



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Talaromyces almentokiae* CMIAT 055 COM USO DE
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COMO INDUTORES**

FORTALEZA

2017

GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Talaromyces almostokiae* CMIAT 055 COM USO DE
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COMO INDUTORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.

Coorientadores: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto e Dra. Kally Alves de Sousa.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F144p Faheina Junior, Genilton da Silva.
Produção de celulases por *Talaromyces allestokiae* CMIAT 055 com uso de materiais lignocelulósicos como indutores / Genilton da Silva Faheina Junior. – 2017.
128 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.
Coorientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.
1. celulases. 2. fungos filamentosos. 3. biomassa vegetal. 4. fermentação submersa. I. Título.
- CDD 660
-

GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Talaromyces almentokiae* CMIAT 055 COM USO DE
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COMO INDUTORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 09/10/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Coorientador)
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA-CNPAT)

Profa. Dra. Andrea Cardoso de Aquino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Edy de Sousa Brito
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA-CNPAT)

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UEVA)

A Deus.

Aos meus pais, avós, irmãs, tios e tias, sobrinhos,
amigos e animais que estão ou passaram na minha
vida.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, pela oportunidade de obter o título de Doutor em Engenharia Química.

À Capes, pela concessão da bolsa durante os quatro anos de formação.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por permitir o desenvolvimento de todos os experimentos nos laboratórios desta unidade.

Aos pesquisadores Dr. Jerri Edson Zilli e Carlos Vergara Torres Junior, da Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ, Brasil), pelo auxílio na identificação taxonômica do microrganismo utilizado nos estudos.

Agradeço a Deus, meu criador e provedor de tudo, criador das celulasas e provedor da inteligência humana.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar, que me forneceu valiosos ensinamentos que ultrapassaram todos os limites da área acadêmica. Obrigado pela paciência, organização e por acreditar na minha capacidade até o fim.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto por ter confiado no meu trabalho durante mais de dez anos. Por todo os ensinamentos, pela dedicação, sugestões e incentivo fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Kally Alves de Sousa, pela dedicação, incentivo e profissionalismo e, principalmente, amizade construída.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram participar da avaliação do meu trabalho.

Àquele que perseverou sempre por minha educação e, com muita garra e honra, sempre lutou pela melhor formação dos filhos, netos e bisnetos. Àquele que, mesmo sem formação superior, foi meu maior exemplo de Doutor nessa vida. Ao Pai Tunino (*in memoriam*) dedico esta tese, que me ensinou com bravura que devemos ser perseverantes em tudo.

Àqueles que sempre acreditaram na minha capacidade, que sempre me deram apoio, me encorajaram, àqueles que eu amo muito, meus pais Genilton e Rita; Geovana, Juliana,

Luquinha, Bia, Ígor, Miguel, Selma, Daniel e Mãe Penha. A todos os meus familiares que torcem por mim.

Aos meus grandes amigos, que costumo chamá-los de irmãos, tamanho é o meu bem-querer por esse povo: Bruno Sampaio, Bruno Olirow, Celso Canholi, Diego Paiva, Eduardo Gomes, Fátima Linhares, Samara Linhares, Felipe Sousa, Ferreira Junior, Marcelo Linhares, Natália Lima, Natália Moura, Jane Batista, Jamille Coelho, Kally Alves, Marcela Portela. Obrigado por tanta torcida!

A todos os companheiros do antigo Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical: Adriana, Andréa, Ana Paula, Carol, Carina, Cívita, Cintya, Hélder, Ídila, Janaína, Natália Lima, Natália Moura, Rakel, Renata e Virna. Muito obrigado por tanta torcida e pelos momentos de descontração.

Não posso deixar de agradecer à Deus por permitir que “seres humaninhos” de quatro patas participassem da minha tese. E como eles participaram! Me oferecendo toda doçura e companheirismo durante a escrita da minha tese. Lolla, Nymeria, Bento, Difuso e Maiê. Obrigado pelo calorzinho nas minhas pernas e pelo carinho com a língua!

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na concretização do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

E, por fim, vou agradecer a mim mesmo. Genilton, meu querido, você é Doutor! Soube usar, com garra, disposição e persistência, a inteligência divina que foi oferecida a você.

“O novo não está no que é dito, mas no acontecimento de sua volta.”

Michel Foucault

RESUMO

As celulasas são um complexo de enzimas necessárias para a completa solubilização de celulose em açúcares, desempenhando assim um papel primordial no ciclo natural do carbono através da hidrólise das estruturas lignocelulósicas. Além de suas aplicações na indústria farmacêutica, as celulasas também são utilizadas na indústria têxtil, na alimentação animal e humana; na indústria de celulose; assim como na produção de etanol. No entanto, o custo da preparação enzimática é um grande impedimento na sua comercialização e uso em diferentes processos industriais. Para amenizar o custo que as celulasas agregam ao processo de bioconversão, as estratégias tem se concentrado em estudos que compõem todas as etapas de produção do complexo enzimático, como seleção de microrganismos hiperprodutores e substituição de componentes do meio de cultura por materiais lignocelulósicos de alto valor agregado. Logo, este estudo de tese teve como objetivo avaliar a produção de celulasas, através de microrganismo isolado do bioma amazônico, utilizando diferentes materiais lignocelulósicos como indutores da síntese da enzima em fermentação submersa. Dentre as estratégias realizadas para alcançar o objetivo principal: seleção e uso de materiais lignocelulósicos (bagaço de caju, farelo de milho, sabugo de milho e pseudocaule da bananeira); estudo das condições de pH inicial e temperatura da fermentação submersa; seleção dos componentes do meio de cultura e otimização através de delineamento experimental estatístico; estudo do controle do pH em biorreatores; estudo do sistema de agitação através da comparação de impelidores com diferentes perfis de fluxo no meio líquido; e estudo da estabilidade da enzima. A linhagem CMIAT 055 destacou-se estatisticamente das demais, com atividade de FPase 17,5 % menor do que a atividade expressa por *Trichoderma reesei* sp. RUT C30, utilizada como controle positivo. Esta amostra foi identificada, através de técnicas moleculares, como *Talaromyces almentokiae* e logo foi submetida a seguidas fermentações para obtenção dos seguintes parâmetros: pH inicial 5,0; temperatura de cultivo a 30°C; inóculo cultivado em farelo de trigo; e meio de produção de celulasas com pseudocaule da bananeira como indutor. Após verificar que maiores concentrações da biomassa induziram a síntese das enzimas, o meio de cultura foi submetido a dois planejamentos experimentais (Plackett-Burman e DCCR), no qual apenas três componentes do meio de cultura foram significativos e otimizados para maior síntese de FPase e CMCase. Nos testes em biorreatores, tais parâmetros foram benéficos para maiores atividades da enzima: manutenção do pH em 5,0; uso do impelidor *Pitched blade* e velocidade de rotação a 300 rpm. Realizando um comparativo entre o primeiro teste com uso de pseudocaule da bananeira em frasco Erlenmeyer, ao ultimo processo fermentativo em biorreatores, foi observado que a atividade de celulasas totais aumentou de 424,7 FPU/L para 2172,8 FPU/L. Tal fato mostrou que as estratégias adotadas neste estudo são um caminho pertinente para diminuir o custo de produção da enzima através do uso de materiais lignocelulósicos.

Palavras-chave: celulasas, *Talaromyces almentokiae*, materiais lignocelulósicos, fermentação submersa.

ABSTRACT

Cellulases are a complex of enzymes for a complete solubilization of cellulose into sugars, thus playing a primordial role into natural carbon cycle through the hydrolysis of lignocellulosic structures. In addition to its applications in the pharmaceutical industry, cellulases are also used in the textile industry, animal and human diet; in the pulp industry; as well as in the production of ethanol. However, the cost of the enzyme preparation is a major impediment in its commercialization and use in different industrial processes. To mitigate the cost that cellulases add to the bioconversion process, strategies have focused on studies that compose all stages of production of the enzymatic complex, such as selection of hyperproducers microorganisms and replacement of components of culture medium by high added-value lignocellulosic materials. The objective of this thesis was to evaluate the production of cellulases through a microorganism isolated from the Amazonian biome, using pseudostem of the banana tree as inducer of the enzyme in submerged fermentation. Among the strategies carried out to reach the main objective are: selection and use of lignocellulosic materials (cashew bagasse, corn flour, corn ear and banana tree pseudostem); study of the initial pH and temperature conditions of the submerged fermentation; optimization of the culture medium components through statistical experimental design; study of pH control in bioreactors; study of the agitation system by comparing impellers with different flow profiles in the liquid medium; and study the stability of the enzyme. The strain CMIAT 055 was statistically out of the others, with FPase activity 17.5% lower than the activity expressed by *Trichoderma reesei* RUT C30, used as positive control. Molecular techniques identified this sample such as *Talaromyces almestokiae* and was then submitted to continuous fermentations to obtain the following parameters: initial pH 5.0; culture temperature at 30 ° C; inoculum grown on wheat bran; and cellulase production medium with banana tree pseudostem as an inducer. After checking that large concentrations of plant biomass induced the synthesis of the enzymes, the culture medium was submitted to two experimental designs (Plackett-Burman and DCCR), in which only three components of the culture medium were significant and optimized for the large synthesis of FPase and CMCase. In the bioreactor tests, these parameters were beneficial for higher enzyme activities: maintaining the pH at 5.0; use of the Pitched blade impeller and rotating speed at 300 rpm. Comparing the first test with the use of pseudostem of the banana tree in Erlenmeyer flask, to the last fermentation process in bioreactors, it was observed that the activity of total cellulases increased from 424.7 FPU/L to 2172.8 FPU/L. This fact shows that the strategies adopted in this study are a relevant way to reduce the production cost of the enzyme through the use of lignocellulosic materials.

Keywords: celulases, *Talaromyces amestolkiae*, lignocellulosic materials, submerged fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo dos componentes da biomassa vegetal.....	4
Figura 2 – Ação das três enzimas do complexo celulolítico na celulose.....	11
Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo fermentativo em frascos Erlenmeyer e agitador orbital.....	24
Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo fermentativo em biorreator.....	25
Figura 5 – Aspectos dos substratos lignocelulósicos após secagem.....	26
Figura 6 – Biorreator marca New Bruswick modelo Bioflo/Celligen 310.....	44
Figura 7 – Esquema e fotografia dos impelidores Rushton e Pitched blade, assim como dos respectivos perfis de fluxo radial ou axial.....	47
Figura 8 – Imagens da macromorfologia (frente e verso) de colônias da linhagem CMIAT 055 cultivada durante 7 dias.....	56
Figura 9 – Imagens da micromorfologia de colônias da linhagem CMIAT 055 cultivada durante 7 dias. Com e sem pigmentação das colônias.....	57
Figura 10 – Dendograma baseado na análise <i>Neighbour – joining</i> derivado das sequências das regiões ITS.....	63
Figura 11 – Dendograma baseado na análise <i>Neighbour – joining</i> derivado da β -tubulina. 63	
Figura 12 – Filogenia <i>Neighbour – joining</i> a partir de genes concatenados ITS + β -tubulina.....	64
Figura 13 – Perfil de propagação de esporos fúngicos de <i>T. reesei</i> RUT C30 e <i>T. amestolkiae</i> cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos.....	70
Figura 14 – Perfil de produção de FPase e CMCase em diferentes condições de pH inicial do processo fermentativo.....	79
Figura 15 – Perfil de produção de FPase e CMCase em diferentes condições de temperatura do processo fermentativo.....	81
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para a produção de FPase.....	86

Figura 17 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para a produção de CMC _{ase} ..	88
Figura 18 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de PB e ureia, com CaCl ₂ .2H ₂ O e KH ₂ PO ₄ fixados em 2,4 e 6,0 g/L, respectivamente.....	93
Figura 19 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de CaCl ₂ .2H ₂ O e KH ₂ PO ₄ , PB e ureia fixados em 40,0 e 2,4 g/L, respectivamente.....	94
Figura 20 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de CaCl ₂ .2H ₂ O e ureia, PB e KH ₂ PO ₄ fixados em 40,0 e 6,0 g/L, respectivamente.....	95
Figura 21 – Perfil de atividade de FPase, CMC _{ase} , produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação sem e com controle de pH.....	98
Figura 22 – Perfil do pH no processo fermentativo em biorreator.....	99
Figura 23 – Perfil de atividade de FPase, CMC _{ase} , produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação nos dois tipos de impelidores: Rushton e <i>Pitched blade</i>	102
Figura 24 – Perfil de atividade de FPase, CMC _{ase} , produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação com velocidade de rotação 150 e 300 rpm.....	105
Figura 25 – Perfil de estabilidade da enzima frente a diferentes valores de pH e temperatura.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	□ Grupos microbianos e gêneros representativos produtores de celulases.....	12
Tabela 2	□ Produção de enzimas celulolíticas por variadas espécies de <i>Talaromyces</i> em diferentes substratos.....	16
Tabela 3	□ Isolamento de fungos do gênero <i>Talaromyces</i> reportados na literatura científica.....	17
Tabela 4	□ Uso de variados materiais lignocelulósicos utilizados na produção de celulases.....	21
Tabela 5	□ Perfil de produção de celulases na presença de diferentes fontes de carbono.	38
Tabela 6	□ Valores codificados para as variáveis estudadas no planejamento Plackett – Burman.....	40
Tabela 7	□ Fatores e respectivos níveis do delineamento Plackett – Burmann.....	40
Tabela 8	□ Matriz experimental com valores codificados para as variáveis estudadas no planejamento DCCR.....	42
Tabela 9	□ Fatores e respectivos níveis utilizados no delineamento DCCR.....	42
Tabela 10	□ Perfil de FPase na seleção de linhagens fúngicas.....	52
Tabela 11	□ Perfil de CMC _{case} na seleção de linhagens fúngicas.....	53
Tabela 12	□ Visão geral das características macromorfológicas para identificação de CMIAT 055.....	59
Tabela 13	□ Visão geral das características micromorfológicas para identificação de CMIAT 055.....	59
Tabela 14	□ Comparação de algumas características de CMIAT 055 com <i>T. amestolkiae</i> isolada por Nguyen; Paul; Lee (2016).....	61
Tabela 15	□ Atividade de FPase com uso de biomassa lignocelulósica no pré-inóculo de <i>T. amestolkiae</i>	66
Tabela 16	□ Composição centesimal de bagaço de caju, farelo de trigo e sabugo de milho baseado em dados da literatura.....	68

Tabela 17	□ Atividade de FPase com uso de biomassa lignocelulósica no pré-inóculo de <i>T. reesei</i> RUT C30.....	69
Tabela 18	□ Atividades enzimáticas com uso de biomassa lignocelulósica no meio de produção de celulases.....	72
Tabela 19	□ Caracterização do pseudocaulo da bananeira <i>in natura</i>	74
Tabela 20	□ Valores de referência da literatura científica para caracterização do pseudocaulo da bananeira.....	75
Tabela 21	□ Atividade de FPase e CMCCase com uso de biomassa lignocelulósica tratada no meio de produção de celulases.....	76
Tabela 22	□ Caracterização do pseudocaulo da bananeira <i>in natura</i> e após tratamento ácido-base.....	76
Tabela 23	□ Perfil enzimático em diferentes concentrações de PB <i>in natura</i> em meio líquido.....	82
Tabela 24	□ Matriz do DPB com os valores codificados e reais para as variáveis independentes e respostas FPase e CMCCase.....	84
Tabela 25	□ Estimativa dos efeitos do DPB para atividade de FPase.....	85
Tabela 26	□ Estimativa dos efeitos do DPB para atividade de CMCCase.....	87
Tabela 27	□ Matriz do DCCR com os valores codificados e reais para as variáveis independentes e as respostas FPase e CMCCase.....	90
Tabela 28	□ ANOVA do DCCR para a resposta FPase e CMCCase.....	92
Tabela 29	□ Comparação entre as máximas atividades enzimáticas dos testes realizados em biorreator.....	107
Tabela 30	□ Estimativa de custo do meio de cultura utilizado no ultimo processo fermentativo, com uso de pseudocaulo da bananeira.....	109
Tabela 31	□ Estimativa de custo do meio de cultura utilizado no primeiro processo fermentativo, com uso de celulose microcristalina.....	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Biomassa lignocelulósica.....	3
2.2	Componentes do material lignocelulósico.....	4
2.3	Degradação do material lignocelulósico.....	6
2.4	Celulases.....	7
2.4.1	<i>Potenciais aplicações de celulases.....</i>	8
<i>2.4.1.1</i>	<i>Geração de combustíveis.....</i>	<i>8</i>
<i>2.4.1.2</i>	<i>Indústria têxtil.....</i>	<i>9</i>
<i>2.4.1.3</i>	<i>Indústria de celulose e papel.....</i>	<i>9</i>
<i>2.4.1.4</i>	<i>Indústria alimentícia e ração animal.....</i>	<i>9</i>
2.4.2	<i>Classificação e mecanismo de ação.....</i>	10
2.4.3	<i>Produção de celulases.....</i>	11
<i>2.4.3.1</i>	<i>Microrganismos produtores de celulases.....</i>	<i>11</i>
<i>2.4.3.2</i>	<i>Fungos produtores de celulases.....</i>	<i>12</i>
<i>2.4.3.3</i>	<i>Celulases produzidas por fungos do gênero Talaromyces.....</i>	<i>15</i>
<i>2.4.3.4</i>	<i>Produção de celulases por fermentação submersa.....</i>	<i>18</i>
<i>2.4.3.5</i>	<i>Meio de cultura para produção de celulases.....</i>	<i>20</i>
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Material lignocelulósico.....	26
<i>4.1.1</i>	<i>Preparo do material lignocelulósico.....</i>	<i>26</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Pré-tratamento do material lignocelulósico.....</i>	<i>26</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Caracterização do material lignocelulósico.....</i>	<i>27</i>
<i>4.1.3.1</i>	<i>Preparo das amostras.....</i>	<i>28</i>

