos C011, C012 e C013 foram centrifugados 10.000 x g por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi concentrado em célula de ultrafiltração, utilizando-se uma membrana de exclusão de 10 kDa. Os extratos concentrados C011, C012 e C013 foram utilizados para o preparo dos coquetéis enzimáticos C014 (T2T + T02), C015 (T02 + T08), C016 (T2T + T08) e C017 (T02 + T2T + T08).

Os ensaios para hidrólise da celulose foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 0,5 g de substrato celulose Avicel, 5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, 1 mL cloridrato de tetraciclina 100µg/mL (para impedir contaminação por outros microrganismos), e volumes variando de 0,4 a 1,6 mL de extratos enzimáticos C011, C012 e C013 correspondentes a 2,5 FPU (unidades de papel de filtro); 1,25 e 0,83 FPU para as misturas binárias e ternária, respectivamente. O volume final das misturas de reação foi completado para 10 mL com água destilada. Os Erlenmeyers foram mantidos em Shaker, a 28 °C, sob agitação de 150 rpm, por 9 horas. Os controles dos experimentos foram realizados, como descrito, substituindo o extrato enzimático por água destilada. Em intervalos de 1,5 horas, alíquotas de 0,5 mL foram coletadas, submetidas à fervura por 5 min para paralisação da reação, resfriadas e centrifugadas a 10.000 x g/ 5 min, para remoção dos sólidos residuais. Os conteúdos de açúcar redutor e glicose formados foram determinados no sobrenadante. As velocidades de sacarificação foram mensuradas por meio da quantificação do açúcar redutor e glicose formadas por minuto. Para avaliar a eficiência dos extratos e das misturas enzimáticas em promover a sacarificação da celulose, todos os ensaios continham o mesmo valor de atividade de FPase, 5.0 FPU/g de celulose. Todos os ensaios foram conduzidos por nove horas, a 40°C e em pH 5.0.

2.7 Determinação de açúcar redutor e glicose

O ensaio para açúcar redutor foi conduzido a partir de uma mistura contendo 0,5 μL de meio reacional e 0,5 μL de DNS, homogeneizada em vórtex e fervida por 5 min. A quantificação do açúcar redutor foi realizada através de uma curva de calibração, construída com 0-2 μmoles de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1 g/L de glicose (MILLER, 1956). Para determinação do conteúdo de glicose, utilizou-se o método da glicose oxidase. Nessa etapa, na solução contendo 0,5 μL de mistura de reação, foi adicionado 0,5 mL do reativo de glicose oxidase. A mistura foi incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 15 min (BERGMEYER e BERNT, 1974). Os valores de absorbância foram tomados a 510 nm e convertidos em concentração de glicose, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 – 0,15 μmols de glicose.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de enzimas

Os isolados que produziram maiores atividades de celulases, C011, C012 e C013, foram usados para preparação das misturas enzimáticas e as atividades de celulase estão apresentadas na Tabela 1. O extrato C015 apresentou maior atividade de endoglucanase ($5,25 \text{ U.mL}^{-1}$) enquanto C013 a maior atividade de β -glucosidase ($4,10 \text{ U.mL}^{-1}$), o extrato C012 apresentou maior atividade de celobiase ($2,28 \text{ U.mL}^{-1}$).

Houve aumento significativo das atividades de endoglicanases pelo extrato C012, quando estas foram acrescidas de outros extratos com altas atividades dessa enzima. Essas respostas sugerem que a deficiência de atividades de endoglicanases tenha sido superada pelas altas atividades dessa enzima contida nas outras culturas isoladas.

Segundo Ortega et al. (2001), a ação sinérgica entre as endoglicanases e exoglucanases, durante a hidrólise da celulose, e formação de glicose pela celobiase deve ser contínua e simultânea, necessitando, assim, de um complexo enzimático mais estável, conseqüentemente mais eficiente.

Tabela 1 - Atividades enzimáticas dos extratos concentrados simples ou misturados de culturas de *Trichoderma* spp.

Cultura	Extrato	Atividade enzimática U.mL ⁻¹			
		β -glicosidase	Celobiase	Endoglicanase	FPase
T02	C011	2,15 ± 0,06	0,91 ± 0,03	4,14 ± 0,37	1,77 ± 0,31
T2T	C012	1,83 ± 0,17	2,28 ± 0,03	2,00 ± 0,04	1,16 ± 0,08
T08	C013	4,10 ± 0,02	1,17 ± 0,04	5,24 ± 0,19	1,80 ± 0,23
T2T + T02	C014	2,89 ± 0,18	1,51 ± 0,07	4,21 ± 0,07	1,86 ± 0,06
T02 + T08	C015	1,84 ± 0,20	1,04 ± 0,04	5,25 ± 0,12	1,78 ± 0,09
T2T + T08	C016	2,53 ± 0,09	1,44 ± 0,03	3,74 ± 0,14	2,00 ± 0,12
T02 + T2T + T08	C017	2,73 ± 0,04	1,39 ± 0,05	4,47 ± 0,31	1,52 ± 0,02

3.2 Caracterização enzimática

3.2.1 Efeito do pH sobre as atividades das enzimas celulases

As endoglucanases presentes nos extratos C011, C012 e C013, mostraram alta atividade na faixa de pH 3,5-5,5, mantendo acima de 80% de sua máxima atividade. Maior atividade de endoglucanase nesses extratos foi detectada em pH 4,5 (Figura 1A). O caráter ácido dessa enzima foi relatado por (BUSTO et al. 1996, DUTTA et al. 2008, GAO et al., 2008, e LEE et al. 2010).

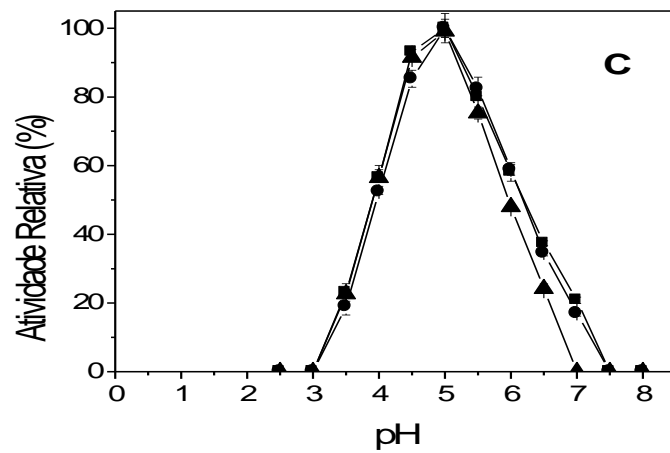
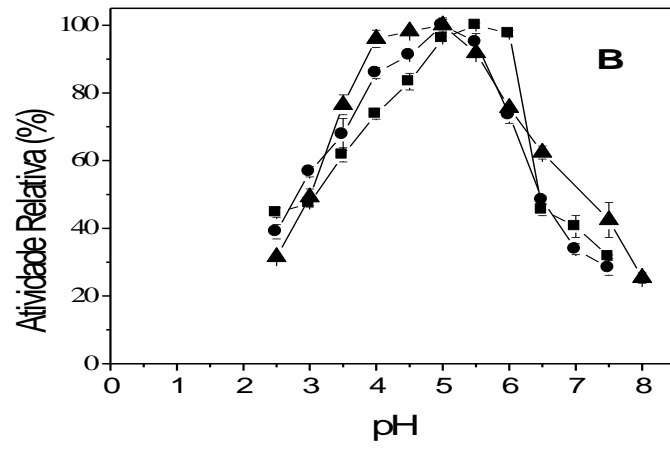
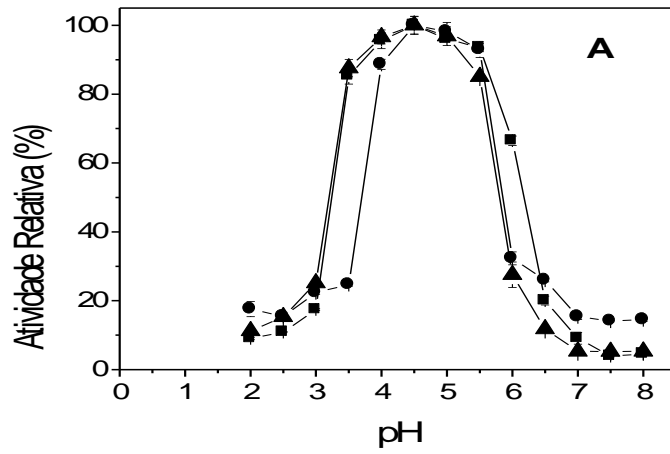


Figura 1 - Efeito do pH sobre as atividades de (A) endoglucanase (B) FPase (C) celobiose presentes nos extratos (■) C011 (●) C012 (▲) C013.

A máxima atividade de FPase na cultura C011 foi detectada em pH 5,5, enquanto os extratos C012 e C013 apresentaram máxima atividade em pH 5,0. O extrato C013 manteve 62% e de sua atividade máxima em uma faixa de pH 3,5-6,5 (Figura 1B). Resultados semelhantes foram observados para Fpases de *Penicillium* SP. (CASTELLANOS et al., 1995). Entretanto, estudos de DUTTA et al. (2008) mostram máxima atividade em pH 6,5 produzida por *Penicillium citrinum*. O fungo *Aspergillus niger* LTB produziu FPase com máxima atividade em pH 4,0 (RODRIGUES, 2009).

Grande parte das celobiasas fúngicas apresentam pH ótimos na faixa de 4,0 a 6,5 (BHATIA et al., 2002). As celobiasas produzidas pelos extratos C011, C012 e C013 apresentaram máximas atividades em pH 5,0. (Figura 1C). O caráter ácido das celobiasas produzidas por vários fungos foram descritos por outros autores (GAO et al., 2008; NG et al., 2010).

3.2.2 Efeito da temperatura sobre as atividades das enzimas celulases

Os efeitos da temperatura sobre a atividade das celulases foram analisados a partir de 20°C até 80°C. As endoglucanase presentes nos extratos C011, C012 e C013 mostraram atividades máximas em 55°C (Figure 2A). A máxima atividade de endoglucanase de *Trichoderma reesei* foi detectada a 60°C (BUSTO et al., 1996), enquanto endoglucanases produzidas por fungos do genero *Penicillium* mostraram atividades máximas de 60 a 70 °C (DUTTA et al., 2008; LEE et al., 2010) respectivamente.

As FPases presentes em C011, C012 e C013 exibiram máxima atividade a 40°C. O extrato C012 manteve acima de 50% de sua atividade máxima a 75 °C (Figura 2B). Nos trabalhos de Castellanos et al. (1995), a máxima atividade de FPase produzida por *Penicillium* sp. variou entre 50 e 55°C, enquanto Dutta et al. (2008) encontraram máxima atividade em 60 °C de FPase produzidas por *Penicillium citrinum*.