4.1.3.2	<i>Determinação do teor de umidade (TU)</i>	28
4.1.3.3	<i>Determinação de cinzas (TC)</i>	28
4.1.3.4	<i>Determinação do teor de extrativos (TE)</i>	28
4.1.3.5	<i>Determinação de lignina</i>	29
4.1.3.6	<i>Determinação de holocelulose</i>	30
4.1.3.7	<i>Determinação de alfacelulose e hemicelulose</i>	31
4.2	Seleção de microrganismos e técnicas de manutenção	32
4.3	Propagação de esporos fúngicos	32
4.3.1	<i>Obtenção de esporos em meio BDA</i>	32
4.3.2	<i>Obtenção de esporos em materiais lignocelulósicos</i>	33
4.3.2.1	<i>Preparo do material</i>	33
4.3.2.2	<i>Crescimento do microrganismo nos materiais lignocelulósicos</i>	33
4.4	Escolha da linhagem fúngica	33
4.5	Identificação do microrganismo	34
4.5.1	<i>Identificação cultural e morfológica</i>	34
4.5.2	<i>Identificação molecular</i>	35
4.5.2.1	<i>Extração do DNA, reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento</i> ...	35
4.5.2.2	<i>Análise dos dados</i>	36
4.6	Estudo de diferentes materiais lignocelulósicos no cultivo do inóculo	36
4.7	Utilização de materiais lignocelulósicos como indutores na produção de celulasas	37
4.8	Estudo do pH inicial e temperatura do processo fermentativo	38
4.9	Diferentes concentrações de pseudocaule da bananeira no meio líquido	39
4.10	Otimização do meio de cultura líquido através de planejamento estatístico	39
4.10.1	<i>Seleção de variáveis do meio de cultura por Plackett-Burman</i>	39
4.10.2	<i>Delineamento composto central rotacional (DCCR)</i>	41
4.11	Testes em biorreator	44
4.11.1	<i>Controle de pH</i>	45

4.11.2	<i>Comparação entre dois diferentes tipos de impulsores</i>	45
4.12	Avaliação da influência da temperatura e pH na estabilidade da enzima	47
4.13	Determinações Analíticas	48
4.13.1	<i>Teor de Açúcares Redutores Totais</i>	48
4.13.2	<i>Determinação de celulases totais em papel de filtro (FPase)</i>	49
4.13.3	<i>Determinação de endo -β-1,4 glucanases (CMCase)</i>	50
4.13.4	<i>Determinação do conteúdo de celulose</i>	51
4.13.5	<i>Determinação da biomassa seca</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Seleção dos microrganismos	51
5.2	Taxonomia da linhagem fúngica CMIAT 055	55
5.3.	Uso de materiais lignocelulósicos nas etapas do processo fermentativo submerso	66
5.3.1	<i>Avaliação do uso de material lignocelulósico no preparo do inóculo</i>	66
5.3.2	<i>Utilização de material lignocelulósico como substituto da celulose pura na produção de celulases</i>	72
5.3.3	<i>Produção de celulases em diferentes perfis de pH inicial e temperatura no processo fermentativo submerso</i>	78
5.3.3.1	<i>Estudo do pH inicial do meio de cultura em frascos Erlenmeyer</i>	78
5.3.3.2	<i>Estudo da temperatura inicial de produção de celulases</i>	80
5.3.3.3	<i>Diferentes concentrações de pseudocaule da bananeira no meio líquido</i>	82
5.3.4	Otimização da composição do meio de cultura através de Planejamento Estatístico: Delineamento Plackett-Burman (DPB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	83
5.3.4.1.	<i>Seleção de variáveis por Delineamento Plackett-Burman (DPB)</i>	83
5.3.4.2	<i>Otimização do meio de cultura através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)</i>	89

5.3.5	<i>Produção de celulasas em biorreator</i>	96
5.3.5.1	<i>Controle de pH do processo fermentativo</i>	96
5.3.5.2	<i>Comparação do uso de diferentes impulsores</i>	101
5.3.4	<i>Avaliação da estabilidade enzimática frente a diferentes pH e temperatura</i>	107
5.3.5.	<i>Estimativa dos custos do meio de cultura para produção de celulasas por T. amestolkiae CMIAT 055</i>	109
6	CONCLUSÃO	110
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	110
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE	125

1. INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas capazes de quebrar a celulose através da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1-4 presentes no polímero, resultando em monômeros de glicose (HASUNUMA et al., 2013). São consideradas como a terceira enzima que mais movimentam o mercado de enzimas devido à variedade de aplicações, tais como: processamento de papel e celulose; indústria de detergente; indústria têxtil; e processamento de alimentos, como preparo de sucos e vinhos (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; SHARMA; OBEROI; DHILLON, 2016; SUKUMARAN et al., 2009). Além das inúmeras aplicações de celulases nos processos industriais supracitados, a conversão de biomassa vegetal para produção de etanol, com intenso uso de celulases, é considerada uma alternativa promissora e relevante, que tem desencadeado uma intensificação de estudos sobre a temática (SINGHANIA et al., 2010).

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de fontes microbianas, presentes nos grupos das bactérias e fungos. No entanto, os fungos filamentosos destacam-se dos demais microrganismos devido apresentarem maior eficiência na degradação de materiais lignocelulósicos, além de produzirem maiores quantidades de enzimas celulases (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011; SHARMA et al., 2016).

A capacidade destes microrganismos de sintetizarem a enzima reside na eficiência da decomposição de materiais lignocelulósicos, no qual desempenham um importante papel no meio ambiente estabelecendo um elo chave no ciclo de carbono. As linhagens mais estudadas e utilizadas na indústria para produção de enzimas celulolíticas são as dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). No entanto, há limitações de atividade enzimática no complexo da enzima produzido por esses gêneros, como eficiência em estreitas faixas de pH e temperatura (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). Logo, o enorme potencial que as celulases tem demonstrado nos mais variados processos biotecnológicos, é a motivação para as contínuas pesquisas básicas e aplicadas acerca destas enzimas.

A maioria dos microrganismos secreta as celulases para o meio externo da célula devido, principalmente, à incapacidade desses microrganismos de transportar materiais insolúveis, como a celulose, o que caracteriza as celulases como enzimas extracelulares (BEHERA et al., 2017; DO NASCIMENTO; COELHO, 2011). Os materiais vegetais

possuem quantidades significativas de celulose que porventura podem ser utilizadas como fontes alternativas de carbono para os mais variados processos. Apesar da larga disponibilidade no meio ambiente ou como resíduo agroindustrial, a celulose constitui-se como um polímero difícil de ser quebrado (JUTURU; WU, 2014).

Portanto, a conversão enzimática, com uso de celulasas, da biomassa vegetal em açúcares caracteriza-se como um processo de menor impacto ambiental. Outra vantagem do uso de hidrólise enzimática deve-se ao fato de que, neste processo, utilizam-se condições operacionais mais brandas, se comparada à hidrólise química, além do que não tende a formar subprodutos indesejáveis (JUTURU; WU, 2014).

Além do uso das celulasas nos processos de produção de combustível, estas enzimas também auxiliam na geração de uma variedade de produtos de alto valor agregado, oriundos da quebra da biomassa, como: ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas. Assim como frações de polissacarídeos podem ser gerados a partir de biomassa microbiana desenvolvida com auxílio de açúcares gerados a partir da quebra da biomassa, processo no qual as enzimas celulolíticas tem papel importante (SÁNCHEZ, 2009). Estes exemplos reforçam a importância das pesquisas acerca dos processos que envolvem a produção de celulasas.

Apesar de todos os benefícios oferecidos pelo uso de celulasas, o elevado custo das enzimas celulolíticas ainda é um grande obstáculo para os mais variados processos. Logo, se faz necessário sintetizar as enzimas a um custo o mais baixo possível, uma vez que essa etapa é primordial na conversão enzimática da biomassa a etanol (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Portanto, dentre algumas estratégias que podem ser adotadas para diminuir o custo de enzimas celulolíticas, estão: seleção intensiva de novas fontes microbianas produtoras de celulasas mais estáveis e com maior produtividade; substituição de componentes do meio de cultura por materiais lignocelulósicos disponíveis na natureza ou como resíduos agroindustriais; estudos acurados sobre a configuração do reator e condições de fermentação.

Assim sendo, a presente tese de doutorado possui como ponto de partida a seleção de novas fontes microbianas, produtoras de celulasas, assim como investigações acerca da utilização de materiais lignocelulósicos e otimização do meio de cultura, objetivando diminuir custos no processo de produção de celulasas.

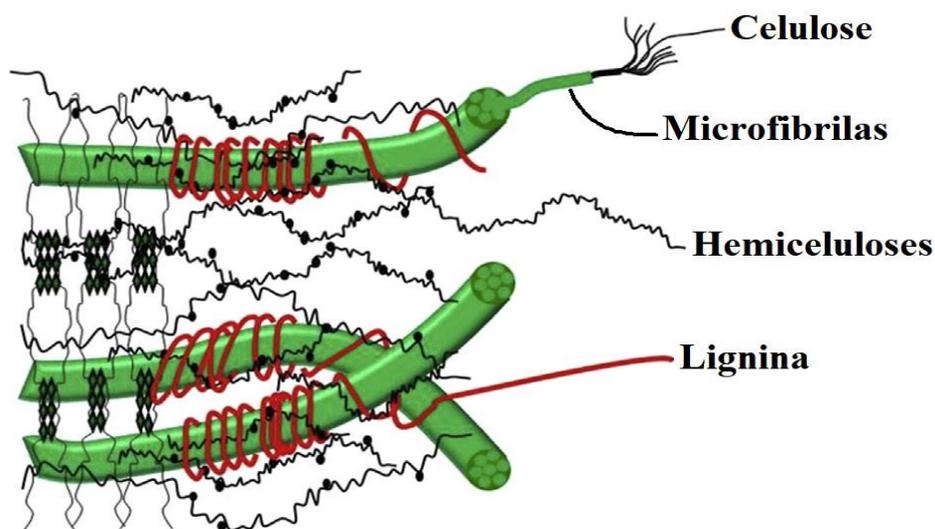
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, considerada a quarta maior fonte de energia do mundo, caracteriza-se como uma abundante e renovável matéria-prima utilizada para a produção sustentável de combustíveis e outros produtos químicos a baixos custos (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; JUTURU; WU, 2014). A biomassa pode ser definida como qualquer matéria orgânica, seja de origem vegetal ou animal, que possui disponibilidade para ser fracionada de forma a liberar energia ou fornecer açúcares no processo final. Industrialmente, o grande interesse na biomassa lignocelulósica como matéria prima deve-se ao seu elevado conteúdo de açúcares fermentescíveis procedentes das frações de celulose e hemicelulose. Estes açúcares, por sua vez, possuem emprego potencial na produção de combustíveis de segunda geração (BEHERA et al., 2017; BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

A rigidez da estrutura dos materiais lignocelulósicos deve-se, primariamente, à composição polimérica da biomassa vegetal. Esses polímeros constituem a estrutura da compacta parede celular de células vegetais e a quebra desta estrutura é dificultada devido à sua rigidez. Os resíduos agroindustriais são compostos de celulose, hemicelulose, lignina e pectina. São também designados como materiais lignocelulósicos e são potenciais materiais para produção de enzimas de importância industrial. Logo, nos materiais lignocelulósicos estes três componentes estão intrinsicamente ligados para dar forma à complexa estrutura da biomassa vegetal (DHILLON, 2016). A celulose, as hemiceluloses e a lignina, os principais componentes que formam a biomassa vegetal, estão expostos de forma didática no esquema da Figura 1.

Figura 1 - Esquema representativo dos componentes da biomassa vegetal



Fonte: Adaptado de Dhillon (2016)

2.2. Componentes do material lignocelulósico

A celulose é o material orgânico mais abundante no planeta, assim como também é o principal componente da parede celular vegetal, contribuindo com cerca de 20 a 40% na composição da parede celular primária. Estruturalmente, trata-se de um homopolissacarídeo linear formado por unidades de D-glicose unidas através de ligações do tipo β -1,4 glicosídicas e com um grau de polimerização variando de 2000 a 25000. Este polissacarídeo é formado por microfibrilas, que são polímeros não ramificados constituídos por em torno de 15000 unidades de glicose anidra. A composição é baseada em uma estrutura heterogênea composta de uma região amorfa, assim como contém regiões cristalinas bem ordenadas. Logo, o grau de cristalinidade depende da fonte do material celulósico e esta característica é o que confere maior resistência das regiões cristalinas à hidrólise enzimática (DHILLON, 2016; HASUNUMA et al., 2013; KUHAD et al., 2016).

A cadeia de celulose possui uma estrutura plana estabilizada por ligações de hidrogênio entre os variados grupos hidroxila em uma mesma cadeia (intramoleculares), ou entre as cadeias adjacentes (intermoleculares), e isto deve-se à falta de ramificações. Tal estrutura, em que as cadeias são unidas fortemente por pontes de hidrogênio, contribui para a rigidez da parede celular de vegetais. A partir da quantidade de pontes de hidrogênio presentes entre as moléculas de celulose, é formado um modelo cristalino, que configura-se como uma região com maior quantidade de pontes de Hidrogênio que, por sua vez,

confere uma maior organização das moléculas. Este perfil cristalino é o que torna a celulose insolúvel na maioria dos solventes e dificulta que a fração celulósica seja clivada por enzimas (HASUNUMA et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Estas regiões cristalinas são separadas por zonas amorfas, o segundo modelo estrutural, que estão presentes em menor quantidade, em torno de 20% da composição da celulose. Caracterizam-se como regiões menos ordenadas e compactas, assim como possuem maior capacidade de dissolução em água. Esta característica fornece maior flexibilidade à celulose, logo esta região é susceptível à degradação enzimática. A complexa cadeia de celulose encontra-se de forma ordenada através de filamentos, que por sua vez formam as fibrilas elementares, microfibrilas e macrofibrilas, que se relacionam através de interações não covalentes com as frações de hemiceluloses e lignina (BEHERA et al., 2017; HASUNUMA et al., 2013; KUHAD et al., 2016).

As hemiceluloses são moléculas de heteropolissacarídeos, que caracterizam-se como complexos formados principalmente por unidades de pentose (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-glicose, β -D-galactose e β -D-manose) e ácidos urônicos (β -D-glucorônico e α -D-galacturônico). Diferente da celulose, as hemiceluloses possuem uma estrutura ramificada, com cadeias laterais curtas formadas por variados açúcares, o que confere a natureza amorfa e facilita sua degradação. A função principal deste material consiste em conectar a lignina e as fibras de celulose, dando maior rigidez a rede celulose-hemicelulose-lignina. A lignina e a hemicelulose se mantem unidas de maneira predominante através de ligações tipo éter ou éster, enquanto a união com a celulose acontece através de pontes de hidrogênio.

A lignina é o componente mais complexo e caracteriza-se como um polímero fenólico heterogêneo, insolúvel, ramificado e altamente resistente a degradação química e biológica, constituindo uma rede hidrofóbica que se liga firmemente à celulose. Juntamente com as hemiceluloses, a lignina cria uma matriz amorfa onde estão ligadas as fibras de celulose, atuando como um material que une as células circunvizinhas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Logo, para muitas aplicações industriais, baseadas no uso específico das frações de celulose e hemicelulose, a presença da lignina torna-se indesejável, havendo então a necessidade de acrescentar etapas de eliminação deste componente.

2.3. Degradação do material lignocelulósico

A degradação da biomassa lignocelulósica é o passo principal para o reaproveitamento do material vegetal em subprodutos. No entanto, devido ao caráter recalcitrante dos componentes da parede celular, somente alguns microrganismos são capazes de realizar a degradação da biomassa. Dentre estes microrganismos, os fungos filamentosos são conhecidamente os mais capazes de degradar materiais lignocelulósicos. E, dentro desta classe microbiana, os basidiomicetos constituem o grupo com maior potencial de degradação (AYENI; DARAMOLA, 2017; SÁNCHEZ, 2009).

Os gêneros de fungos filamentosos capazes de quebrar o material vegetal são variados e estes podem ser classificados quanto à forma de degradação da biomassa. Um grupo de fungos possuem a habilidade de quebrar primeiramente a lignina, o componente mais recalcitrante da parede celular. Este grupo é conhecido como fungos de podridão branca, que possuem a habilidade de degradar completamente a lignina em água e CO₂. O outro grupo de fungos filamentosos é designado como fungo de podridão marrom, que despolimerizam diretamente o material celulósico enquanto modificam a fração de lignina (DHILLON, 2016; LEÃES et al., 2016).

A habilidade dos fungos filamentosos em degradar os componentes da biomassa vegetal de forma eficiente está associada à conformação e crescimento dos micélios fúngicos em torno da superfície do material vegetal. A degradação pelo fungo ocorre de forma exocelular, ou seja, as enzimas degradativas são excretadas e atuam no meio externo da célula microbiana. Logo, os fungos sintetizam dois tipos de enzimas lignocelulolíticas extracelulares: sistema hidrolítico, a partir do qual estão presentes as hidrolases, responsáveis pela degradação da celulose e hemicelulose; e um sistema oxidativo de degradação da lignina (AYENI; DARAMOLA, 2017; DHILLON, 2016).

A estrutura do material lignocelulósico muda de acordo com o decorrer do processo de hidrólise enzimática. Em um primeiro momento, as regiões amorfas são atacadas, uma vez que estas estão mais acessíveis e, conseqüentemente, são mais fáceis de serem hidrolisados na estrutura do material vegetal. De acordo com Ogeda e Petri (2010), a dificuldade na quebra do material lignocelulósico reside, principalmente, na presença da estrutura de lignina, que tende a adsorver as enzimas celulolíticas e dificulta o acesso destas enzimas ao material celulósico. Esta barreira também envolve a fração de hemiceluloses envolta da celulose. Logo, devido à tais barreiras físicas, faz-se necessário

realizar um tratamento de tal modo que auxilie na redução da cristalinidade do material e, conseqüentemente, aumenta exposição da celulose à ação das enzimas celulolíticas.

Este pré-tratamento da biomassa deve, primariamente, facilitar a obtenção de açúcares livres liberados durante a clivagem enzimática. Esta etapa também deve evitar a perda de carboidratos, assim como deve ser executada de forma a evitar que haja a formação de produtos de inibição das enzimas hidrolíticas, como o furfural. Dentre os tratamentos mais triviais está a hidrólise ácida, que auxilia na solubilização das frações de hemicelulose, facilitando o acesso ao material celulósico. No entanto, o uso de processos enzimáticos, frente aos processos químicos, representa uma tecnologia com maiores chances de redução de custos e danos ambientais na síntese de variados metabólitos e na produção de etanol a partir de biomassa. O uso de celulases na hidrólise do material celulósico ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH quando comparado aos processos químicos, assim como, possui elevada especificidade ao substrato (ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016; DHILLON, 2016).