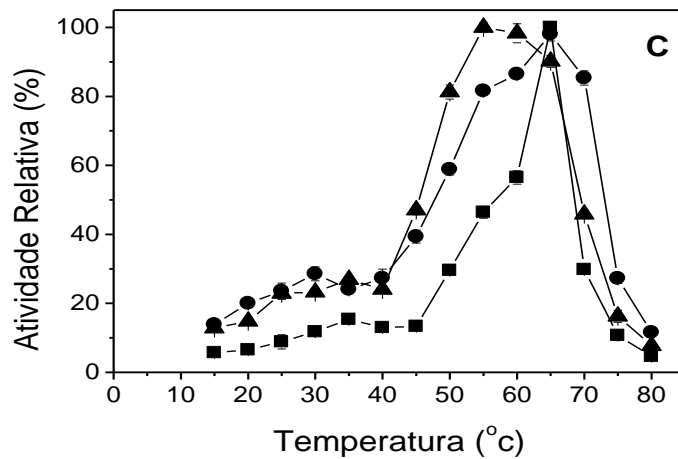
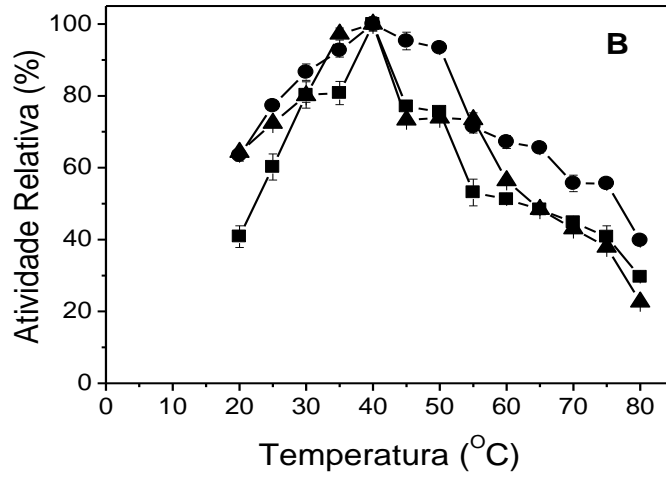
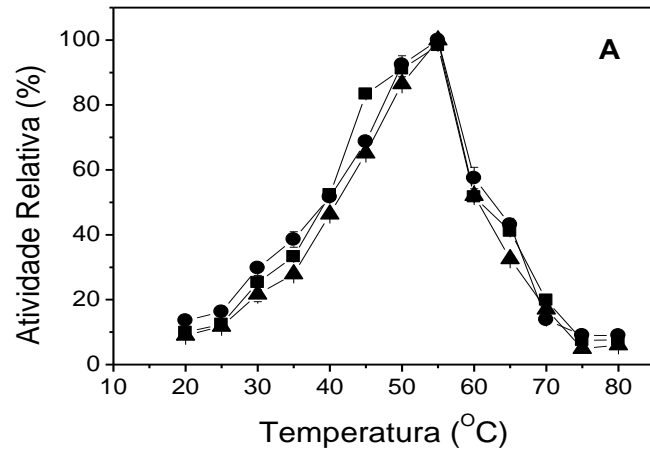


Figura 2 – Efeito da temperatura sobre as atividades de (A) endoglucanase (B) FPase (C) celobiase presentes nos extratos (■) C011 (●) C012 (▲) C013

Os extratos C011 e C012 apresentam celobiasas com máxima atividade a 65°C. No entanto, a 70°C, a celobiasa do extrato C011 manteve apenas 20% da sua atividade máxima, enquanto a celobiasa de C012 manteve acima de 75% de sua atividade nessa mesma temperatura. A temperatura ótima para atividade de celobiasa presente no extrato C013 foi 55°C (Figura 2C). Temperaturas ótimas para atividade de celobiasas fúngicas foram descritas entre 40 e 50 °C (BHATIA et al., 2002; KARNHANATAT et al., 2007).

Rodrigues (2009) verificou que celobiasa produzida por *Aspergillus niger* LTB apresentou maior atividade a 50°C, ao passo que Chen et al. (2010) por *Penicillium decumbens*; Ng et al. (2010) por *Penicillium citrinum* produziram celobiasa com máxima atividade a 70°C. Resultado adverso foi obtido por Ghorai et al. (2010), ao verificarem que a celobiasa produzida por *Termitomyces clypeatus* é totalmente inativa a 70°C e exibe sua atividade máxima na temperatura de 55 °C.

3.2.3 Estabilidade térmica de endoglicanase

As endoglucanases dos extratos C012 e C011 mantiveram, respectivamente, 70 e 50 % de sua atividade original, após pré-incubação por 6 horas a 40°C. A endoglicanase presente em C013 manteve mais de 50% de sua atividade após pré-incubação por 60 min a 40 °C (Figura 3A). A endoglucanase presente no extrato C012 apresentou meia vida de 216 min a 45°C, enquanto, as endoglucanases dos extratos C011 e C013 apresentaram valores de meia vida de 65 e 11 min, respectivamente (Figura 3B). A endoglicanase presente no extrato C012 manteve mais de 55% de sua atividade original após pré-incubação por 60 min a 50°C (Figura 3C). No entanto, no mesmo período, as enzimas presentes nos extratos C011 e C013 perderam totalmente suas atividades. Endoglucanase de *Penicillium citrinum* manteve 90% de sua atividade quando incubada por 2 horas a 50°C (MARQUES et al., 2003).

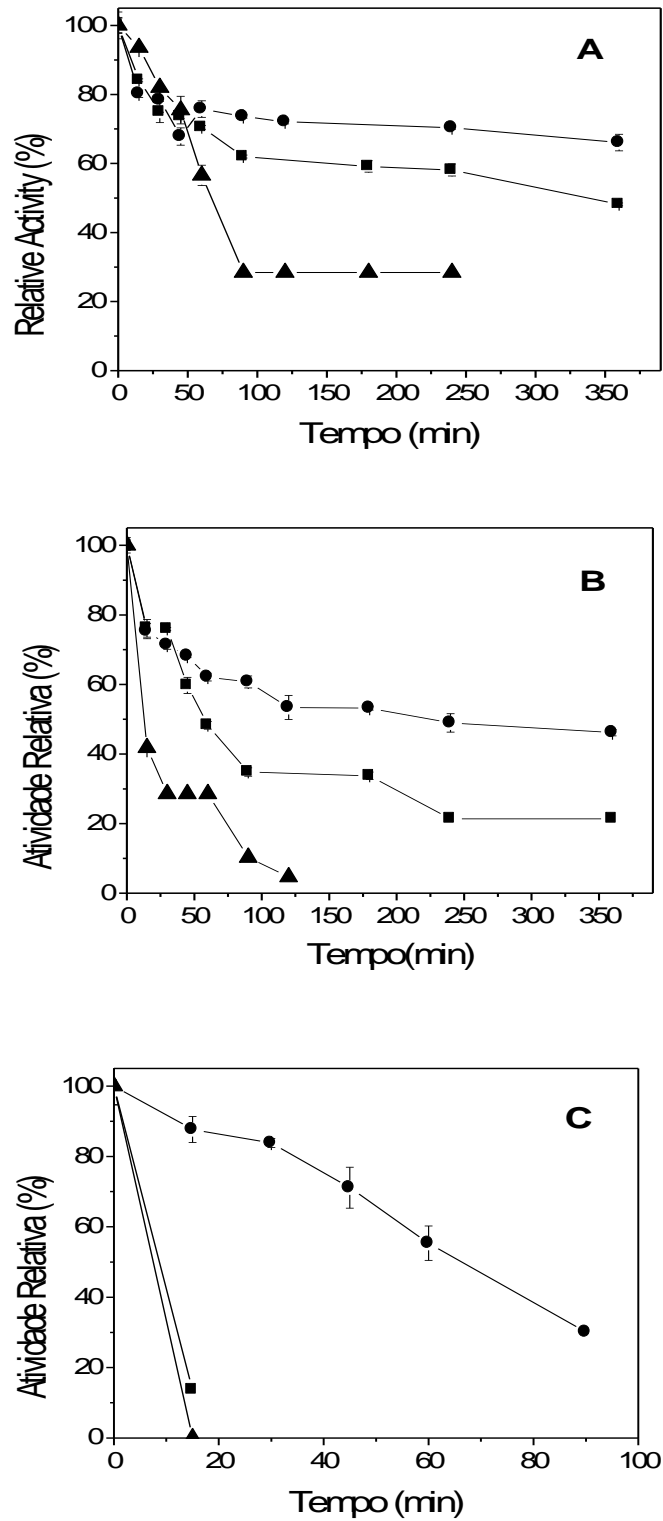


Figura 3 – Estabilidade térmica de endoglucanase nas temperaturas de (A) 40°C (B) 45°C (C) 50°C presentes nos extratos (■) C011 (●) C012 (▲) C013.

3.2.4 Estabilidade térmica sobre atividade de papel de filtro - FPase

As FPases presentes nos extratos C011, C012 e C013 mantiveram de 95 a 100% de atividade nos 15 min iniciais a 45 °C. Após 20 min, a FPase produzida por C011 e C012 mantiveram 64% de sua atividade em 1 hora, enquanto a cultura C013 manteve 53%. A 45 °C, a meia vida das FPases dos extratos C011, C012 e C013 foram de 100, 106 e 65 min, respectivamente (Figura 4A). Nas temperaturas de 50°C e 55 °C, em apenas 15 min, a FPase produzida por C013 perdeu totalmente a atividade e após 30 min o C011 também perdeu totalmente sua atividade, enquanto as atividades produzidas por C012 manteve 57% e 49% por 1 hora, respectivamente (Figuras 4B e 4C).

Trabalho realizado por Camassola et al. (2004) mostrou que as FPase produzidas por *Penicillium echinulatum* perderam 50% da atividade em 1 hora de incubação, nas temperaturas de 45, 50 e 55°C, e ocorreu perda mais acentuada a 60°C. No entanto, a 50°C, as FPase de *Penicillium citrinum* mantiveram atividades acima de 90% em uma hora de incubação (DUTTA et al., 2008).

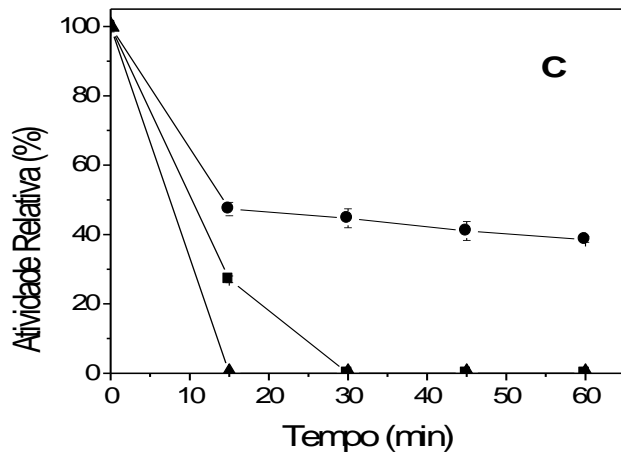
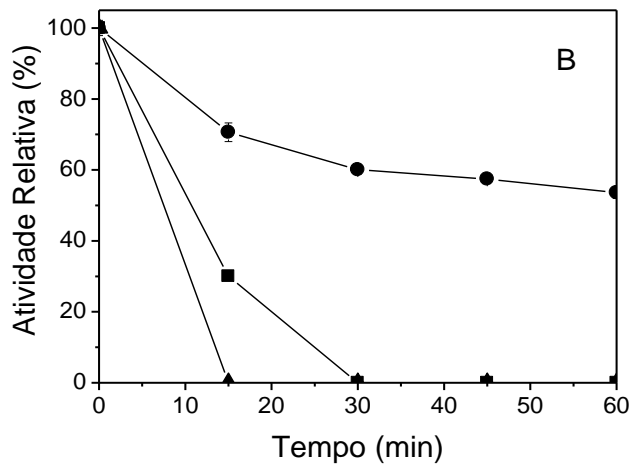
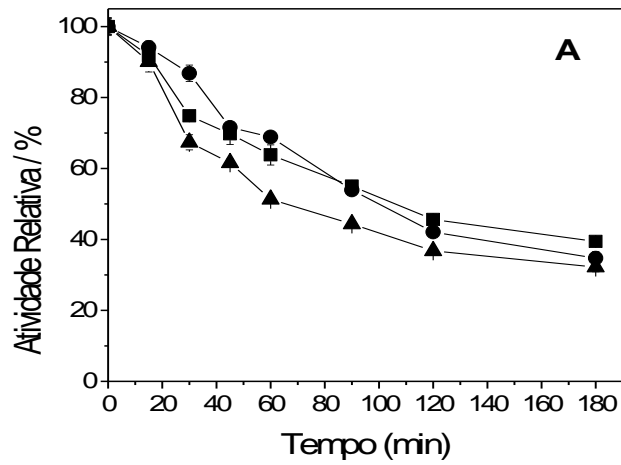