2.4. Celulases

Celulases são enzimas glicosil hidrolases que auxiliam na hidrólise de ligações do tipo β -1,4 glicosídicas, presentes na matriz celulósica, gerando como produtos primários glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. A produção desta classe de enzimas encontra-se, principalmente, através de sistemas microbianos em fungos e bactérias, e são induzidas quando estes microrganismos se desenvolvem em meio de cultura com materiais celulósicos. É o grupo de enzimas mais estudado, composto de: endoglucanases; exoglucanases, que são compostas pelas celobio-hidrolases tipo I e II e glucano-hidrolases; e β -glicosidases. Estas enzimas em conjunto apresentam especificidade por ligações β -1,4 e apresentam sinergismo na atuação.

De acordo com Kuhad et al. (2016), as celulases tem sido comercializadas desde os anos 70, e o potencial uso biotecnológico destas enzimas tem se aplicado em diversos setores: indústria de alimentos, preparo de ração animal, agricultura, indústria de papel, indústria têxtil, agricultura e refino de biomassa.

No entanto, a eficiência da aplicação destas enzimas na conversão da matriz celulósica depende de diversas propriedades, como estabilidade, possíveis inibições

devido aos produtos gerados, especificidade, sinergismo entre as três enzimas do complexo celulolítico, assim como composição do material vegetal a ser quebrado. Portanto, o eficiente uso de material celulósico como uma fonte renovável depende da aplicação de tecnologias economicamente viáveis para produção de celulases.

De fato, as celulases são enzimas ainda com valor comercial elevado e uma redução significativa no preço torna-se necessária para redução de custo nos mais variados processos, como na produção de etanol. O elevado preço das celulases é uma das principais barreiras para comercialização de combustível produzido a partir da biomassa lignocelulósica (ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016; PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Conforme relatado por Liu; Zhang; Bao (2016), há dados na literatura que reforçam que o incremento de custo das celulases na produção de etanol de segunda geração ainda gira em torno de, em dólares, 0,69 a 1,47/ galão de etanol.

2.4.1. Potenciais aplicações de celulases

2.4.1.1. Geração de combustíveis

O setor energético baseado em combustíveis fósseis está enfrentando cada vez mais incertezas em todo o mundo e isto resulta em uma necessidade crescente por fontes de energia alternativa, como a biomassa vegetal. Logo, a ideia de obter açúcares livres de material vegetal e converte-los em biocombustível, proposta desde os anos 1970, é considerada como umas das principais estratégias para substituir os combustíveis líquidos a base de petróleo. Ultimamente, fatores como elevados preços do petróleo, inconstância na disponibilidade de combustível fóssil e preocupações relacionadas ao meio ambiente, tem feito ressurgir cada vez mais o desenvolvimento de energias alternativas sustentáveis que porventura possam minimizar a grande dependência do petróleo (HASUNUMA et al., 2013; KUHAD et al., 2016).

Neste contexto, a produção de etanol a partir de matérias primas renováveis, como a biomassa lignocelulósica, é destaque nas pesquisas que envolvem a descoberta de novas fontes de energia. De acordo com Kuhad et al. (2016), há cerca de $5,4 \times 10^2$ milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos oriundos da agroindústria de cereais, por exemplo, são produzidos anualmente a partir desta indústria e porventura poderiam ficar disponíveis para geração de bioetanol.

No âmbito nacional, destaca-se o bagaço de cana como fonte de material celulósico, no qual o país destaca-se como maior produtor deste vegetal no mundo, em torno de 40% do mercado mundial. Em 2013, foram gerados em torno de 743 milhões de toneladas, com perspectiva para o consumo do bagaço, em torno de 26 milhões de toneladas em 2050, como matéria-prima nas biorrefinarias (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

2.4.1.2. Indústria têxtil

As celulasas podem utilizadas na indústria têxtil em substituição à técnicas mais rudimentares de finalização, com uso de pedras pome e de tecidos de origem vegetal. São empregadas no processo designado como *stoning*, utilizado na suavização e aspecto desbotado em calças do tipo jeans, por exemplo. São utilizadas também no acabamento de roupas, na digestão de extremidades de fibras sobressalentes, assim como são empregadas como amaciantes e no auxílio da coloração dos tecidos (SHARMA et al., 2016; SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

2.4.1.3. Indústria de celulose e papel

Na indústria de polpa e papel, em conjunto com a aplicação de hemicelulasas, as celulasas são empregadas na alteração da textura de papel de celulose, com a finalidade de obtenção dos mais variados produtos, como: papel higiênico e toalhas de papel. Também são utilizadas na modificação da polpa de celulose grosseira, desincrustação de fibras recicladas e remoção de corantes (SHARMA et al., 2016).

2.4.1.4. Indústria alimentícia e ração animal

Na indústria de alimentos, as enzimas celulolíticas são empregadas em etapas de extração e clarificação de sucos, produção de néctar, assim como na extração de sementes oleaginosas. Outras aplicações: produção de cerveja, no preparo do malte; produção de vinhos, como auxílio na maceração enzimática de uvas; e, por fim, extração de carotenoides (SINGHANIA et al., 2010).

O uso de enzimas celulolíticas no processamento de ração animal melhora de forma significativa a conversão e digestibilidade de alimentos baseados em materiais lignocelulósicos, como cereais por exemplo. Estudos também apontam que as celulasas utilizadas para facilitar a digestão da alimentação de animais ruminantes, auxiliam na melhor qualidade do leite produzido (SHARMA et al., 2016).

2.4.2. *Classificação e mecanismo de ação*

Assim como todas as enzimas, as glicosil hidrolases possuem um código de classificação E.C. (*Enzyme Commission*), determinado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular. De acordo com esta classificação, direcionada de acordo com as reações catalisadas por cada enzima, as celulasas estão classificadas de acordo com o código 3.2.1.x (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011; HASUNUMA et al., 2013).

A hidrólise enzimática da matriz celulósica insolúvel em monômeros de açúcares requer a ação de um conjunto de atividades enzimáticas, que atuam em sinergia. Todas estas enzimas hidrolisam ligações do tipo 1,4- β -glicosídicas presentes na matriz de celulose, no entanto diferem-se quanto à especificidade baseada nas características macroscópicas do substrato. Uma vez que atuam em sinergismo, são consideradas enzimas progressivas, visto que interagem com uma única cadeia de polissacarídeo ao mesmo tempo (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011).

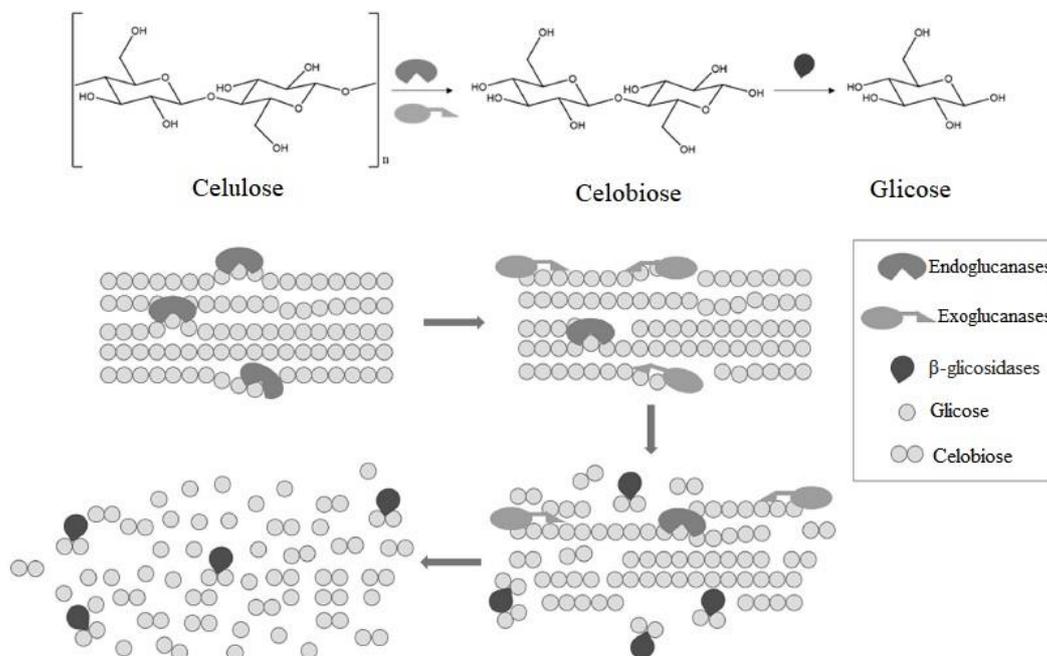
Pelo menos três enzimas principais, membros da família das glicosidohidrolases, que atuam hidrolisando oligossacarídeos e polissacarídeos, atuam na quebra da celulose (HASUNUMA et al., 2013; KUHAD et al., 2016):

- a) endoglucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glicanohidrolase (E.C. 3.3.1.4): atuam nas regiões amorfas e de forma randômica nas regiões internas das cadeias de celulose, ocasionando mudanças no grau de polimerização. Produzem celoligossacarídeos.
- b) Exoglucanases (1,4- β -D-glucana-glicanohidrolase, E.C. 3.2.1.74; e 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase, E.C. 3.2.1.91): atuam expondo os finais redutores e não redutores das cadeias de celulose. Na quebra, liberam celobiose.
- c) Celobiasas (β -glicosídeo glico-hidrolases, EC 3.2.1.21) hidrolisam as moléculas de celobiose nas ligações glicosídicas β -1,4 e pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose

A Figura 2 mostra a ação das três enzimas, que atuam de forma sinérgica, no qual há a soma das atividades enzimáticas individuais. Conforme abordado anteriormente, a celulose é formada por regiões amorfas, assim como há zonas com elevado grau de cristalinidade. Logo, faz-se necessária a ação das três enzimas, cada uma agindo em diferentes frações da celulose, para a quebra do material em

monômeros de açúcares. A sinergia deve-se ao fato de que a ação de cada enzima libera o produto susceptível a ser quebrado pela enzima subsequente (OGEDA; PETRI, 2010; QUEIROZ; AWAN; TASIC, 2016).

Figura 2 - Ação das três enzimas do complexo celulolítico na celulose.



Fonte: adaptado de Queiroz; Awan; Tasic (2016)

Existem pelo menos três formas de sinergia:

- Endo-exo: as endoglucanases ligam-se nas regiões amorfas e ocorre liberação dos terminais redutores e não redutores. Consequentemente, as celobiohidrolases (CBH) do tipo I e do tipo II atuarão nos substratos liberados.
- Sinergia ExG-ExG: as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases.
- Sinergia ExG-BG e EnG-BG: as celobio-hidrolases atuam liberando oligossacarídeos, substrato da β -glucosidase.

2.4.3. Produção de celulases

2.4.3.1. Microrganismos produtores de celulases

Sistemas celulolíticos completos são derivados de uma variedade de microrganismos que incluem as bactérias e os fungos. Dentre estes grupos, há uma grande variedade de gêneros e espécies envolvidos na produção de celulases, incluindo

bactérias aeróbicas e anaeróbicas, assim como fungos filamentosos. Assim como também há relatos de produção e isolamento da enzima a partir de animais ruminantes, como porcos (YANG et al., 2014). Alguns gêneros de microrganismos celulolíticos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos microbianos e gêneros representativos produtores de celulasas.

Grupos microbianos	Gêneros	Referências
Actinobactérias	<i>Streptomyces sp.</i>	Ventorino et al. (2016)
	<i>Thermomonospora sp.</i>	Kongruang et al. (2003)
Bactérias	<i>Bacillus sp.</i>	Shajahan et al. (2016)
	<i>Glucanobacter sp.</i>	Yao; Hou; Bao (2017)
	<i>Klebsiella sp.</i>	Behera et al. (2017)
Fungos	<i>Aspergillus sp.</i>	Ilberguer; Pottkämper; Streit (2013)
	<i>Fusarium sp.</i>	Yuan et al. (2012)
	<i>Penicillium sp.</i>	Costa et al. (2016)
	<i>Trichoderma sp.</i>	De Sousa et al.(2016)

Fonte: elaborada pelo autor.

2.4.3.2. Fungos produtores de celulasas

A capacidade de desenvolvimento de um microrganismo em seu habitat natural depende, principalmente, da capacidade de captação, como fonte de carbono e energia dos carboidratos presentes na parede celular vegetal. Por sua vez, este uso da fração polissacarídica do material lignocelulósico depende da maquinaria enzimática sintetizada pelos microrganismos. Portanto, o material vegetal torna-se uma matéria prima importante como indutora para a produção de enzimas do complexo celulolítico. Neste contexto, os fungos filamentosos, em comparação às outras classes microbianas, constituem-se como os microrganismos que predominantemente degradam o material lignocelulósico com maior eficiência, além de produzirem maiores quantidades de enzimas celulasas (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011; SHARMA et al., 2016).

Tal fato deve-se à capacidade de produzir enzimas extracelulares em maiores quantidades, além destas possuírem, no geral, maior potencial catalítico (RAGHUWANSHI et al., 2014). Segundo (KUHAD et al., 2016), em torno de catorze mil espécies de fungos produtores de celulasas já foram isolados desde o princípio das pesquisas sobre celulasas. E, dentre esses isolados, as investigações sobre a produção da enzima por fungos filamentosos concentram-se, principalmente, nos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Um dos fungos mais estudados na conversão de celulose em glicose é o *Trichoderma reesei*. A linhagem vem sendo estudada desde a década de 50, quando o pesquisador Elwin Reese publicou trabalhos com o fungo *Trichoderma viride* que posteriormente foi renomeado para *Trichoderma reesei*, em homenagem ao pesquisador. A linhagem selvagem, *T. reesei* QM6a originalmente isolada por Elwin Reese vem sendo modificada geneticamente no decorrer dos anos, afim de desenvolver a obtenção de cepas com elevada capacidade de produção e excreção das enzimas do complexo celulolítico. As pesquisas mais recentes acerca da produção de celulases geralmente utilizam as cepas de *T. reesei* modificadas: QM9414, RUTC30 e MCG77 (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Os tipos selvagens e mutantes de *Trichoderma sp.* (*T. viride*, *T. reesei* e *T. longibrachiatum*) tem sido considerados como os mais potentes e produtivos na degradação de celulose cristalina. Os dois tipos de celobiohidrolases (CBHI e CBH II) são as principais enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei*, correspondendo, respectivamente a produção de 60% e 20% das proteínas totais sintetizadas pela linhagem (GUSAKOV et al., 2005).

No entanto, como enfatizam Maheshwari; Bharadwaj; Bhat (2000), o complexo da enzima produzido por esses gêneros só funcionam de forma efetiva em estreitas faixas de pH e temperatura, fato que reforça a necessidade de pesquisas com novos microrganismos produtores de celulases. Além disto, as condições de cultivo de algumas espécies destas linhagens possuem certas limitações, mesmo naquelas modificadas através de engenharia genética. Como exemplo o fungo *Trichoderma reesei*, microrganismo mais reportado na literatura para produção de celulases, possui limitações quanto à inibição de síntese por certos substratos (LO et al., 2010). Apesar de existirem mecanismos que corrijam tais limitações através de modificações genéticas, o uso destes pode acarretar em mais custos na produção da enzima (DELABONA et al., 2012b). Logo, faz-se necessário realizar prospecções de forma dinâmica e constante, afim de investigar microrganismos selvagens que porventura possuam características desejáveis próximas à linhagens geneticamente modificadas.

A maioria das espécies do gênero *Aspergillus sp.* também são conhecidas como bons produtores de muitas enzimas de interesse biotecnológico, incluindo celulases e xilanases a partir de substratos lignocelulósicos. No geral, os extratos de celulases de *Aspergillus* diferencia-se daquelas produzidas por *Trichoderma* por possuírem maiores

quantidades de β -glucosidases. Por outro lado, linhagens de *Trichoderma reesei* são conhecidas como boas produtoras de exoglucanases, porém limitadas quanto à produção de celobiase, sendo deficientes na produção dessas enzimas (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011; SÁNCHEZ, 2009). Tal fato também reforça a necessidade de investigações dinâmicas de novas fontes microbianas produtoras de celulasas. Portanto, há inúmeros relatos na literatura específica acerca do isolamento de variados gêneros de fungos produtores de celulasas a partir de diferentes fontes naturais. Alguns destes trabalhos estão descritos abaixo.

Os estudos de Baffi et al. (2012) investigaram a diversidade de fungos isolados da fruta e resíduos da azeitona quanto ao potencial enzimático, através de triagem em placas de Petri, incluindo atividade celulolítica dos microrganismos investigados. Neste trabalho, foram isolados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Liiochtemia* e *Galactomyces*. Elevada atividade de CMCase foi observada nas amostras dos fungos *A. fumigatus*, *A. niger* e *Rhizomucor variabilis*.

Jing e colaboradores (2015), isolaram e selecionaram fungos celulolíticos em quatro diferentes etapas. Destas, a última foi conduzida através de fermentação submersa utilizando distintas composições do meio de cultura, em frascos Erlenmeyer, nas seguintes condições: 100 mL de meio de cultura líquido, pH 5.0, durante seis dias de processo e agitação 180 rpm. Dentre as linhagens selecionadas, aquelas com valores de atividade FPase acima de 500,0 FPU/L, todas foram identificadas como *Penicillium oxalicum*. A amostra de fungo que se destacou das demais apresentou atividades enzimáticas de 2740,0 FPU/L e 1300,0 U/L, valores respectivos para FPase e CMCCase.

Uma seleção de fungos celulolíticos isolados da Amazônia foi realizado por Delabona et al. (2012), utilizando resíduos agroindustriais como indutores para produção da enzima. Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados de amostras de solo e vegetação em estado de decomposição localizados em uma reserva da floresta amazônica brasileira. Os autores utilizaram o estado semi-sólido na formulação do meio de cultura do processo fermentativo utilizando farelo de trigo na etapa de seleção. Dentre os 110 fungos estudados, destacou-se *Aspergillus fumigatus* com a maior produção de CMCCase (43,65 U/g de sólido).