Figura 4 – Estabilidade térmica de Fpase nas temperaturas de (A) 45°C (B) 50°C (C) 55°C presentes nos extratos (■) C011 (●) C012 (▲) C013

3.2.5 Estabilidade térmica de celobiase

Na temperatura de 45°C, a celobiase presente no extrato C012 manteve mais de 90% de sua atividade original 2 horas, e perdeu apenas 38% da atividade após 4 horas de incubação. O valor da meia vida da celobiase presente no extrato C012 foi de 288 min enquanto para o extrato C011 de 192 min. A celobiase presente no extrato C013 perdeu totalmente sua atividade quando incubada por apenas 15 min a 45 °C (Figura 5A). Na temperatura de 50°C, C011 e C012 mantiveram 78% e 56% de sua atividade em uma hora (Figura 5B). A 55°C houve perda de 55% das atividades originais de celobiase produzidas por C011 e C012, (Figura 5C). A celobiase produzida pelo *Penicillium decumbens* manteve 96% de sua atividade após pre-incubação a 50°C por 12 horas (CHEN et al., 2010) enquanto que de celobiase produzida pelo *Penicillium citrinum* decresce rapidamente na temperatura de 60 °C em uma hora (NG et al., 2010).

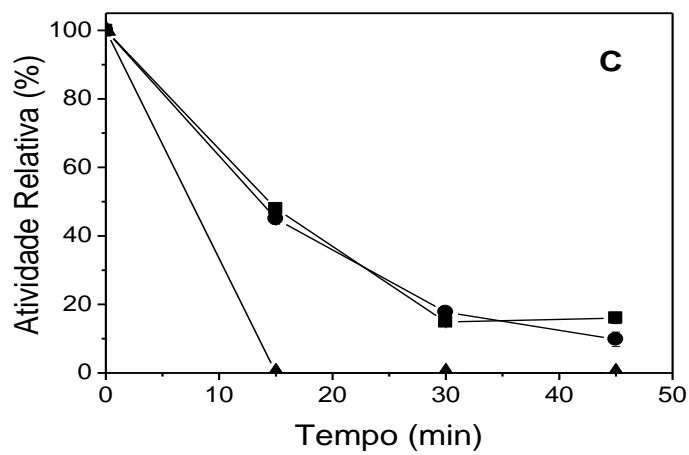
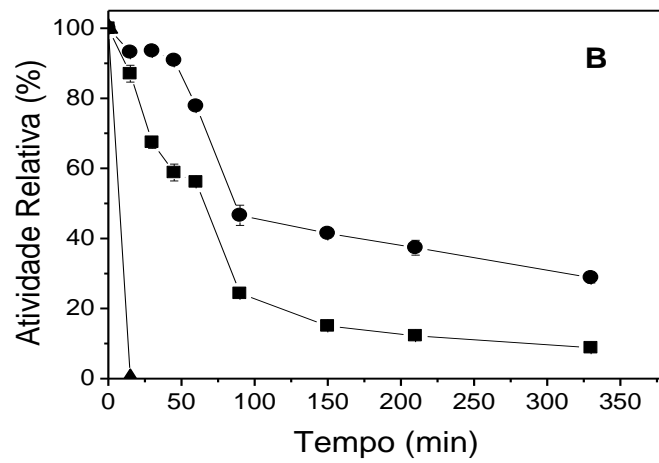
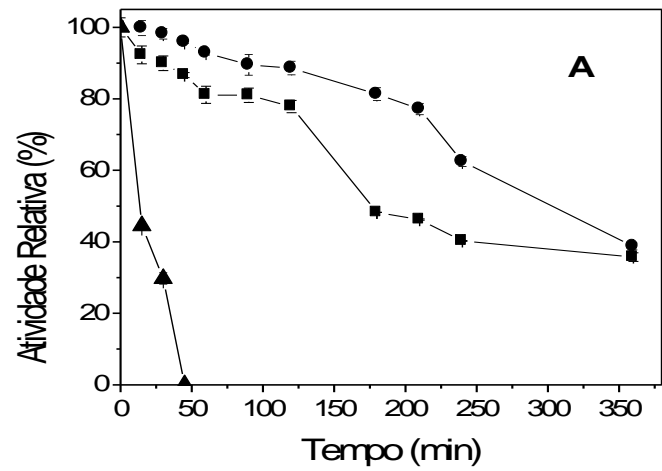


Figura 5 – Estabilidade térmica de celobiase nas temperaturas de (A) 45°C; (B) 50°C; e (C) 55°C presentes nos extratos (■) C011 (●) C012 (▲) C013.

3.3. Sacarificação da celulose avicel

3.3.1 Produção açúcar redutor por tempo de sacarificação

O complexo celulolítico do extrato C013 demonstrou maior eficiência na produção de açúcar redutor total a partir da sacarificação da celulose, 0,34 $\mu\text{mol}/\text{min}$, quando comparado às demais preparações (Tabela 2 e Figura 6). A menor velocidade de sacarificação foi 0,08 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de açúcar redutor produzido no ensaio catalisado pelo complexo do extrato C012. Esse resultado pode estar relacionado às baixas atividades de endoglucanase presentes no extrato C012 (Tabela 1). A alta atividade de celobiase presente no extrato C012 não foi suficiente para aumentar a produção de açúcar redutor, uma vez que a hidrólise da celulose requer a ação inicial das endoglucanases, predispondo esse novo substrato à ação das celobiasas. Provavelmente, as altas atividades de endoglucanases presentes no extrato C013 favoreceram o seu melhor desempenho durante a sacarificação.