2.4.3.3. Celulases produzidas por fungos do gênero *Talaromyces*

Em processos biotecnológicos, fungos do gênero *Talaromyces* são reportados como versáteis na síntese de diferentes metabólitos, tais como pigmentos e enzimas (CHEN et al., 2016; DUFOSSÉ et al., 2014; ORENCIO-TREJO et al., 2016; YILMAZ et al., 2012a). As pesquisas que abordam a síntese de celulases por cepas do gênero *Talaromyces* iniciaram a partir do final da década de 70, época em que a espécie mais estudada para tal era a *T. emersonii*. Folan e Michael (1979) citam que as primeiras investigações sobre a produção da enzima por esta espécie foram realizadas em farinha de aveia difusa em meio com ágar, e pesquisas posteriores constataram que a enzima celulolítica sintetizada era um complexo estável capaz de degradar celulose solúvel e insolúvel.

Várias espécies do gênero *Talaromyces* tem gerado crescente interesse por sua habilidade em sintetizar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, essenciais para a quebra de material oriundo de biomassa vegetal (FUJII et al., 2015). Há casos relatados na literatura em que as enzimas secretadas por este gênero possuem maiores habilidades de sacarificação lignocelulósica se comparado à linhagens mais conhecidas para tal, como a *Trichoderma reesei* (FUJII et al., 2014; GUSAKOV, 2011). Isto reforça a importância de pesquisas mais intensas de síntese de celulases por *Talaromyces*, gênero no qual contém uma variedade de espécies capazes de degradar celulose através da maquinaria enzimática do fungo, tais como *T. emersonii*, *T. piceus* e *T. Stolli* (MOLONEY; CONSIDINE; COUGHLAN, 1983; HE et al., 2015; ORENCIO-TREJO et al., 2016).

A síntese de celulases totais também já foi relatada na literatura em outros membros como, por exemplo, *T. verruculosus* (FPase 44,0 FPU/L, Goyari et al. (2014)), *T. pinophilus* (FPase 210,0 FPU/L, Fujii et al. (2014)). A Tabela 2 mostra outros exemplos da literatura acerca da produção de celulases por *Talaromyces* através de fermentação submersa.

Tabela 2– Produção de enzimas celulolíticas por variadas espécies de *Talaromyces* em diferentes substratos.

Espécie	Maior atividade de celulases relatada	Substrato	Referência
<i>T. emersonii</i> 814.70 e 393.64	FPase: 1,85 FPU/mL	Carboximetilcelulose e polpa de beterraba tratada.	Folan; Michael (1979)
<i>T. emersonii</i> 814.70	FPase: 0,53 IU/mL em avicel; CMCase: 161,0 IU/mL em papel de filtro.	Celulose Solka Floc, carboximetilcelulose, avicel e substratos lignocelulósicos.	Moloney; Considine; Coughlan (1983)
<i>T. verruculosus</i> SGMNPF3	FPase: 44,0 FPU/L, em 8 dias de fermentação.	Carboximetilcelulose	Goyari et al. (2014)
<i>T. pinophilus</i> NBRC100533	0,21 FPU/mL	NR	Fujii et al., (2014)
<i>T. cellulolyticus</i> YP-4	Atividade FPase relativa: 150%, em 150 horas de fermentação submersa.	Glicerol e celulose microcristalina.	Fujii; Inoue; Ishikawa (2015)
<i>T. piceus</i> 9-3	FPase: 1,09 U/mL; CMCase: 8,56 U/mL, em 5 dias de fermentação.	Aviculose, carboximetilcelulose, sorbitol.	He et al. (2015)
<i>T. cellulolyticus</i> C-1	8,0 FPU/mL, em 4 dias de fermentação submersa.	Celulose Solka Floc	Okuda et al. (2016)
<i>T. stollii</i> LV186	CMCase 4,8 U/mL, em 5 dias de fermentação submersa.	Palha de milho e sorgo.	Orencio-Trejo et al. (2016)
<i>T. thermophilus</i>	β -glicosidasas 4,0 U/mL.	Farelo de trigo	Mallek-Fakh et al. (2017)

NR = não relatado. Fonte: elaborada pelo autor.

Os trabalhos acerca do isolamento de fungos do gênero *Talaromyces* relatam variados habitats deste microrganismo, como: habitat humano, presente em fluidos do sistema respiratório; ambiente doméstico, presente em poeira; assim como em solos e vegetações pertencentes à diferentes biomas (VILLANUEVA-LOZANO et al., 2017). A Tabela 3 expõe alguns trabalhos de isolamento de fungos *Talaromyces* a partir de diferentes locais.

Tabela 3 – Isolamento de fungos do gênero *Talaromyces* reportados na literatura científica.

Espécie	Local de isolamento	Referência
<i>T. austrocalifornicus</i> , <i>T. helicus</i> var. <i>major</i> , <i>T. indigoticus</i> , <i>T. rotundus</i> , <i>T. wortmannii</i> , <i>T. thailandiasis</i>	Solo de floresta na Tailândia.	Manoch; Dethoup (2011)
<i>T. verruculosus</i>	Solo de florestas do norte da Índia.	Goyari et al. (2014)
<i>T. systylus</i>	Solo do semiárido da Argentina.	Romero et al. (2016)
<i>T. neofusisporus</i> e <i>T. qii</i>	Folhas de floresta na China.	Wang et al. (2016)
<i>T. amazonenses</i> , <i>T. francoae</i> , <i>T. purgamentoru</i> e <i>T. columbiensis</i>	Folhas em decomposição da floresta amazônica na Colômbia.	Yilmaz et al. (2016)
<i>T. ocotl</i>	Solo de floresta conífera no México.	State et al. (2016)
<i>T. thermophilus</i>	Solo da região do Saara	Mallek-Fakh et al. (2017)

Fonte: elaborada pelo autor.

Tendo em vista que trabalhos científicos envolvendo a síntese de enzimas celulolíticas por *T. amestolkiae* ainda são pouco explorados na literatura, aliado ao fato da inexistência de relatos do isolamento deste fungo a partir de materiais orgânicos de bioma amazônico, demonstram a pertinência da presente investigação.

2.4.3.4. Produção de celulases por fermentação submersa

Os processos microbianos de produção enzimática ocorrem sob fermentação submersa (FS) ou então com o meio de cultura no estado semi-sólido ou sólido (FSS). O primeiro é o mais utilizado, em escala industrial, para a síntese da maioria das celulases comercializadas. A fermentação submersa pode ser definida como o processo em que os microrganismos são cultivados e desenvolvem-se em meio de cultura com excesso de água. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente, com volumes que podem chegar a 1000 m³ (VANDENBERGHE, L.P. CARVALHO et al., 2016).

O processo fermentativo submerso possui algumas vantagens, frente à fermentação semi-sólida, que são consideradas na escolha do processo mais adequado. Essas vantagens giram em torno, principalmente, da maior facilidade de controles do processo na fermentação submersa, como: temperatura, devido ao maior teor de água disponível; pH e aeração; homogeneização; e melhor absorção de nutrientes (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011).

Também é designada como uma estratégia mais viável ao considerar que há maiores possibilidades de recuperação do produto final, visto que as enzimas excretadas ficam mais disponíveis no meio líquido. Na FSS grande parte das celulases ficam confinadas dentro do material sólido devido a afinidade com o substrato, necessitando a aplicação de um tampão para extrair as enzimas produzidas, resultando em perdas. Por outro lado, na FS, o sistema enzimático encontra-se prontamente dissolvido no meio líquido supernadante. Isto promove menos perdas do metabólito e menos etapas de extração da enzima no sobrenadante do caldo fermentado (DO NASCIMENTO; COELHO, 2011; SINGHANIA et al., 2010).

A produção de celulases através de fermentação submersa é altamente influenciada por variados parâmetros, tais como: natureza do material celulósico usado como indutor; disponibilidade de nutrientes, como fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas e açúcares solúveis; pH e temperatura de fermentação. O pH do meio fermentativo constitui-se como um dos principais parâmetros que influenciam tanto o desenvolvimento do microrganismo, uma vez que afeta a membrana celular e a maquinaria de transporte dos mais variados componentes presentes no meio, assim como influencia na produção, excreção e manutenção das propriedades da enzima (NIETO-

DOMÍNGUEZ et al., 2015). Já a temperatura do processo fermentativo também se constitui como um importante parâmetro que afeta o crescimento microbiano e síntese de variados metabólitos microbianos. Dentre estes metabólitos estão as celulases e, na maioria das publicações científicas, os fungos celulolíticos tem sido reportados como mesofílicos ou termofílicos (KUHAD et al., 2016).

O cultivo submerso de microrganismos também é influenciado pelos parâmetros operacionais que envolvem a configuração do reator, que regem respostas como a reologia e morfologia dos microrganismos e os perfis de transferência de massa e energia entre o meio de cultura e a biomassa microbiana. Todos esses parâmetros devem ser ajustados antes de iniciar o processo fermentativo e a relação desses parâmetros com o complexo formado deve ser analisado durante a fermentação. Quanto à configuração do reator, os principais parâmetros a serem estudados são aqueles que evitem a desativação das celulases por adsorção na celulose e forças cisalhantes nas culturas microbianas, que representam sérios problemas no desenvolvimento de processos mais econômicos (AHAMED; VERMETTE, 2010a; TERVASMÄKI et al., 2016).

A maioria dos processos submersos para síntese de enzimas celulolíticas é conduzida em reatores do tipo tanque agitado (*Stirred Tank Reactor*), que são bastante utilizados devido, principalmente, ao favorecimento de uma eficiente capacidade de misturas, o que acarreta em elevadas taxas de transferência de massa e energia. Logo, os biorreatores de tanque agitado são largamente utilizados na indústria de fermentação devido à versatilidade do desenho, instalação e configuração das peças que envolvem a estrutura do equipamento (BUFFO et al., 2016a; ORGILL et al., 2013).

Conforme mencionado anteriormente, na maioria dos processos fermentativos, a taxa de cisalhamento desempenha um papel importante no comportamento celular. O excesso de tensão de cisalhamento pode danificar a conformação e desenvolvimento das células microbianas e, conseqüentemente, pode ocorrer perdas na taxa de crescimento celular ou mesmo a ruptura da célula (AHAMED; VERMETTE, 2010; RADCHENKOVA et al., 2014).

Em reatores do tipo tanque agitado os impulsores – também chamados de impelidores - constituem-se como a principal parte do reator que determina os efeitos da mistura (GHOBADI et al., 2017). Logo, a seleção adequada de impelidores em processos fermentativos submersos é de extrema importância para assegurar maiores

produtividades, uma vez que a geometria do impelidor empregado influencia na hidrodinâmica do caldo fermentado, assim como na energia de consumo, na transferência de oxigênio e na morfologia dos microrganismos (principalmente em fungos filamentosos) (TANG et al., 2015).

O impelidor constitui-se como a principal parte do reator de tanque agitado que determina os efeitos da mistura e energia consumida. A maioria destes equipamentos necessitam do máximo controle do processo de mistura para obtenção de maior produtividade, o que afeta significativamente a performance e eficiência econômica no sistema de mistura. Conseqüentemente, os estudos dos tipos de impelidores usados em biorreatores tornam-se de extrema relevância para o aumento de produtividade em processos fermentativos submersos (GHOBADI et al., 2017).

De acordo com Buffo et al. (2016), a turbina mais convencional usada em biorreatores é do tipo Rushton, que possui como característica transmitir um fluxo radial ao meio líquido. No entanto, possui como grande desvantagem o elevado grau de cisalhamento causado pelas pontas das lâminas, assim como no fluxo que empurra o meio cultivado para as paredes da dorna do reator.

2.4.3.5. Meio de cultura para produção de celulasas

A composição do meio de cultura mais comumente utilizado para produção de celulasas em estado submerso são aqueles inicialmente sugeridos por Mandels e Reese (1957) e Mandels e Weber (1969), no qual a celulose cristalina pura é o principal componente indutor para síntese da enzima. No entanto, variados trabalhos tem sugerido composições alternativas ao meio de cultura padrão, tendo em vista a redução de custos na produção de celulasas. A formulação do meio de cultura é uma etapa importante, uma vez que não há uma composição ideal que favoreça, conjuntamente, o desenvolvimento do microrganismo e a indução do complexo enzimático. As buscas residem principalmente em torno de substitutos à celulose pura, uma vez que grande parte dos custos associados à síntese de celulasas recaem sobre o valor da matéria-prima de carboidrato utilizada como indutora (ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016; KUHAD et al., 2016; SÁNCHEZ, 2009).

Dentre os materiais alternativos ao uso de celulose pura na síntese de celulasas, os materiais lignocelulósicos constituem-se como um excelente material alternativo para a redução do custo das enzimas celulolíticas, uma vez que são largamente encontrados disponíveis na natureza e são caracterizados como materiais mais baratos que a glicose pura (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Frente à necessidade de diminuir custos na síntese de extratos enzimáticos celulolíticos, o uso de resíduos agroindustriais como indutores no meio de cultura, associado ao estudo da formulação dos outros componentes do meio de cultura, torna-se um excelente estratégia para tal. São cada vez mais crescentes os estudos acerca da eficiente utilização de materiais lignocelulósicos em processos fermentativos submersos para a produção de celulasas. Dentre estes materiais vegetais, destacam-se: bagaço de cana de açúcar, bagaço de caju e farelo de trigo. A Tabela 4 mostra a variedade de materiais lignocelulósicos relatadas na literatura que podem ser utilizados como indutores na síntese de celulasas.

Tabela 4 – Uso de variados materiais lignocelulósicos utilizados na produção de celulasas.

Microrganismo	Material lignocelulósico	Máxima atividade relatada	Referência
<i>Acremonium strictum</i>	Bagaço de cana de açúcar	FPase 9,76 FPU/L; CMCase 139,42 U/L	Goldbeck et al. (2013)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagaço de cana de açúcar, suplementado com glicerol	FPase 227,0 FPU/L	Delabona et al. (2016)
<i>Neurospora crassa</i>	Farelo de trigo	FPase 133,0 FPU/L; CMCase 1970 U/L	Romero et al. (1999)
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de milho	FPase 120,0 FPU/L	Juhász et al. (2005)
<i>Streptomyces sp.</i>	Palha de arroz	CMCase 1560, 0 U/L	Singh et al. (2014)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Resíduos de banana	FPase 10,3 FPU/L; CMCase 496,5 U/L	Shah; Kalia; Patel (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de côco	FPase 2300,0 FPU/L; CMCase 3290 U/L	Mrdula; Murugammal (2011)

Fonte: elaborada pelo autor.

3. OBJETIVOS

Avaliar a síntese de enzimas do complexo celulolítico por fungo filamentoso isolado do bioma amazônico, em fermentação submersa, utilizando biomassa vegetal como fonte indutora da enzima.

3.1. Objetivos específicos:

- Selecionar fungos do bioma amazônico com maior potencial celulolítico;
- Identificar o microrganismo isolado, de acordo com suas características morfológicas e utilizando técnicas moleculares;
- Selecionar o meio de cultura mais adequado para propagação de esporos fúngicos;
- Selecionar diferentes materiais lignocelulósicos como indutores da síntese de celulasas;
- Analisar a capacidade do fungo em produzir celulasas sob diferentes condições nutricionais e ambientais de cultivo;
- Otimizar os componentes do meio de cultura de produção de celulasas;
- Estudar a produção da enzima em biorreatores;
- Caracterizar, quanto a estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, a enzima produzida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

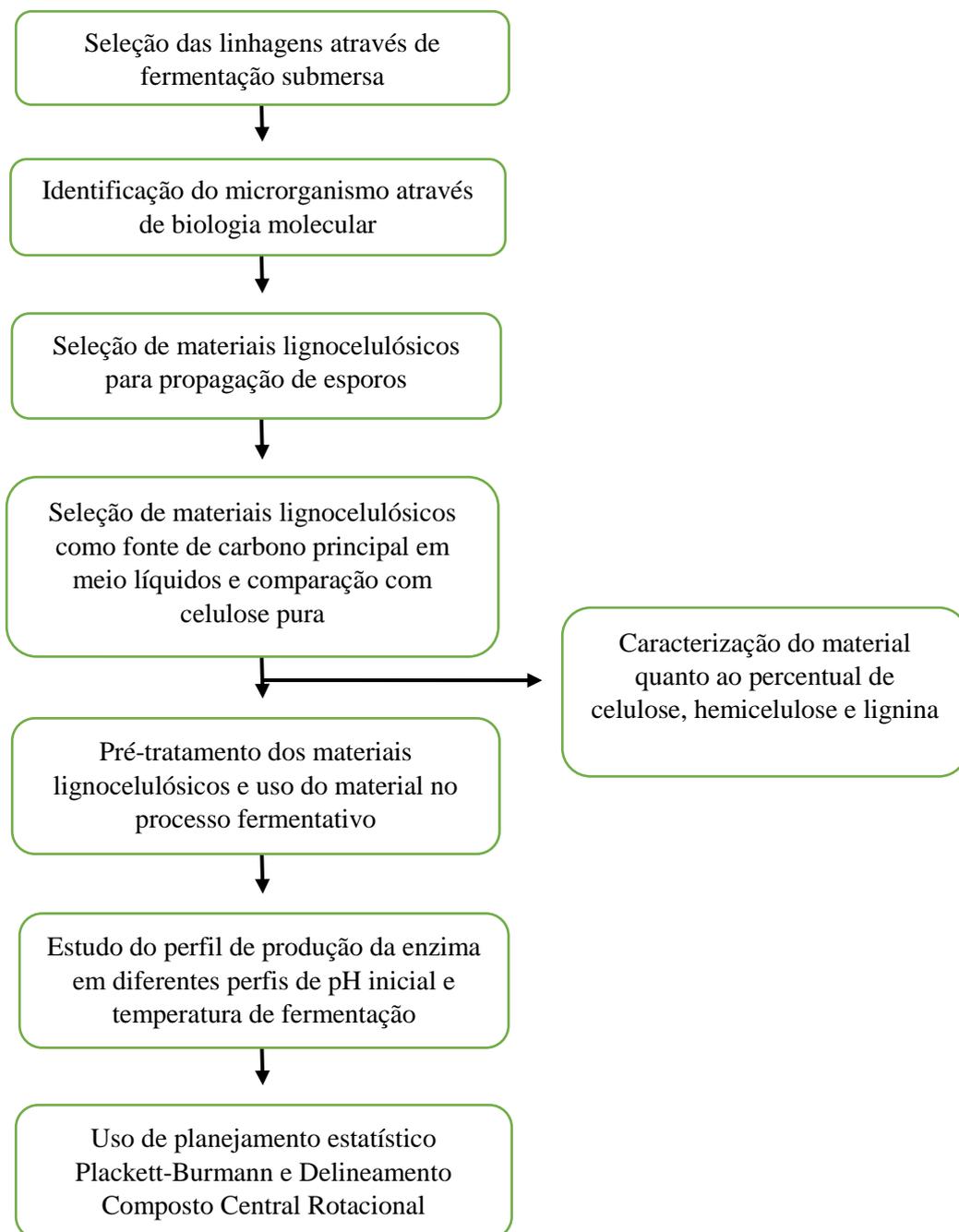
Os experimentos foram desenvolvidos na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE), Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ), assim como houve suporte do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA), que pertence ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O estudo do processo de produção das celulasas pode ser descrito em duas etapas diferentes:

- a) Fermentação submersa em frascos Erlenmeyer, com 100 mL de meio de cultura.
- b) Fermentação submersa em biorreator com 4000 mL de meio de cultura.