Tabela 2 – Velocidade de produção de açúcar redutor e glicose a partir da sacarificação da celulose pelos sistemas enzimáticos das culturas de fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Extratos	Açúcar Redutor Total	Glicose
	Vo [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Vo [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
C011	0,24	0,23
C012	0,08	0,08
C013	0,34	0,24
C014	0,24	0,21
C015	0,32	0,24
C016	0,24	0,21
C017	0,26	0,25

Por outro lado, o extrato C017 apresentou uma velocidade três vezes maior, comparado ao extrato C012 (Tabela 2 Figura 6). O extrato C012 apresentou baixas atividades de endoglucanase, comparada a C011 e C013 (Tabela 1). Tal fato sugere que a adição de enzimas endoglucanase, dos extratos C011 e C013 ao extrato C012 suprimam a deficiência quanto à atividade dessas enzimas. Provavelmente, isso permitiu aumento do sinergismo enzimático, de forma a melhorar o desempenho durante a sacarificação da celulose.

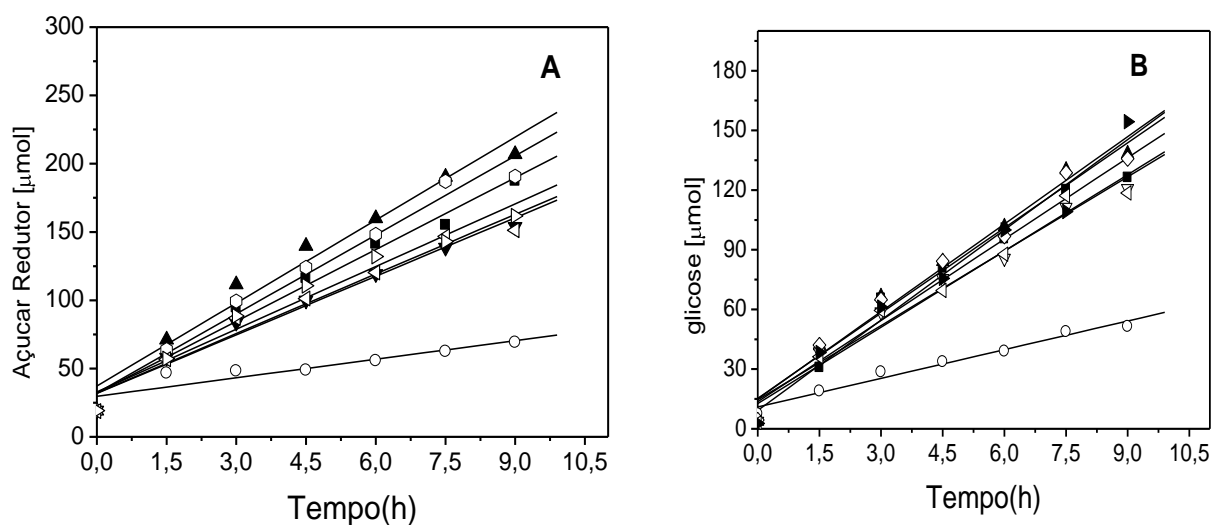


Figura 6 – Velocidade de produção de açúcar redutor (A) e glicose (B) a partir da sacarificação da celulose pelos sistemas enzimáticos (■) C011 (○)C012 (▲)C013(∇)C014 (◇)C015 (◁)C016(▴)C017.

3.3.2 Produção de glicose por tempo de sacarificação

Os extratos enzimáticos, simples ou combinados, foram empregados em um ensaio de sacarificação, utilizando celulose Avicel como substrato. A eficiência dos extratos foi avaliada pela mensuração das taxas de formação de glicose e açúcar redutor no meio reacional (Tabela 2 e Figura 6). Mesmo tendo

sido utilizada a mesma carga enzimática (5 FPU/g) em todos os ensaios, foi observado que as taxas de formação de glicose e açúcar redutor apresentaram variações indicando que os diferentes extratos e suas misturas possuem propriedades que alteram o processo de sacarificação da celulose.

Apesar de o extrato C012 conter a maior atividade celobiasica, as menores taxas de formação de produtos foram observadas no ensaio contendo somente este extrato enzimático. Tal fato pode ser justificado pela baixa atividade de endoglicanases presente no extrato C012 evidenciando o sinergismo dos grupos de celulasas no processo de conversão da celulose em glicose.

Os extratos C013, C015 mostraram desempenho semelhantes para a formação de glicose, sendo observada a taxa de $0,24 \text{ umol.min}^{-1}$, uma unidade menor comparado ao extrato C017. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de os extratos C013 e C015 possuírem alta atividade de endoglicanases, contrastando com as menores atividades de celobiasas (Tabela 1). Esse contraste pode ser o limitante para a formação do produto final, uma vez que as celobiasas estão envolvidas no último passo do processo de formação de glicose a partir de celulose.

3.5 CONCLUSÕES

- O extrato C013 apresentou altas atividades de β -glicosidase, endoglicanase, FPase e baixa atividade de celobiase. O extrato C012 apresentou a maior atividade de celobiase e as menores atividades para as outras celulases.
- Quanto às misturas, o extrato C014 destacou-se por apresentar altas atividades de celobiase e β -glicosidase. O C015 para atividade de endoglicanase, o extrato C016 para atividade de FPase.
- As endoglicanases, FPases e celobiases presentes nos extratos (C011, C012 e C013) mostraram altas atividades em pHs ácidos variando de 4,5 a 5,5 e temperaturas ótimas variando de 40°C a 65°C.
- O extrato C012 destacou-se por apresentar alta termoestabilidade para endoglicanase, FPase e celobiase, apresentando valores de meia vida a 45°C. 216 min, 106 min e 288 min, respectivamente.

- O extrato C013 apresentou maior velocidade produção de açúcar redutor total durante a sacarificação da celulose, com velocidade de 0,34 $\mu\text{mol}/\text{min}$. O extrato C012 foi o menos eficiente, 0,08 $\mu\text{mol}/\text{min}$.
- Os extratos C017 apresentou uma taxa de 0.25 u.mol.min^{-1} para a formação de glicose, cerca de 3 vezes maior comparado ao C012, não observando significativas diferenças em relação aos outros extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L., MENEZEZ, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus Níger* IZ9 usando fermentação submersa sobre o bagaço de cana de açúcar. **B.CEPPA**, v. 18, p. 57-70, 2000.

ADEMARK, P., VARGA, A., MEDVE, J., HARJUNPÄ, V., TORBJÖRN, D. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*. Purification and properties of a β -mannanase. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p.199-210, 1998.

ADSUL, M.G., GHULE. J.E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDW, K,B., GOKHALE, D.V., VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and cylanes production. **Carbohydrate polymers**, v. 56, p. 67-72, 2004.

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

BASARAN. P., OZCAN, M., Characterization of β -xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. **Bioresource Technology**, v.11, p 1- 6, 2007.

BHAT, K. M., MCCRAE, S. L., WOOD, T. The endo-(1-4)- β -D-glucanase system of *Penicillium pinophilium* cellulose isolation purification and characterization of live major endoglucanase components. **Carbohydrate Research**, v. 190, p. 219-297, 1989.

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

BHATIA, Y., MISTRA, S., BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidase: Cloning, properties and applications. **Crit Ver Bioechnol**, v. 22, p. 375- 407, 2002.

BERGMEYER, H. U., & BERNT, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie p. 1205–1215, 1974.

BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p.286–295, 1985.

BISARIA, A. R., MADAN, M., VASUDEVAN, P. Utilization of agroresidues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 5-8, 1997.

BISCHOFF, K.M., WICKLOW, D.T., JORDAN, D.B., DE REZENDE, S.T., HUGHES, S.R., RICH, J. O. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Curr. Microbiol.** v. 58, p. 499-503, 2009.

BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia. produção, aplicações e mercado** Rio de Janeiro, Editora Interciência LTDA, 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.

BUSTO, M. D., ORTEGA, N. M., PEREZ-MATEOS, M. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma Reesei* cultures **Bioresource Technology** v. 57, p. 187-192, 1996.

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

CAMASSOLA, M., BITTENCOURT, L.R., SHENEM, N. T., ANDREAUS, J. DILLON, A. J. P. Characterization of the *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 391-396, 2004.

CAMASSOLA, M., J. P., DILLON, A. J. P., Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial crops and products**, v. 29, p. 642-647, 2009.

CANILHA, L., MILAGRES, A. M. F., SILVA, S. S. ALMEIDA, J. B. FELIPE, M. G. A., ROCHA, G. J. M. FERRAZ, A., CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática:

uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, nº44, 2010.

CASTELLANOS, O. F., SINTITSYN, A. P., VLASENKO, E. Yu. Comparative Evaluations of hydrolytic toward Microcrystalline Cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* Celulases. **Bioresouce Technology**. v. 52. p. 119-124, 1995.

CARROLL, G. C., PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from comiferous foliage. **Mycologia**, v.75, p. 53-63, 1983.

CHANDRA, M., KALRA, A., SANGWAN, N. S., GAURAV, S. S., MAHENDER, P., DAROKAR, M. P., SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1659–1662, 2009.

CHEN, M., QINB, Y., LIUA, Z., LIUA, K., WANGC, W., YINBO QUA, Y. Isolation and characterization of α -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulose. **Supplementation Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 444- 449, 2010.

CONSIDINE, P. J., O’RORKE, A., HACKETT, T. J., COUGHLAN, M. P. Hydrolysis of beet pulp polysaccharides by extracts of solid state culture of *Penicillium capsulatum*. **Biotechnol. Bioeng**, v. 31, p.433-438, 1988.

D’ ALMEIDA: Celulose e Papel v. I, Instituto de Pesquisa Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo: Escola Senai 2^o ed. 1988.

DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 31, p. 249 - 260, 1997.

DE MARCO, J. L., VALADARES, M. C., FELIX, C. R., Production of Hydrolytic Enzyme By *Trichoderma* Isolates With antagonistic Activity Against *Crisnipellis Perniciosa*. The Causal Agent of Witches Broom of Cocoa. **Brasillian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33-39, 2003.

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Techonology**, v. 37, p. 373-385, 2005.

DIENES, D. Tretment of recycled fiber with trichoderma cellulases. **Industrial Crops and Products an International journal**. v. 20. p. 11- 21, 2003.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technolqy**, v. 55, p. 1-33, 1996.

DUTTA, T., SAHOO, R., SENGUPTA, R., RAY, S. S. BHATTACHARJEE A, GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p. 275–282, 2008.

FENGEL, D., WENEGER, G. “Wood chemistry, ultrastructure, reactions”. **Walter de Gruyter Publisher**. New York, 1989.

FERREIRA, H. M., FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 23–29, 2004.

FINELL, J., JOKELA, J., LEISOLA, M., RIEKKOLA, M. L. Total hydrolysis of xylofuranose and xylobiose by soluble and cross-linked crystalline xylanase II from *Trichoderma reesei*. **Biocatal. Biotransfor**, v 20, p.281-290, 2002.

GAO, J., WENG, H. ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GHORAI, S., CHOWDHURY, S., SWAGATA, P. S. A., SAMUDRA, P., BANIK, S. P., SUMANA, M. S., KHOWALA, S. Enhanced activity and stability of cellobiase (b-glucosidase: EC 3.2.1.21) produced in the presence of 2-deoxy-D-glucose from the fungus *Termitomyces clypeatus*, **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1015-1022, 2010.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GRIMM. L, H., KELLY, S., KRULL, R, HEMPEL, D. C. Morphology and production of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GUTIERREZ-CORREA, M., PORTAL. L., PATRICIA. M. P., ROBERT P. Tengerdy Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology** v. 68, 173-178, 1999.

GUTIERREZ-CORREA, M., TENGERTDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, G., LIDÉN, ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 12, 2006.

HAN, Y. W. Microbial Utilization of Straw (a review). **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 153-179, 1978.

HAN, Y., CHEN, H.Z. Synergism between corn stover protein and cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 638–645, 2007.