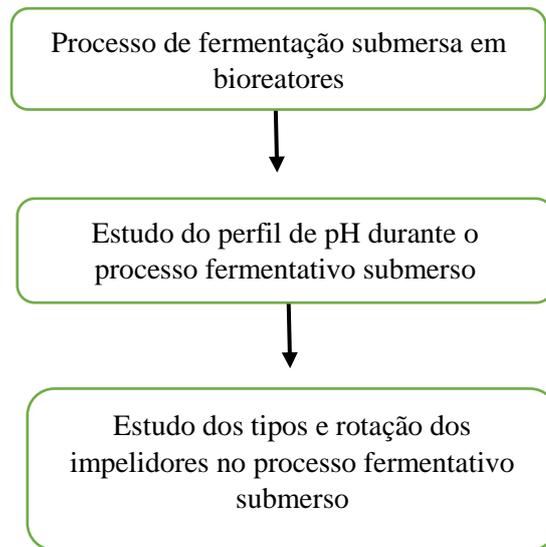
Nas Figuras 3 e 4 estão apresentados os fluxogramas de ambas as etapas.

Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo fermentativo em frascos Erlenmeyer e agitador orbital.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo fermentativo em biorreator.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.1. Material lignocelulósico

4.1.1. Preparo do material lignocelulósico

Os materiais lignocelulósicos utilizados foram: bagaço de caju (BC), farelo de trigo (FT), pseudocaule da bananeira (PB) e sabugo de milho (SM). O farelo de trigo e o sabugo de milho foram obtidos no comércio local de Fortaleza-CE. O pseudocaule da bananeira e o bagaço de caju foram obtidos na Embrapa Agroindústria Tropical.

Todos os materiais foram lavados com água destilada, sob agitação orbital de 150 rpm, na proporção de 40 g de sólido para 100 mL de água destilada, para retirada de sujidades. Após a lavagem, o material foi filtrado, em peneira de tecido sintético, para retirada do líquido, e seco em estufa de circulação de ar a 60°C. Em seguida, a biomassa lavada e seca foi triturada em moinho de facas do tipo Willye (Fortinox, modelo Star FT 80), com peneira malha 10 mesh acoplada ao equipamento.

Os quatro materiais lignocelulósicos estudados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Aspectos dos substratos lignocelulósicos após secagem.



A - Bagaço de caju, B - Farelo de trigo, C - Pseudocaule da bananeira e D - Sabugo de milho (SM). Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.2. Pré-tratamento do material lignocelulósico

Realizou-se um tratamento ácido-alcálico do material lignocelulósico, a fim de diminuir a recalcitrância da biomassa e verificar se a maior acessibilidade à celulose teria

um efeito indutor na produção de celulases. Logo, foi adotado o tratamento ácido devido ao seu amplo estudo na literatura (TIMUNG et al., 2015; ZHOU; YANG; RUNGE, 2015). Para a eficiente remoção da lignina e hemicelulose, um tratamento alcalino foi adotado após o tratamento com ácido (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

O tratamento ácido-alcalino foi desenvolvido conforme descrito no trabalho de Guilherme et al. (2015). A primeira etapa do processo consistiu no tratamento ácido, utilizando solução de ácido sulfúrico 2% (v/v). Para isto, foi usada a quantidade de 20 g do material lignocelulósico em 100 mL de solução de ácido e ambos foram submetidos ao tratamento térmico de 121°C, por 30 minutos, em autoclave.

Logo após, em frasco Becker e com sistema de agitação de 200 rpm (TECNAL, modelo TE-420) por 15 minutos, lavou-se a fração sólida com água destilada por 20 vezes ou até o valor do pH da água de lavagem atingir a neutralidade. Em seguida, o material foi submetido ao processo de secagem em estufa com circulação de ar (TECNAL, modelo TE-394) a 40°C, durante 48h.

Para o tratamento alcalino, foi utilizada uma quantidade de 20 g de material sólido e 100 mL de solução de hidróxido de sódio 4% (m/v). Os dois componentes foram submetidos, durante 30 minutos, a temperatura de 121°C, em autoclave. Após resfriamento, o pH da suspensão foi corrigido com ácido clorídrico P.A. até atingir a neutralidade. Em seguida, foi realizada a lavagem com água destilada por vinte vezes, em sistema de agitação a 200 rpm, por 15 min.

4.1.3. Caracterização do material lignocelulósico

Realizou-se uma caracterização, quanto à composição química, da fração sólida do material não tratado, assim como do material tratado. Para tal, o percentual, em massa, das frações lignocelulósicas (celulose, cinzas, extrativos, hemicelulose, lignina e umidade) foram determinados de acordo com metodologia sugerida por MORAIS; ROSA; MARCONCINI (2010).

4.1.3.1. Preparo das amostras

As amostras - não tratada e submetida a tratamento ácido-base - foram trituradas em moinho de facas do tipo Willye (Fortinox, modelo Star FT 80) e as partículas padronizadas com peneira malha 10 mesh acoplada ao equipamento de moagem.

4.1.3.2. Determinação do teor de umidade (TU)

A determinação da umidade foi executada em balança analisadora de umidade. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.3.3. Determinação de cinzas (TC)

Uma quantidade de 2,0 g do material vegetal seco foi adicionada a cadinhos, previamente calcinados, em forno mufla. O material foi exposto a 600°C, por 3 h (rampa de 10°C/min até atingir a temperatura adequada) e, depois deste período, baixou-se a temperatura para 200°C. Após 1 h de exposição, retirou-se a amostra para resfriamento em dessecador e pesou-se o conjunto para averiguar a massa em balança analítica. O procedimento foi executado em triplicata.

O cálculo final do percentual de cinzas foi feito de acordo com a equação 1.

$$\frac{MRAC-MR}{MA} \times 100\% = TC \% \quad (1)$$

Onde MRAC é a massa do conjunto recipiente mais a amostra calcinada; MR, a massa do recipiente; MA é a massa da amostra inicial e TC % é o teor do percentual de cinzas.

4.1.3.4. Determinação do teor de extrativos (TE)

Realizou-se através de extração em equipamento Soxhlet utilizando 6,0 g de material vegetal seco. Foi utilizado etanol puro como solvente, em 24 refluxos, no período de seis horas de extração.

Após o período de refluxos, as amostras de material vegetal foram para secagem a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por uma hora e, após resfriamento, foram pesadas em balança analítica. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Através dos valores obtidos da massa do recipiente (MR), massa da amostra (MA), assim como da massa recipiente mais extrativo (MRE), calculou-se o teor de extrativos em percentagem (TE %) através da equação 2.

$$\frac{MRE-MR}{MA} \times 100\% = TE \% \quad (2)$$

4.1.3.5. Determinação de lignina

Os experimentos foram conduzidos de acordo com a determinação de Klason, através de modificações da norma TAPPI (2006) e seguiram as seguintes etapas:

- a. Digestão de 1,0 g do material vegetal seco utilizando 17,0 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m), em almofariz, durante 15 min. O material permaneceu em repouso durante 24 h.
- b. Após o período de digestão, adicionou-se 306 mL de água destilada no almofariz, a fim de diluir o ácido (concentração final de 4%). O volume foi completado com água destilada para 1000 mL e a amostra foi transferida para balões de fundo chato com 12 esferas de vidro.
- c. Com auxílio de manta aquecedora e condensador, o material digerido foi mantido sob aquecimento e refluxo durante 4 h contadas a partir do início da fervura.
- d. Após a lavagem sob aquecimento, as amostras de biomassa vegetal foram filtradas em funil de vidro sinterizado ASTM 4, com abertura de poro de 10 μ . Os filtros foram previamente secados e pesados em balança analítica.
- e. O filtrado recolhido foi utilizado para a determinação de lignina solúvel. Para tal análise, adotou-se o método de Goldschmid (1971), no qual realizou-se uma varredura da absorvância de 215 nm e 280 nm. A amostra foi diluída com ácido sulfúrico 4% até a absorvância ficar menor do que 1,0.

Utilizou-se a fórmula mostrada na equação 3 para determinar a concentração de lignina solúvel na amostra, onde CLS representa a concentração de lignina solúvel em g.L^{-1} ; assim como A215 e A280 representam, respectivamente, as absorvâncias a 215 e 280 nm.

$$\frac{(4,53 \times A215) - A280}{300} = CLS \quad (3)$$

O teor de lignina solúvel (TLS) foi calculado considerando o volume inicial da amostra (323 mL), de onde se obteve a massa de lignina solúvel (MLS). Ou seja, multiplicou-se o CLS por 0,323 L. As fórmulas para obtenção da

percentagem de lignina solúvel e sua correção estão descritas nas equações 4 e 5, respectivamente.

$$\frac{MLS}{MA} \times 100\% = TLS \% \quad (4)$$

$$\frac{TLS\% \times [100 - (TE\% - TU\%)]}{100} = TLS \% \text{ corrigido} \quad (5)$$

O teor de lignina insolúvel (TLI %) foi obtido através da relação da massa do funil seco (MF), massa da amostra (MA), da massa do funil somada à massa da lignina após a secagem (MFL), assim como da massa do teor de cinzas mostrada anteriormente (TC%) (Equação 6).

$$\left(\frac{MFL - MF}{MA} \times 100 \% \right) - TC\% = TLI \% \quad (6)$$

Os valores foram corrigidos considerando-se os dados de umidade das amostras (TU%), de acordo com as equações 7 e 8.

$$\frac{TC \% \times [100 - (TE\% - TU \%)]}{100} = TC \% \text{ corrigido} \quad (7)$$

$$\frac{TLI \% \times [100 - (TE \% - TU \%)]}{100} = TLI \% \text{ corrigido} \quad (8)$$

4.1.3.6. Determinação de holocelulose

A análise foi efetuada utilizando-se 3,0 g do material vegetal. Este foi colocado com 120 mL de água destilada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL.

Acrescentou-se ao frasco - sob agitação constante e temperatura mantida a $70 \pm 2^\circ\text{C}$ - 2,5 g de clorito de sódio com pureza aproximada de 80% e 1 mL de ácido acético glacial (pureza $\geq 99,85\%$). Estes componentes foram adicionados no começo da reação, assim como na primeira, segunda e quinta hora, totalizando cinco horas de experimento nas condições supracitadas.

Após degradação e resfriamento do material, o mesmo foi filtrado em funil sinterizado tipo ASTM 2, com abertura de poros de 40μ a 100μ . Os funis foram previamente secos e pesados em balança analítica.

O conjunto amostra mais funil foram secados em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ até peso constante e os valores da massa final foram registrados para o cálculo do teor de holocelulose (TH %), conforme equação 9.

$$\frac{MFH-MF}{MA} \times 100 \% = TH \% \quad (9)$$

Onde MF é a massa do funil seco, MA é a massa da amostra e MFH é a massa do funil somada à massa de holocelulose após secagem em estufa. A correção desta equação, considerando-se o teor de umidade (TU %) está descrita na equação abaixo (Equação 10).

$$\frac{TH \% \times [100 - (TE \% - TU \%)]}{100} = TH \% \text{ corrigido} \quad (10)$$

4.1.3.7. Determinação de alfacelulose e hemicelulose

Utilizou-se como amostra 1,0 g de holocelulose obtida nos experimentos descritos no ítem anterior. O material foi degradado em almofariz, por oito minutos, utilizando 15 mL de solução NaOH 17,5 %. Após este procedimento, foram adicionados 40 mL de água destilada e todo o conteúdo foi transferido para funil de vidro sinterizado ATSM 2 previamente seco e com massa determinada.

O conjunto funil e holocelulose degradada foi seco em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ até peso constante. Após o período de secagem, a massa foi anotada e o cálculo do teor de alfacelulose (TA%) foi conduzido de acordo com as fórmulas expostas nas equações 11 e 12, com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra de holocelulose (MAH); na massa do funil somada à massa da alfacelulose (MFA); e no teor de holocelulose corrigido (TH corrigido)

$$\frac{MFA-MF}{MA} \times 100 \% = TA \% \quad (11)$$

$$\frac{TH \% \text{ corrigido} \times TA}{100} = TA \% \text{ corrigido} \quad (12)$$

Através da diferença entre os valores de TH e TA corrigidos, obteve-se o valor do percentual corrigido de hemicelulose (The % corrigido), segundo a equação 13.

$$TH \% \text{ corrigido} - TA \% \text{ corrigido} = The \% \text{ corrigido} \quad (13)$$

4.2. Seleção de microrganismos e técnicas de manutenção

Nesta etapa foram utilizadas 17 linhagens fúngicas isoladas de solo amazônico e provenientes da Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA (Manaus - AM). Utilizou-se o isolado *Trichoderma reesei* RUT C30, conhecidamente como cepa fúngica padrão para produção de celulases, como controle positivo. No Quadro 1 estão descritos os microrganismos utilizados nos experimentos.

Quadro 1 – Linhagens utilizadas nos experimentos		
CMIAT 039	CMIAT 040	CMIAT 041
CMIAT 043	CMIAT 044	CMIAT 048
CMIAT 049	CMIAT 050	CMIAT 051
CMIAT 053	CMIAT 055	CMIAT 056
CMIAT 057	CMIAT 058	CMIAT 059
CMIAT 079	CMIAT 080	

Fonte: elaborada pelo autor.

As linhagens estavam estocadas liofilizadas e mantidas a -80°C em ultrafreezer. A manutenção foi realizada através de repiques periódicos, de quatro meses, em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) preparado conforme recomendação do fabricante (39 g por 1L de água destilada) e autoclavado a 121°C , durante 15 minutos. As linhagens foram ativadas em meio BDA inclinado e incubadas em estufa microbiológica a 30°C , durante sete dias para assegurar a esporulação.

4.3. Propagação de esporos fúngicos

4.3.1. Obtenção de esporos em meio BDA

Os fungos foram ativados conforme descrito no item anterior. Após o período de crescimento, o microrganismo foi novamente repicado em meio de cultura BDA inclinado em tubos de ensaio e incubados a 30°C , durante sete dias, em uma B.O.D. Após o período de incubação, os esporos crescidos foram novamente suspensos utilizando 10,0 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3% v/v). A determinação da concentração de esporos na solução foi realizada em microscópio ótico através de contagem direta em câmara de Neubauer (BIER; SPLITTSTOESSER; TORTORELLO, 2001).

4.3.2. Obtenção de esporos em materiais lignocelulósicos

4.3.2.1. Preparo do material

Os materiais bagaço de caju (BC), farelo de trigo (FT), pseudocaule da bananeira (PB) e sabugo de milho (SM) foram inicialmente preparados conforme descrito no ítem 4.1.1.

A atividade de água dos sólidos foi padronizada em 0,86 com adição de solução mineral descrita por Mandels e Weber (1969) (Apêndice A) e mensurada em equipamento de determinação de atividade de água Aqua lab (Modelo CX-2). Após esse preparo dos materiais, os mesmos foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

4.3.2.2. Crescimento do microrganismo nos materiais lignocelulósicos

De forma asséptica, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de esporos crescidos em meio BDA (ítem 3.2.1) foi inoculada em frascos Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo 6,0 g de material vegetal esterilizado em autoclave (121°C, por 15 min). Os meios semeados foram então incubados em estufa B.O.D. durante sete dias, a 30°C.

Os esporos formados no meio de cultura foram extraídos pela homogeneização com 50 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3% v/v). Em seguida, os esporos foram desprendidos dos resíduos através de agitação vigorosa e recuperados através de filtração da suspensão utilizando gaze e frascos coletores estéreis. A concentração de esporos na suspensão foi determinada pela contagem direta em câmara de Neubauer usando microscópio ótico.

4.4. Escolha da linhagem fúngica

A finalidade dessa etapa foi selecionar o fungo mais promissor quanto à síntese de celulasas, através de processo fermentativo submerso, utilizando celulose pura como fonte de carbono principal. Os testes foram realizados em meio de cultura para produção de celulasas adaptado de Mandels e Weber (1969), utilizando como fontes de carbono celulose microcristalina (SIGMA) e sacarose, ambos na concentração de 10 g por 1000 mL de meio reacional. A composição dos meios de cultura está descrita no Apêndice A.

Os testes foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura. Os ensaios ocorreram em incubadora com agitação orbital New Brunswick™ (modelo Innova® 44/44R), a 150 rpm, na temperatura de 30°C, durante 96 h. O inóculo utilizado para a etapa de seleção foi obtido através de fungo crescido em meio BDA, conforme procedimento descrito no item 4.3.1., e padronizado em 10⁵ esporos / mL de meio de cultura.

Após finalizar o processo de fermentação, uma alíquota de 30 mL de cada ponto experimental foi centrifugada a 9600 g (centrífuga Biofuge Stratos – Heraeus), a 10°C, por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas. A análise do complexo celulolítico compreendeu a atividade enzimática sobre papel de filtro (FPase) e a atividade de endo - β -1,4 glucanase sobre o substrato carboximetilcelulose (CMC).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata

4.5. Identificação do microrganismo

Os experimentos desta etapa foram realizados em parceria com os pesquisadores Dr. Jerri Edson Zilli e Carlos Vergara Torres Junior, da Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ, Brasil). Identificou-se o fungo escolhido na etapa de seleção.

4.5.1. Identificação cultural e morfológica

As características macroscópicas foram estudadas em diferentes meios de cultura e condições de cultivo, cujas composições estão descritas no Apêndice B. As culturas foram inoculadas em três pontos, distantes simetricamente, utilizando os meios de cultura distribuídos em placas de Petri de 90mm de diâmetro (SAMSON; HOUBRAKEN, JOS; THRANE, ULF; FRISVAD, JENS CHRISTIAN; ANDERSEN, 2010):

- Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)
- Ágar Czapek (Cz)
- Meio CYA suplementado com 5% de NaCl (CYAS)
- Ágar Sacarose Creatinina (CREA)
- Ágar aveia (OA)
- Ágar Extrato de malte (MEA)

- Ágar Extrato de levedura – Sacarose (YES)

As placas foram incubadas a 25°C e 37°C (placas contendo CYA), durante sete dias, na ausência de luminosidade. Após esse período, os diâmetros das colônias foram mensurados. Observou-se, também: o grau de esporulação, a cor das colônias (frente e verso da placa), assim como a produção de pigmentos dispersos no meio sólido.

A identificação morfológica do microrganismo foi realizada por microscopia óptica, através da técnica do microcultivo. Inoculou-se o microrganismo em uma delgada camada de meio de cultura BDA (100 µL) solidificado sob uma lâmina e o mesmo foi coberto com uma lamínula. Logo após, as lâminas foram depositadas em placas de Petri na presença de algodão umidificado com água destilada e vedadas. Todo procedimento foi realizado de forma asséptica e todo material utilizado foi esterilizado por autoclavação antes do processo.

O fungo foi incubado em estufa B.O.D., a 30°C, durante cinco dias. Após este período, as lamínulas foram retiradas e sob estas foi depositado uma gota de solução de corante azul de metileno, para enfatizar as estruturas de reprodução do microrganismo (MARTINS et al., 2008). As lamínulas foram então repousadas em uma lâmina e esta observada em microscópio óptico.

A fim de verificar a produção de ascomas, foram cultivadas, durante quatro semanas, placas contendo os meios MEA, OA, assim como Ágar de infusão HAY. A observação da presença de ascomatas, asci e ascósporos foi realizada de acordo com metodologia sugerida por Yilmaz et al. (2014). Para tais observações, utilizou-se microscópio Axioplan light (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipados com câmera digital Axiocam MRC5 (Carl Zeiss).

4.5.2. Identificação molecular

4.5.2.1. Extração do DNA, reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento

A extração do DNA foi realizada em colônias do fungo crescidas em meio MEA, por sete dias, a 30°C, e conservadas a -20°C (GERARDO et al., 2004; MÖLLER et al., 1992). As reações de PCR foram preparadas conforme procedimento relatado por Visagie et al. (2014a).

O espaço interno transcrito (ITS) ou região ITS foi amplificado usando os iniciadores ITS1 e ITS 4 (YILMAZ et al., 2014) e foi utilizado o par de marcadores Bt2a e Bt2b como marcadores na amplificação da β -tubulina (BenA) (DONALDSON, 1995).

As reações de sequenciamento foram conduzidas em um analisador genético ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e sequenciados pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). As sequências geradas foram então depositadas no banco de dados Genbank e os números de acessos estão incluídos nas árvores filogenéticas.

4.5.2.2. Análise dos dados

Todos os dados foram alinhados com auxílio do software MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013) e analisados com os métodos de Máxima verossimilhança (ML, maximum likelihood) e Agrupamento de vizinhos (NJ, *neighbor – joining*). A análise da ML foi realizada através do cálculo de árvore inicial utilizando o algoritmo BioNJ e subsequente busca heurística com a opção de Troca de Vizinhos Mais Próximos (NNI, nearest neighbor interchange).

4.6. Estudo de diferentes materiais lignocelulósicos no cultivo do inóculo

Nesta etapa, foi estudado o comportamento do microrganismo no meio de cultura utilizado para multiplicação dos esporos a serem utilizados no inóculo das fermentações submersas. Logo, verificou-se o crescimento do fungo em diferentes materiais lignocelulósicos oriundos da agroindústria e os resultados foram comparados com o microrganismo crescido em meio de cultura BDA. Para tal, utilizou-se o microrganismo com maior potencial de produção de celulasas identificado na etapa de seleção das linhagens.

As amostras de biomassa vegetal testadas foram: bagaço de caju (BC), farelo de trigo (FT) e sabugo de milho (SM). Inicialmente, a ativação das linhagens foi executada conforme os passos descritos no item 2.1 e o procedimento para multiplicação dos esporos de fungos em meio BDA e material lignocelulósico estão, respectivamente, descritos no item 4.3.1. e 4.3.2.

A solução contendo os esporos extraídos de cada material lignocelulósico foi adicionada ao meio de produção de celulasas e a fermentação ocorreu nas mesmas

condições da etapa de seleção das linhagens. Para padronizar o inóculo, utilizou-se uma alíquota de suspensão de esporos calculada com base na concentração final de unidades de células: 10^7 esporos fúngicos / mL de meio de cultura.

Os dados utilizados como resposta nesta etapa foram:

- a) Contagem de células totais em microscópio óptico, com auxílio de câmera de Neubauer.
- b) Respostas de atividade enzimática após cada inóculo ser submetido a processo fermentativo submerso, de acordo com as mesmas condições operacionais estabelecidas no item 4.4. As análises utilizadas foram celulases totais (FPase) e endoglucanases (CMCase).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as médias dos valores de cada análise foram comparadas no teste estatístico Tukey, a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica versão 10.

4.7. Utilização de materiais lignocelulósicos como indutores na produção de celulases.

Após a escolha das melhores condições operacionais adotadas na etapa anterior, estudou-se a síntese de celulases mediante a presença de biomassa lignocelulósica in natura como substituto da celulose pura no processo fermentativo. Foram observados, também, os perfis de produção da enzima na presença e na ausência de uma fonte de carbono mais facilmente metabolizável, como a sacarose.

Os experimentos foram executados utilizando o meio de cultura base para produção de celulases, segundo composição elaborada pelos autores Mandels e Weber (1969) (Apêndice A). Na Tabela 5 estão expostos os ensaios de acordo com a presença e ausência de cada componente no processo fermentativo, cujas condições operacionais foram: 100 mL de volume reacional em frascos Erlenmeyer de 250 mL, agitação orbital de 150 rpm, 30°C e pH inicial 5.5.

Tabela 5 - Perfil de produção de celulases na presença de diferentes fontes de carbono.

Experimentos	Fontes de carbono						
	SAC	CMC	CM	BC	FT	PB	SM
1	+						
2	+						
3		+					
4	+		+				
5			+				
6	+			+			
7				+			
8	+				+		
9					+		
10	+					+	
11						+	
12	+						+
13							+

SAC = sacarose, CMC = carboximetil celulose (SIGMA), CM = celulose microcristalina (SIGMA), BC = bagaço de caju, FT = farelo de trigo, PB = pseudocaule da bananeira, SM = sabugo de milho. O símbolo + indica presença do componente no meio. Fonte: elaborada pelo autor.

Ambas as fontes de carbono, material celulósico e sacarose, foram adicionadas ao meio na proporção de 1g de sólido para 100 mL da solução de Mandels e Weber (1969) e esterilizados em autoclave por 15 minutos. A semeadura do microrganismo foi realizada a partir de inóculo crescido em meio semi-sólido, conforme a melhor condição estabelecida no estudo do item 3.5. Após 96 h de processo, uma alíquota de 30 mL de cada amostra foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para as análises de FPase e CMCase.

Após estes experimentos, a produção de celulases foi verificada também com a biomassa vegetal deslignificada através de tratamento ácido – base, conforme descrito no item 4.1.2. Todas fermentações foram realizadas de acordo com as melhores condições estabelecidas nas etapas anteriores.

4.8. Estudo do pH inicial e temperatura do processo fermentativo.

Após adotar os melhores parâmetros nas etapas anteriores, foram estudados, através de experimentos unifatoriais, a melhor produção de celulases frente a diferentes perfis de pH inicial do meio de cultura e temperaturas. Os valores de pH pesquisados foram: 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Para tal, foram utilizados os tampões citrato 50mM (pH 3.0 – 6.0) e acetato de sódio 50 mM (pH 7.0 – 9.0).

Posteriormente, foram realizados testes a fim de verificar qual a melhor temperatura a ser adotada no processo fermentativo submerso para a produção da enzima. Foram adotadas as melhores condições de cultivo estudadas anteriormente. Para tal, verificou-se a produção de celulasas nas temperaturas: 10, 20, 30, 40, 50 e 60°C.

Em ambos os casos, a análise dos experimentos foi realizada através dos valores obtidos nas análises de celulasas totais (FPase) e endoglucanases (CMCase). Foram adotadas três repetições de cada experimento.

4.9. Diferentes concentrações de pseudocaule da bananeira no meio líquido.

Após obtenção dos melhores perfis de pH e temperatura, foram realizados testes para verificar se maiores quantidades de pseudocaule da bananeira seriam benéficas para a síntese de celulasas. Logo, foram realizados experimentos unifatoriais, nos quais foram estudadas distintas concentrações do material sólido no meio de cultura: 0%, 1% e 4% (p/v). Os testes foram realizados em triplicata, e as condições de cultivo foram: 30°C, pH inicial 5,0, agitação 150 rpm, em 96 horas de cultivo.

4.10. Otimização do meio de cultura líquido através de planejamento estatístico

4.10.1. Seleção de variáveis do meio de cultura por Plackett-Burman

Este conjunto de experimentos teve como objetivo avaliar a influência dos componentes do meio de cultura no processo de produção de celulasas, utilizando-se de delineamento *screening design* do tipo Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) com 12 ensaios para as nove variáveis estudadas, em dois níveis. Utilizou-se como variáveis resposta as determinações de FPase e CMCase.

As variáveis estudadas nessa etapa de triagem, todas referentes aos componentes principais do meio de cultura, consistiram em: duas fontes de carbono, quatro fontes de nitrogênio e três sais. Então, foram estudadas as seguintes variáveis: pseudocaule da bananeira, sacarose, ureia, peptona, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cada fator foi testado em dois diferentes níveis: +1

(superior) e -1 (inferior), além dos pontos centrais (Tabela 6). Os valores reais (em g/L) atribuídos aos códigos estão expostos na Tabela 7.

Tabela 6 - Valores codificados para as variáveis estudadas no planejamento Plackett – Burman.

Testes	Pseudocaule da bananeira	Sacarose	Ureia	Peptona	Extrato de levedura	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15*	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Pontos centrais. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Fatores e respectivos níveis do delineamento Plackett – Burmann.

Variáveis (g/L)	Código	Níveis		
		-1	0	1
Pseudocaule da bananeira	x ₁	5,0	27,5	50,0
Sacarose	x ₂	5,0	27,5	50,0
Ureia	x ₃	0,3	0,6	0,9
Peptona	x ₄	0,75	1,5	2,25
Extrato de levedura	x ₅	0,25	0,5	0,75
(NH ₄) ₂ .SO ₄	x ₆	1,4	2,4	3,4
KH ₂ PO ₄	x ₇	2,0	4,0	6,0
MgSO ₄	x ₈	0,3	0,6	0,9
CaCl ₂	x ₉	0,4	0,8	1,2

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados experimentais foram ajustados de acordo com a seguinte equação de regressão linear (Equação 14):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i \quad (14)$$

Onde: Y representa a resposta de atividade de ambos os testes, β_i é o modelo do coeficiente linear e X_i é o nível da variável independente.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Logo, os dados obtidos das variáveis resposta correspondem à média dos valores de cada teste. As quantidades atribuídas às fontes de carbono (Pseudocaule da bananeira e sacarose) foram determinadas através de experimentos nos quais foram observadas as atividades enzimáticas nas diferentes concentrações do material sólido. As demais variáveis foram adotadas de acordo com o relatado na literatura (JUNG et al., 2015; MATKAR et al., 2013).

Os pontos centrais adotados no delineamento PB devem-se à necessidade de verificar precocemente a definição dos níveis inferiores (-1) e superiores (+1), conforme sugestão de Rodrigues e Iemma (2009).

4.10.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi desenvolvido para otimizar as variáveis mais significantes, identificadas na etapa de *screening* (DPB), com a finalidade de otimizar a produção de celulases totais (FPase) e CMCase. Para tanto, executou-se delineamento fatorial completo 2^4 , incluindo 8 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 27 experimentos. As tabelas 8 e 9 apresentam, respectivamente, os valores codificados e experimentais utilizados no planejamento.

Tabela 8 – Matriz experimental com valores codificados para as variáveis estudadas no planejamento DCCR.

Testes	Pseudocaule da bananeira	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	Ureia
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	- α	0	0	0
18	α	0	0	0
19	0	- α	0	0
20	0	α	0	0
21	0	0	- α	0
22	0	0	α	0
23	0	0	0	- α
24	0	0	0	α
25*	0	0	0	0
26*	0	0	0	0
27*	0	0	0	0

*Pontos centrais. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 9 - Fatores e respectivos níveis utilizados no delineamento DCCR.

Variáveis (g/L)	Código	Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
Pseudocaule da bananeira	x ₁	0	20,0	40,0	60,0	80,0
CaCl ₂	x ₂	0	1,2	2,4	3,0	4,8
KH ₂ PO ₄	x ₃	0	3,0	6,0	9,0	12,0
Ureia	x ₄	0	1,2	2,4	3,6	4,8

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados gerados através do DCCR foram utilizados para realizar uma modelagem matemática. Esta foi realizada através de regressão linear múltipla, através da qual foi determinado um modelo para cada uma das atividades enzimáticas utilizadas como resposta. Foi utilizado o *software* Statistica versão 10 para os tratamentos estatísticos e obtenção dos modelos, parâmetros, coeficientes dos termos e coeficientes de determinação.

Os resultados dos experimentos foram analisados, quanto à qualidade do ajuste dos modelos gerados, por Análise de Variância (ANOVA). A significância estatística de cada equação obtida foi avaliada por meio do coeficiente de regressão R^2 e a validação feita através do teste de distribuição de *Fischer* (F).

Apesar do componente Ureia não ter apresentado efeito significativo na seleção po Plackett-Burman, conforme será mostrado mais adiante em Resultados e Discussão, optou-se por inseri-lo no DCCR 2^4 , uma vez que foi a única fonte de nitrogênio com efeito positivo. De acordo com Rodrigues e Iemma (2009), em um planejamento experimental para 4 variáveis independentes, pode-se utilizar a estratégia de realizar um delineamento fracionado 2^{4-1} para, em seguida, realizar um fatorial completo 2^3 . Segundo os autores, este procedimento tem como objetivo verificar o impacto inicial dos fatores sobre a resposta e realizar um delineamento com somente 3 variáveis. No entanto, optamos por realizar o DCCR com 4 variáveis, com a finalidade de propiciar maior economia de tempo de experimentos e custos.

Aumentou-se a faixa dos níveis de todas as variáveis, se comparado aos níveis adotados no planejamento do tipo DPB, com o objetivo de estudar a indução de síntese da enzima em quantidades mais elevadas dos componentes.

Os dados experimentais foram ajustados de acordo com a seguinte equação quadrática de segunda ordem (Equação 15):

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_{ii} \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j \quad (15)$$

Onde Y representa a atividade enzimática; β_0 é o termo intercept, constante do modelo; β_i , β_{ii} e β_{ij} são, respectivamente, os coeficientes linear, quadrático e de interação; x_i e x_j são as variáveis independentes.

4.11. Testes em biorreator

O processo fermentativo foi conduzido em biorreatores New Brunswick, modelo Bioflo[®]/Celligen[®]310 (Figura 6), em regime de batelada simples, com um volume operacional de 4000 mL, temperatura mantida a 30°C e utilizando o fungo *T. amestolkiae* CMIAT 055. Nesta etapa, foi utilizada a composição do meio de cultura otimizado nos estudos de planejamento estatístico realizados em frascos Erlenmeyers (item 3.9.2.). Em todos os ensaios foram utilizados defletores, com a finalidade de evitar a formação de vórtex.

As fermentações submersas foram monitoradas durante 10 dias e os pontos experimentais coletados a cada 24 h. De cada ponto, foram coletados 40 mL de caldo fermentado, volume dividido para dois frascos do tipo Falcon, cada um com 20 mL de amostra. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 9600 g, durante 20 min, a 10°C. O precipitado foi utilizado para as análises de biomassa do fungo e conteúdo de celulose, e o sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas.

Figura 6 - Biorreator marca New Brunswick modelo Bioflo/Celligen 310



Fonte: elaborada pelo autor

Para tal, os estudos foram segmentados em quatro etapas distintas:

1. Processo fermentativo sem controle de pH, com impelidores do tipo Rushton e velocidade de agitação 150 rpm.
2. Processo fermentativo com manutenção do pH em 5,0, com impelidores do tipo Rushton e velocidade de agitação 150 rpm.
3. Processo fermentativo com manutenção do pH em 5,0, com impelidores do tipo *pitched blade turbine* e velocidade de agitação 150 rpm.
4. Processo fermentativo com manutenção do pH em 5,0, com impelidores do tipo *pitched blade turbine* e velocidade de agitação 300 rpm.

4.11.1. Controle de pH

Apesar dos estudos de pH inicial do meio de cultura (ítem 3.8.), fez-se necessário averiguar o comportamento de crescimento do fungo e produção enzimática mediante inspeção automatizada do pH durante o processo. Ainda que os resultados da primeira etapa de controle do potencial de hidrogênio tenham sido relevantes para direcionar as condições de produção de celulases, nos processos fermentativos em frascos Erlenmeyers, não foi possível obter um perfil de pH no meio de cultura de forma constante.

Logo, nesta etapa foram realizados dois estudos: comportamento de crescimento do fungo e produção enzimática sem controle de pH, assim como estudou-se o processo fermentativo com manutenção do pH em 5,0.