HEDAYATI, M. T., PASQUALATTO, A.C., WARN, P. A, BOWYER, P., DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HOWARD R. L. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 602-19, 2003.

IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulose species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17. p. 79-83, 2004.

JAVED, M. R., RASHID, M. H., RIAZ, M., PERVEEN, R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 157, p. 483-497. 2009.

JØRGENSEN, H. OLSSON L Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888- Effect of substrate on hydrolytic performance **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381–390, 2006.

JØRGENSEN, H., ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J. T., JERNELD, F., OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 851-861, 2003.

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

KANAMASA, S., MOCHIZULI, M., TAKADA, G., KAWAGUCHI, T., JUN-ICHI, SUMITANI, J., ARAI, M. Overexpression of *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase in *Aspergillus oryzae*. **Bioscience & Bioengineering**, v. 95, p. 627-629. 2003.

KANG, S.W., PARK, Y.S., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p.153–156, 2004.

KARNCHANATAT, A., PETSOM, A., SANGVANINCH, P., PIAPHUKIEW, J., WHALLEY, A.J., REYNOLDS, C.D., SIHANONTH, P. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta glucosidase from the wood-

decaying fungus *Daldinia eschscholzii*. **FEMS Microbiol Lett**, V. 270, P. 162-170, 2007.

KAUR. J., CHADHA. B.S., KUMAR. B.A., KAUR. G. S., SAINI, H.S. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. Electronic. **Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 260-270, 2007.

KUHAD, R.C., SINGH, A., ERIKSSON, K.E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**. v. 57, p. 45 –125, 1997.

KULKARNI, N., SHENDYE, A. , RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems Microbiology**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, R., SINGH, S., SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 35, p. 377-391, 2008.

LATIF, F., RAJOKA, M. I., MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 343-348, 1995.

LEE, I., EVANS, B. R., LANE, L. M. WOODWARD, Substrate enzyme interactions in cellulose systems. **Bioresource technology**, v. 58, p. 163-169, 1996.

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

LEE, K. M. JEYA, M. JOO, A. SINGH, R. KIM, I. LEE, J. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 46, p. 206-211, 2010.

LEMOS, J. L. S., PEREIRA, J. R. N. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 45, p.431-437, 2002.

LIMING, X., XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology** v. 91, p.259–262, 2004.

LIN, T., CHEN, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1103–1109, 2004.

LYND LR, WEIMER PJ, VAN ZYL WH, PRETORIUS IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 66, p. 506–577, 2002.

MARQUES, S., PALA, H., ALVES, L., AMARAL-COLLAC, M.T., GAMA, F. M., GÍRIO, F. M. Characterisation and application of glycanases secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office waste paper. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p 209-219, 2003.

McILVAINE, TC. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry**, v. 49, p.183-186, 1921.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v. 31, p. 426-428, 1956.

NG, I.S., LI, C. W., CHAN, S. P., CHIR, J. L., CHEN, P. T., TONG, C. T., YU, S. M., HO, T. H. D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310-1317, 2010.

NG, T.B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

OLIVEIRA, L. A., PORTO, A. L. F., TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes **Bioresource Technology**, v. 97, p. 862-867, 2005.

ORTEGA, N., BUSTO, M. D., PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 7-14, 2001.

OLSSON, L., TOVE, M. I. E., CHRISTENSEN, K. P. PALMQVIST, H. E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 612–619, 2003.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. **Bioresour Technol**, v. 74, p.69-80, 2000.

PETRINI, O., STONE, J., CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p.789-796, 1992.

QINNGHE, C., XIAOYU, Y., TIANGUI, N., CHENG, J., QIUGANG, M. Thescreening of culture condition and properties of xylanase by White-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochem**, v. 39, p.1561-1566, 2004.

RAMOS, L.P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulose materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassa para produção de bioetanol**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 95p (Dissertação de M.S.), 2009.

ROWEL, M.R., Pettersen, R., Han, J.S., Rowell, J.S., Tshabalala, M.A. Handbook of wood chemistry and wood composites. Chapter 3: **Cell wall chemistry**. CRC Press. 487 p, 2005.

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

SCOTT, P.M. Other mycotoxins in mycotoxins in food, detection and control. Cambridge, England: **Woodhead Publishing**. p. 406-440. 2004.

SHALLOM, D., SAHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p.219–228, 2003.

SHANKAR, S.K., MULIMANI V.H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology** v.98, p.958-961, 2007.

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

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

SIQUEIRA, F. G, SIQUEIRA, E. G. S., E. G., JARAMILLO, P. M. D., D., SILVEIRA, M. H. L., ANDREAS, J., COUTO. F. A., BATISTA, L. R., FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of halocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20–26, 2010.

SJOSTROM, E. "Wood Chemistry-Fundamentals and Applications". Orlando **Academic Press**, New York, p. 69-79, 1981.

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 17, p.39-67, 1997.

SZENDEFY, J., SZAKACS, G., CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.1354–1360, 2006.

TAN, R. X., ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

TAYLOR, E. J., SMITH, N. L., TURKENBURG, J. P., D'SOUZA, S., GILBERT, H. J., & DAVIES, G. J. Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Ara f 51, from *Clostridium thermocellum*. **Biochemical Journal**, v. 395, p. 31-37, 2006.

TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, C. R., DA SILVA, R., TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, p.722-725, 1998.

UNITED NATIONS Kyoto Protocol, 1998. Disponível em: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>. Acesso em: Dez. de 2008.

WANG, L., RIDGWAY, D., GU, T., Moo-young, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p 115-129, 2005.

WEN, Z., LIAO, W., CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 491-499, 2005.

WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

ZANDONÁ, F. A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 193 p (Tese D.S), 2001.

ZHANG, Y. H. P., LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 88, 797-824, 2004.

ZHANG. P. H.Y., HIMMEL. M.E., MIELENZ. J. R. Outlook for cellulase improvement Screening and selection strategies. **Biotechnolog Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.