4.11.2. Comparação entre dois diferentes tipos de impulsores

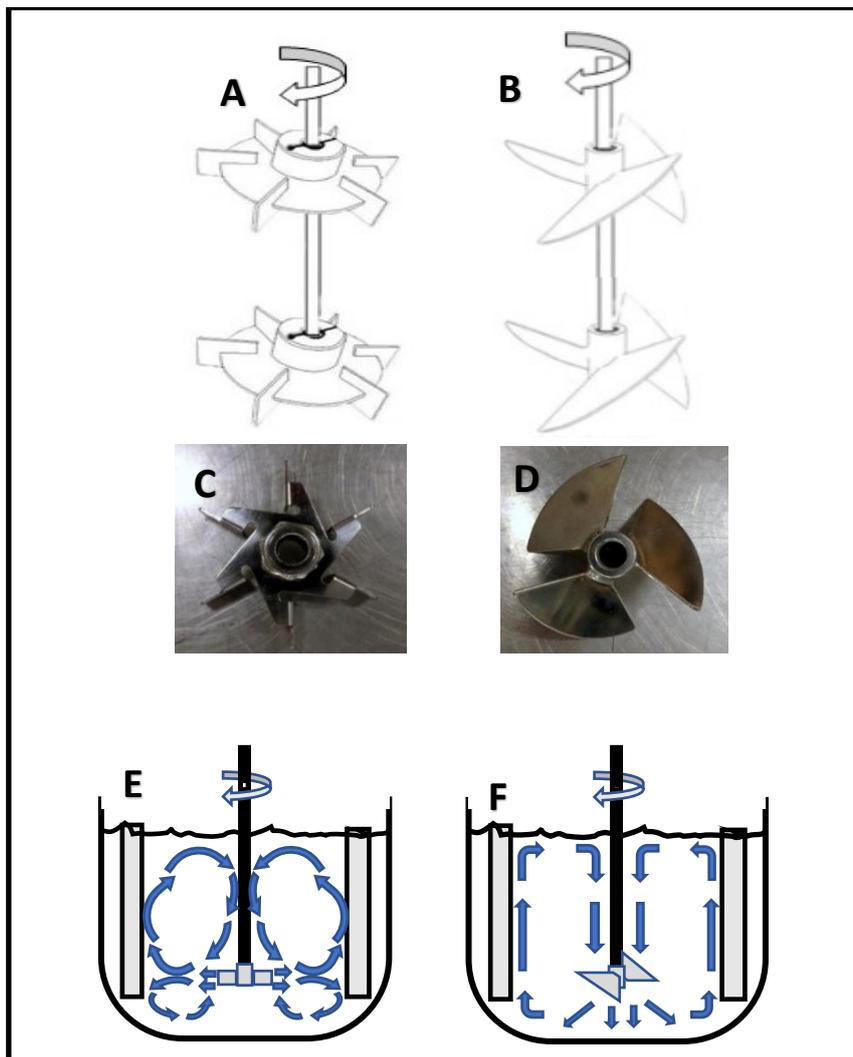
Em reatores do tipo tanque agitado (Stirred tank reactor – STR) os impulsores – também chamados de impelidores - constituem-se como a principal parte do reator que determina os efeitos da mistura (GHOBADI et al., 2017). Logo, a seleção adequada de impelidores em processos fermentativos submersos é de extrema importância para assegurar maiores produtividades, uma vez que a geometria do impelidor empregado influencia na hidrodinâmica do caldo fermentado, assim como na energia de consumo, na transferência de oxigênio e na morfologia dos microrganismos (principalmente em fungos filamentosos) (TANG et al., 2015).

Para a produção de celulases, geralmente utilizam-se reatores STR. No entanto, a produção da enzima pode ser influenciada negativamente devido à distribuição das tensões de cisalhamento que porventura podem causar danos ao desenvolvimentos dos microrganismos (AHAMED; VERMETTE, 2010b). Portanto, a importância desta etapa dos experimentos reside na obtenção de dados iniciais da influência dos impelidores no processo fermentativo submerso para produção de enzimas celulolíticas.

Foram estudados dois tipos de impulsores, acoplados a um eixo central, no processo de fermentação submersa: do tipo Rushton (RT) (Figuras 7A e 7C) e de lâminas inclinadas (*pitched blade turbine*) (Figuras 7B e 7D).

O primeiro, o mais utilizado nos processos fermentativos e também conhecido como impelidor de disco, produz um fluxo radial (Figura 7E) e é comumente utilizado em materiais que não são sensíveis às forças de cisalhamento. O segundo constitui-se de pás planas e foi projetado para misturas suaves sem causar grandes danos às células microbianas. Este último possui o perfil de distribuição do fluxo axial, no qual o material é direcionado para a base do reator e paralelo ao eixo do impelidor (Figura 7F).

Figura 7 - Esquema e fotografia dos impelidores Rushton e *Pitched blade*, assim como dos respectivos perfis de fluxo radial ou axial.



Figuras 7A e 7B, esquemas representativos de pares dos impelidores Rushton e PBT, respectivamente. Fonte: adaptado de Buffo et al. (2016). Figuras 7C e 7D, fotografia dos impelidores Rushton e PBT, respectivamente, utilizados nos experimentos. Fonte: elaborada pelo autor. Figuras 7E e 7F, esquemas respectivos dos fluxos radial e axial. Fonte: elaborada pelo autor.

4.12. Avaliação da influência da temperatura e pH na estabilidade da enzima

Os valores de pH pesquisados foram: 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Para tal, foram utilizados os tampões citrato 50mM (pH 3.0 – 6.0) e acetato de sódio 50 mM (pH 7.0 – 9.0).

A estabilidade do pH foi estimada a partir da atividade residual da enzima incubada a 50°C, com pH variando de 3 a 9, durante 1 h. Os dados foram comparados com a atividade enzimática obtida sob condições padrões (pH 4,8, 50°C, 50 minutos). Os

tampões utilizados foram tampões citrato 50mM (pH 3.0 – 6.0) e acetato de sódio 50 mM (pH 7.0 – 9.0).

Os resultados, obtidos através de experimentos em triplicata, foram expressos em termos de atividade enzimática residual (%), conforme a Equação 20. Onde A_r é a atividade residual; A_f é a atividade final de cada ponto experimental e A_0 é a atividade enzimática obtida sob condição padrão.

$$A_r = \frac{A_f}{A_0} \times 100 \quad (20)$$

4.13. Determinações Analíticas

4.13.1. Teor de Açúcares Redutores Totais

A determinação do teor de açúcares redutores totais foi feita pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), adaptado a partir da descrição de Vasconcelos; Pinto; Aragão (2013) . Para o preparo da solução de DNS, inicialmente pesaram-se 4,0 g de hidróxido de sódio, que foram solubilizados em 50 mL de água destilada (solução A). Em seguida, 2,5 g do reagente DNS foram homogeneizados na solução A recém-preparada (solução B). Preparou-se ainda, uma solução C, contendo 75,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos, sob agitação constante, em 125 mL de água destilada. Por fim, a solução B foi adicionada à solução C, sob aquecimento, até completa solubilização. Após resfriamento, a solução final teve seu volume ajustado para 250 mL em balão volumétrico. A solução foi armazenada, em temperatura ambiente, em frascos escuros para proteção contra a luz.

Por este método, ocorre uma redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico pela ação dos açúcares redutores, produzindo um complexo castanho-alaranjado. A concentração desse complexo colorido formado é proporcional à concentração de açúcares redutores presente na amostra. A curva de calibração utilizada foi determinada por padrões contendo glicose nas concentrações entre 0,1 e 1 g/L. O método consistiu em adicionar 1 mL da amostra a 1 mL da solução de DNS. A mistura resultante foi levada a banho-maria a 100 °C por 5 minutos e, em seguida resfriada com água corrente e agitada em vortex após a adição de 8 mL de água destilada. Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50) com comprimento de onda de 540 nm. Foi utilizada água destilada como branco, preparado

em condições idênticas a das amostras contendo açúcares. Com auxílio da curva padrão de glicose empregada, as leituras da absorbância a 540 nm foram transformadas em miligrama de açúcares redutores por mililitro de solução. Os resultados foram expressos em g/L e realizados em triplicata.

4.13.2. Determinação de celulases totais em papel de filtro (FPase)

A determinação da atividade de celulases totais seguiu adaptação da metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando papel analítico Whatman n° 1. Para a realização da análise, foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL do extrato bruto enzimático em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de tampão citrato (50 mM) pH 4,8. Os tubos, contendo a mistura, foram aclimatados em banho termostático a uma temperatura de 50 °C durante 5 minutos. Após a aclimação, adicionou-se, em cada tubo, uma tira de papel analítico (dimensões 1,0 x 6,0 cm) de modo que parte do papel ficasse submersa e em contato com a solução. Por fim, o extrato enzimático e o substrato foram incubados em banho termostático a 50 °C por 60 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O tempo zero da reação foi obtido adicionando-se 3,0 mL da solução de DNS em 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL da diluição do extrato enzimático após término de incubação das amostras. Após homogeneização da mistura, os tubos foram submetidos à fervura durante 5 minutos, resfriados e adicionados 20 mL de água destilada. Realizou-se, de forma análoga ao procedimento com amostra, o ensaio com 3,0 mL de solução de DNS em 1,5 mL de tampão citrato para zerar o espectrofotômetro.

A atividade enzimática foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores liberados na reação, através do método do DNS adaptado de Vasconcelos; Pinto; Aragão (2013), utilizando glicose como padrão. As atividades foram relatadas como FPU/L. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 16, onde Abs amostra = leitura de absorbância da amostra; Abs branco = leitura de absorbância do branco enzimático; dil = diluição do complexo enzimático; f = fator de conversão da curva padrão de glicose; 3 = diluição da enzima no meio reacional; 180 = peso molecular da glicose e 60 = tempo de reação (minutos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times f \times \text{dil} \times 3}{180 \times 60} \quad (16)$$

4.13.3. Determinação de endo- β -1,4 glucanases (CMCase)

A determinação da atividade de endoglucanases totais foi realizada conforme adaptação de Ghose (1987), através da análise de carboximetilcelulase. Uma alíquota de 0,5 mL da diluição do extrato bruto enzimático foi pipetada em tubos de ensaio, contendo 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose (CMC) (2% m/v) em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 4,8). O extrato enzimático e o substrato foram incubados em banho termostático a 50 °C durante 30 minutos.

A reação foi finalizada adicionando-se 1 mL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Após homogeneização, os tubos foram submetidos à fervura durante 5 minutos, resfriados e adicionados 8 mL de água destilada. O tempo zero da reação foi obtido adicionando-se 1,0 mL do reagente DNS em 0,5 mL de solução de CMC e 0,5 mL da diluição do extrato enzimático no início do tempo de incubação. A atividade enzimática foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores liberados na reação utilizando glicose como padrão (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de equivalentes de glicose por minuto nas condições de reação. As atividades foram relatadas como U/L. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 17, onde Abs amostra = leitura de absorbância da amostra; Abs branco = leitura de absorbância do branco enzimático; dil = diluição do complexo enzimático; f = fator de conversão da curva padrão de glicose; 3 = diluição da enzima no meio reacional; 180 = peso molecular da glicose; 30 = tempo de reação (minutos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times f \times \text{dil} \times 3}{180 \times 30} \quad (17)$$

4.13.4. Determinação do conteúdo de celulose

O conteúdo de celulose nas amostras do caldo fermentado foi determinado de acordo com Ahamed e Vermette (2009). Uma alíquota de 10 mL de cada ponto experimental foi centrifugada a 3000 g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta do tipo Pasteur. Após separação do material sólido, o mesmo foi suspenso em 3 mL de solução de ácido acético – nítrico, preparado na seguinte proporção: 150 mL de ácido acético 80% e 15 mL de ácido nítrico puro. Todo o material foi homogeneizado, submetido à fervura durante 30 min, resfriado e novamente centrifugado a 3000 g durante 10 minutos.

Posteriormente à hidrólise ácida, lavou-se a massa resultante com 10 mL de água destilada, seguido de centrifugação a 3000g/10 min. O material sólido resultante, composto principalmente de celulose, foi levado a secagem a 40°C, sob pressão reduzida, durante 48 h. Após resfriamento, foi realizada a pesagem dos sólidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.13.5. Determinação da biomassa seca

A biomassa seca dos fungos foi determinada através da medida do peso seco do sólido. Uma alíquota de 20 mL da cultura líquida representante de cada ponto experimental foi centrifugada a 9600 g, por 20 minutos. Em seguida, a massa foi lavada três vezes com 10 mL de água destilada e centrifugada nas mesmas condições supracitadas. A secagem do material foi realizada em estufa com pressão reduzida, na temperatura de 50 °C por 48 h. Após resfriamento, foi realizada a pesagem dos sólidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos microrganismos

O presente capítulo tem como objetivo apresentar o perfil de produção de celulases de 18 fungos isolados de solo da região amazônica, caracterizados quanto à produção enzimática em termos de atividade de FPAse (FPU/L) e CMCase (U/L). Os

dados de atividade enzimática foram confrontados com a produção de celulases por *T. reesei* RUT C30, um microrganismo geneticamente modificado, referência entre as linhagens fúngicas produtoras de celulases (LE CROM et al., 2009). Os fungos isolados do bioma amazônico foram designados como “selvagens”. Os dados das atividades de FPase estão expressos, em FPU/L, na Tabela 10.

Tabela 10 – Perfil de FPase na seleção de linhagens fúngicas.

Microrganismo	FPase (FPU/L)
RUT C30	743,9 ± 1,54
CMIAT 055	424,7 ± 3,03
CMIAT 049	94,5 ± 0,64
CMIAT 053	72,1 ± 1,3
CMIAT 048	56,6 ± 1,7
CMIAT 043	47,6 ± 2,0
CMIAT 051	46,8 ± 2,9
CMIAT 041	46,4 ± 2,5
CMIAT 044	44,4 ± 5,1
CMIAT 080	39,7 ± 1,0
CMIAT 056	39,3 ± 2,9
CMIAT 079	35,3 ± 0,1
CMIAT 039	28,6 ± 0,6
CMIAT 057	22,6 ± 0,1
CMIAT 040	18,8 ± 0,6
CMIAT 050	18,1 ± 2,9
CMIAT 059	17,5 ± 0,8
CMIAT 058	13,1 ± 4,0

Fonte: elaborada pelo autor.

Em relação ao perfil de celulases totais, a amostra CMIAT 055 destacou-se entre as demais, com atividade enzimática de 424,7 FPU/L, valor 44,9% maior que o segundo microrganismo selvagem com maior valor de FPase e menor 17,5% em relação ao perfil observado por *T. reesei* RUT C30 (743,9 FPU/L).

No que se refere aos valores obtidos da análise de endoglucanases (Tabela 11), observou-se um perfil semelhante ao de FPase, com maior produção de CMCase por RUT C30 (1605,1 U/L). Assim como nos resultados de FPase, a linhagem CMIAT 055 destacou-se entre as amostras de fungo isoladas de solo da Amazônia, com atividade de CMCase 600,9 U/L.

Tabela 11 – Perfil de CMCCase na seleção de linhagens fúngicas.

Microrganismo	CMCase (U/L)
RUT C30	1605,1 ± 4,7
CMIAT 055	600,9 ± 2,2
CMIAT 044	157,1 ± 2,9
CMIAT 053	140,9 ± 0,4
CMIAT 051	133,9 ± 0,3
CMIAT 079	105,0 ± 5,2
CMIAT 080	86,5 ± 0,3
CMIAT 049	82,2 ± 0,04
CMIAT 056	78,6 ± 0,7
CMIAT 048	54,9 ± 0,08
CMIAT 040	49,3 ± 2,2
CMIAT 043	46,7 ± 0,8
CMIAT 050	39,7 ± 2,1
CMIAT 059	37,4 ± 0,12
CMIAT 057	33,9 ± 0,01
CMIAT 041	22,7 ± 6,71
CMIAT 058	11,7 ± 0,05
CMIAT 039	2,6 ± 0,2

Fonte: elaborada pelo autor.

Conforme o esperado, *T. reesei* RUT C30 apresentou os maiores valores em ambas as análises enzimáticas, visto que é uma cepa padrão para produção de celulases. Nesta etapa, o uso deste fungo teve como objetivo estabelecer uma comparação com as amostras de fungos isolados de solo e assim mostrar o possível potencial de síntese de celulases pelos microrganismos designados como selvagens.

Olsson et al. (2003) analisaram variadas combinações de parâmetros para observar melhor expressão de endoglucanases por *Trichoderma* RUT C30 em condições próximas às utilizadas nos estudos desta tese: fermentação submersa com utilização do meio Mandels, 28°C e 7,5 g/L de celulose. O estudo observou valor máximo de 190,0 U/L de CMCCase, durante 106 h de processo fermentativo. O trabalho da literatura diferencia-se pela ausência de uma fonte solúvel de carbono e pela metodologia da análise de CMCCase com o uso de outra fonte de substrato e método colorimétrico.

Por outro lado, valores mais elevados de atividade foram relatadas por Callow e Ju (2012) em estudo da produção de celulases por *T. reesei* RUT C30 sob diferentes condições para induzir formação de *pellets*. Verificou-se uma produção em torno de 1000 FPU/L, com 50 h de fermentação em *shaker* orbital e lactose como fonte secundária de carbono. O mesmo foi mostrado por Juhász et al. (2005), que obtiveram valores próximos de 1100 FPU/L de FPase e 1500 U/L de CMCCase, durante sete dias de processo, em condições de fermentação submersa semelhantes aos utilizados nesta tese.

Conforme pode-se observar anteriormente, devido às diferenças nas composições dos meios de cultura e matérias-primas empregadas para síntese de celulasas, assim como nas condições de fermentação, torna-se dificultosa a comparação entre atividades enzimáticas de uma mesma linhagem em trabalhos reportados na literatura científica. Kuhad e colaboradores (2016) destacaram que, apesar de existirem métodos aprovados e recomendados pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), uma comparação direta das atividades de celulasas também se torna difícil devido ao fato do uso de diferentes métodos de detecção da enzima.

Jing e colaboradores (2015), isolaram e selecionaram fungos produtores de celulasas nas seguintes condições: 100 mL de meio de cultura líquido, pH 5.0, durante seis dias de processo e agitação 180 rpm. A amostra de fungo, identificada como *Penicillium oxalicum*, destacou-se das demais linhagens e apresentou atividades enzimáticas de 2740,0 FPU/L e 1300,0 U/L, valores respectivos para FPase e CMCCase. Os valores mais elevados das atividades enzimáticas apresentados neste trabalho, quando confrontados com o presente estudo, deve-se, possivelmente a dois principais fatores: os autores realizaram um estudo prévio dos componentes do meio de cultura antes da etapa de seleção, como uso de combinações de substratos lignocelulósicos e celulose pura; assim como trata-se de um fungo de gênero *Penicillium*, distinto da cepa estudada no presente trabalho. Várias linhagens do gênero *Penicillium* tem sido relatadas como secretoras de celulasas em valores comparáveis, ou até melhores, que fungos do gênero *Trichoderma*, o mais estudado e promissor em estudos acerca de enzimas celulolíticas (COSTA et al., 2016; GUSAKOV, 2013; ZHANG et al., 2014).

Ja'afaru et al. (2013) isolaram fungos produtores de celulasas e xilanases a partir de amostras de solos, serragem e madeira em decomposição. Na pesquisa destes autores predominou fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, com o primeiro apresentando maiores valores de atividade de CMCCase (*Trichoderma viride* FD18, 2210±8,49 U/L). Apesar deste trabalho utilizar processo fermentativo submerso com parâmetros similares aos utilizados nos estudos da tese, não foi possível estabelecer comparação dos resultados obtidos nas análises de CMCCase, visto que os autores utilizaram maiores quantidades de substrato na análise enzimática (0,9 mL). Logo, os autores diferiram da metodologia mais clássica para determinação de endoglucanases e adotada neste trabalho de tese, no qual utiliza-se 0,5 mL de celulose como substrato (EVELEIGH et al., 2009; GHOSE, 1987). Esta maior quantidade de substrato pode supervalorizar os resultados da atividade de

CMCase, uma vez que a análise baseia-se na detecção de 5% de açúcares liberados a partir da quantidade inicial do substrato utilizado na reação enzimática.

Apesar de muitos trabalhos na literatura reportarem microrganismos nativos de biomas brasileiros capazes de secretar enzimas lignocelulolíticas, conforme expõem os pesquisadores Valencia e Chambergo (2013) em um trabalho de revisão sobre fungos degradadores de biomassa vegetal no Brasil, são escassos os trabalhos da literatura científica dedicados à triagem de microrganismos celulolíticos isolados do bioma amazônico. Esta investigação é ainda menos encontrada em seleção utilizando o processo fermentativo submerso.

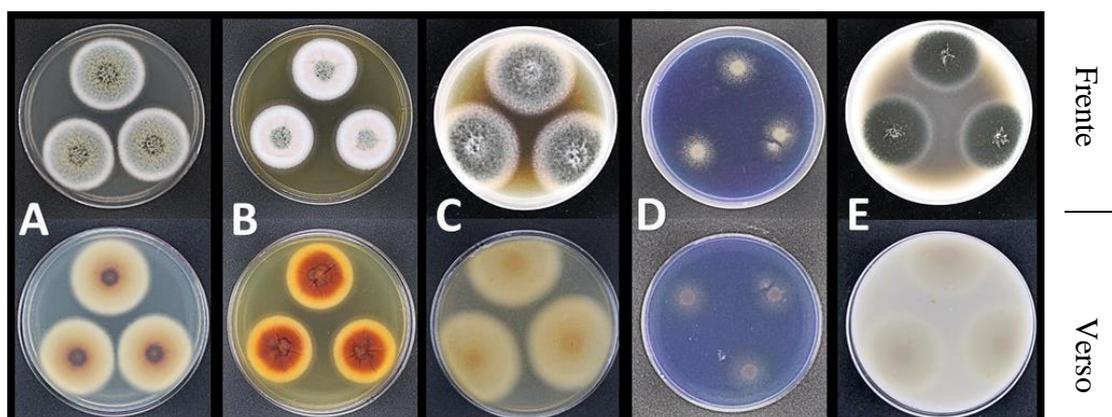
Dentre estes trabalhos, encontram-se o de Heck et al. (2002), Delabona et al. (2012) e Mendes et al. (2015), que isolaram microrganismos celulolíticos a partir de amostras de solo e vegetais da região amazônica. No entanto, em nenhum dos trabalhos foram identificadas linhagens de fungos do gênero *Talaromyces*.

Uma vez que a análise de FPase oferece uma dimensão da quantidade de todas as três enzimas pertencentes ao grupo das celulases, optou-se por manter tal análise como parâmetro para a escolha da linhagem CMIAT a ser estudada nas etapas seguintes. Face ao exposto, o microrganismo CMIAT 055, que mostrou maior potencial de produção de celulases em ambas as análises, foi o fungo escolhido para ser estudado de forma mais acurada.

5.2. Taxonomia da linhagem fúngica CMIAT 055

De acordo com as observações macromorfológicas no presente trabalho, a superfície das colônias apresentou coloração branca nas bordas e avermelhada no centro em meio de cultura CYA e azul esverdeado com verso marrom no cultivo em MEA, com a aparência de uma camada aveludada (Figura 8). No meio YES foram observadas gotas de exsudato na colônia após 10 a 14 dias de incubação, com colorações amareladas e laranja no verso. Por outro lado, o fungo desenvolveu-se lentamente e com pouco crescimento em meio CREA, com produção de substâncias alcalinas após 10 dias de incubação da cultura.

Figura 8 - Imagens da macromorfologia (frente e verso) de colônias da linhagem CMIAT 055 cultivada durante 7 dias.



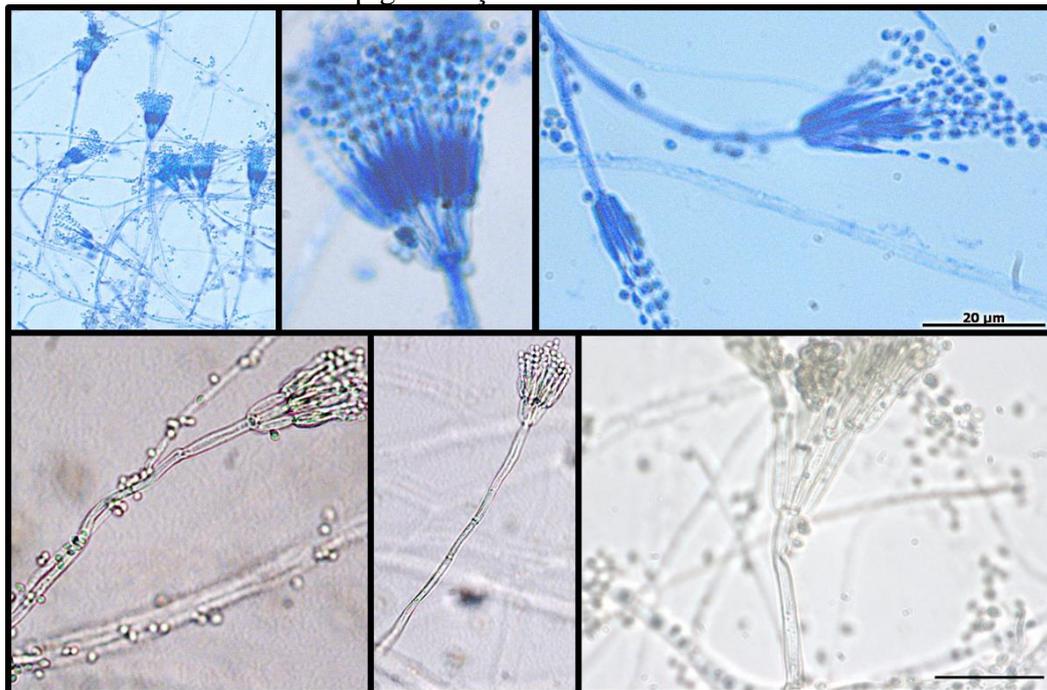
Meios de cultura utilizados: A – CYA, B – YES, C – MEA, D – CREA, E - OA. Fonte: elaborada pelo autor.

É válido ressaltar o aparecimento da coloração difusa na maioria dos meios de cultura, uma vez que a produção de pigmentos propalados no meio é utilizada como mecanismo importante para classificação taxonômica (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008). Segundo Frisvad et al. (1990), o perfil de formação de metabólitos secundários na forma de pigmentos em tons avermelhados é fundamental como critério de classificação taxonômica de fungos do gênero *Talaromyces*. O que difere em cada espécie são fatores como raio de difusão do pigmento e concentração do mesmo (SAMSON et al., 2011).

O perfil de crescimento do diâmetro da colônia fúngica, após uma semana de incubação, ficou assim observado: a 25°C: CYA: 39 mm; MEA: 46 mm; YES: 37 mm; CREA: 22 mm; Cz: 35 mm; OAT: 35 mm; CYAS: 15 mm. Diâmetro de crescimento da colônia fúngica após uma semana de incubação, a 37°C, em meio CYA: 9 mm.

Por outro lado, as análises da micromorfologia propiciaram a observação de hifas septadas, presença de conídios lisos, com forma de elipse e cadeias não ramificadas. Na Figura 9 mostra as estruturas de reprodução aumentadas em microscópio óptico, com e sem pigmentação da cultura fúngica.

Figura 9. Imagens da micromorfologia de colônias da linhagem CMIAT 055 cultivada durante 7 dias. Com e sem pigmentação das colônias.



Barra preta = 20 µm. Fonte: elaborada pelo autor.

Na análise das estruturas de reprodução do fungo observou-se também a presença de conidiósforos biverticulados, com alguns apresentando proporções subterminais (triverticulados) e alguns raros monoverticulados. Foram notados conídios com paredes lisas, em formato elipsoidal e tamanho $2,6 \times 2,10 \mu\text{m}$. Outras características: fiálide de $10,6 \times 2,4 \mu\text{m}$; metula cilíndrica tamanho $10,4 \times 2,6 \mu\text{m}$; rami $27,7 \times 2,8 \mu\text{m}$; stipes lisas, $108,1 \times 3,1 \mu\text{m}$; e não foi observada a presença de ascomatas. No que concerne à morfologia do fungo analisado, ao realizar comparação com dados da literatura, o conjunto de dados denotam que se trata do gênero *Talaromyces* (YILMAZ et al., 2012b).

A identificação da linhagem CMIAT 055 teve como suporte duas investigações importantes sobre a classificação taxonômica de amostras de *Talaromyces*: Samson et al. (2011) e Yilmaz et al., (2012). No primeiro trabalho, os autores estudaram a taxonomia e nomenclatura do estado telemórfico de *Talaromyces* através de dados filogenéticos e fenotípicos. O artigo teve como foco principal determinar as relações filogenéticas deste gênero e outras espécies de *Penicillium* subgênero *Biverticillium*, no qual todas as espécies deste segundo microrganismo foram transferidas para *Talaromyces*. Por sua vez, Yilmaz et al. (2012), realizaram estudo sobre a relação entre várias espécies de fungos do gênero *Talaromyces* utilizando as sequências ITS, RPB1, RPB2 e β -tubulina. Comparou-

se, então, algumas características fenotípicas de CMIAT 055 com *T. amestolkiae* CBS 132696^T, baseado no trabalho de Yilmaz et al. (2012) (Tabelas 12 e 13). A comparação entre as duas linhagens foi mais uma vez indicativo de que CMIAT 055 trata-se do fungo *T. amestolkiae*.

Tabela 12 - Visão geral das características macromorfológicas para identificação de CMIAT 055.

Fungo	Ascomata	Crescimento da colônia (mm)			Verso em meio CYA	Pigmentos solúveis em CYA	Textura da colônia em MEA	Produção de ácido em CREA
		CYA	CYA (37°C)	MEA				
<i>T. amestolkiae</i> (YILMAZ et al. 2012)	Ausência	30 -32	8 - 15	30 - 45	Violeta marrom	Pouca produção de vermelho a marrom ou ausente em algumas amostras	Algodonoso	Fraco
CMIAT 055	Ausência	39	9	46	Marrom	Ausência	Levemente algodonoso para aveludado	Fraco

CYA = Ágar Czapek extrato de levedura; MEA = Ágar Extrato de Malte; CREA = Ágar Sacarose Creatinina. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 13 - Visão geral das características micromorfológicas para identificação de CMIAT 055.

Fungo	Conidiósforos	Ornamentação dos conídios	Formato dos conídios	Tamanho dos conídios (µm)
<i>T. amestolkiae</i> (YILMAZ et al. 2012)	Biverticulados e, em menor proporção, com ramificações subterminais.	De suave a áspera	Elipsoidal	2 ~ 3 × 1,5 ~ 2,5
CMIAT 055	Biverticulados e, em menor proporção, com ramificações subterminais e alguns monoverticulados.	Suave	Elipsoidal	2,60 x 2,10

Fonte: elaborada pelo autor.

As características macro e microscópicas observadas no fungo CMIAT 055 corroboram com o trabalho de Nguyen; Paul e Lee (2016), em que os autores isolaram e caracterizaram *T. amestolkiae* (EML-NCP50) a partir de esterco de ratos e plantações de figo. As análises morfológicas e filogenéticas também foram baseadas utilizando a região do ITS e β -tubulina. Em meio CYA, as colônias também apresentaram coloração branco e amarelo, com centro avermelhado; assim com moderada esporulação em sete dias de incubação. O crescimento em Ágar YES apresentou rápido crescimento (34 ~36 mm de diâmetro) e com a mesma coloração apresentada por CMIAT 055. No entanto, não houve presença de exsudatos até o sétimo dia e o trabalho não especificou a presença destas estruturas após o décimo dia, conforme apresentado pelo fungo da presente pesquisa de tese.

Os autores também relataram o mesmo perfil macroscópico do fungo desenvolvido em meio MEA, com micélios na coloração branca predominantes e centro na cor vermelho. Por outro lado, não foi constatada a apresentação de pigmentos solúveis no Ágar. A tabela 14 apresenta, de forma sintetizada, características morfológicas similares de EML-NCP50 (NGUYEN; PAUL; LEE, 2016) e CMIAT 055.

Tabela 14 – Comparação de algumas características de CMIAT 055 com *T. amestolkiae* isolada por Nguyen; Paul; Lee (2016).

Fungo	Colônia em meio CYA	Fiálide	Metula	Conídios
CMIAT 055 ^a	Crescimento lento; diâmetro da colônia ~39 mm após 7 dias; micélios branco e amarelo, com centro vermelho.	10,6 x 2,4 µm	Biverticulados	De suave a áspero, tamanho 2,6 x 2,1 µm, elipsoidal.
EML-NCP50 ^b	Crescimento lento, diâmetro da colônia 21~24 mm após 7 dias, micélios branco e amarelo, vermelho no centro.	9,0 ~13,5, x 1,5~2,5 µm	Biverticulados	Suave, tamanho tamanho 2,5 ~4,0 x 1,0 ~3.,5 µm, elipsoidal.

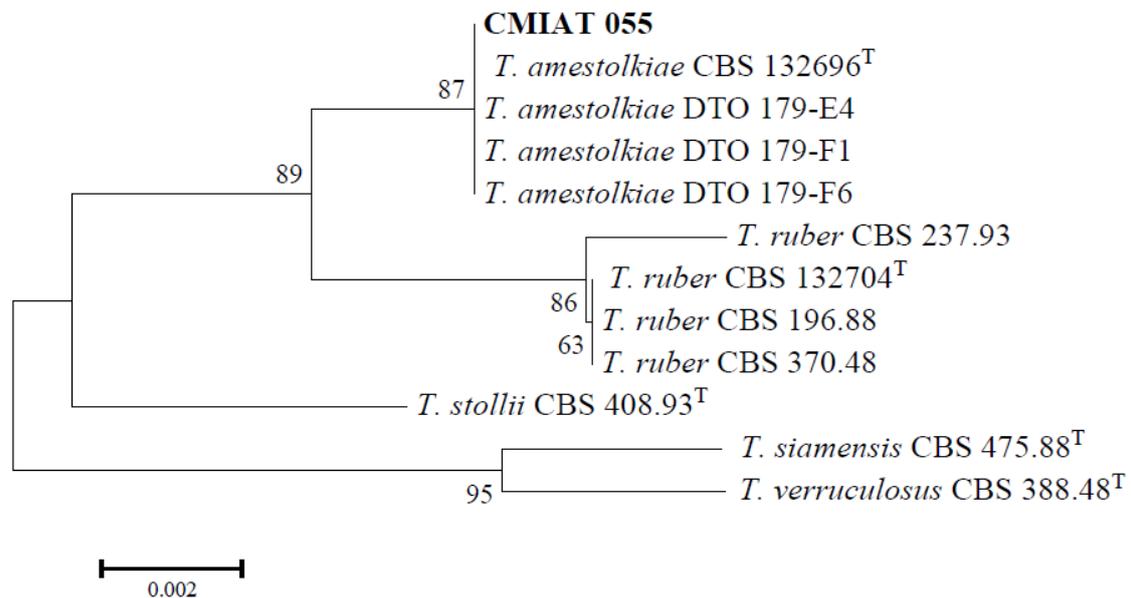
Fonte: ^a elaborada pelo autor, ^b Nguyen; Paul; Lee (2016)

As características fenotípicas estudadas não foram suficientes para ter certeza a qual espécie o fungo CMIAT 055 estava inserida. Portanto, foram utilizados dois marcadores moleculares (espaços intergênicos – regiões ITS 1 e ITS 2 e β -tubulina), conforme recomendado por Visagie et al. (2014a) e Yilmaz et al., (2014), que propõem o uso da β -tubulina como um marcador secundário adequado para identificação mais segura de espécies, novas ou já conhecidas, pertencentes ao gênero *Talaromyces*. O sequenciamento, alinhamento e análises filogenéticas foram realizadas com auxílio do software Mega Package (versão 6.0).

Tanto as análises filogenéticas da região do Espaço Interno Transcrito como da β -tubulina permitiram averiguar uma aproximação da cepa CMIAT 055 com espécies do gênero *Talaromyces*. E, mais especificamente, próximo da espécie *T. almestolkiae*. Yilmaz et al. (2014), em trabalho acerca da taxonomia polifásica do fungo *Talaromyces*, dividiu o gênero em sete ramos da árvore filogenética (*clades*), baseado na filogenia mutagênica, o que propiciou uma classificação do fungo em seções. Os autores então classificaram - baseado na filogenia multigênica ITS, BenA e RPB2 - *T. amestolkiae* CBS 132696^T na seção *Talaromyces*. O mesmo foi realizado por Visagie et al. (2014b) em estudo sobre identificação molecular de cepas de *Talaromyces* isoladas de amostras de poeira doméstica. Tais estudos então classificam o fungo utilizado nesta tese na mesma seção supracitada.

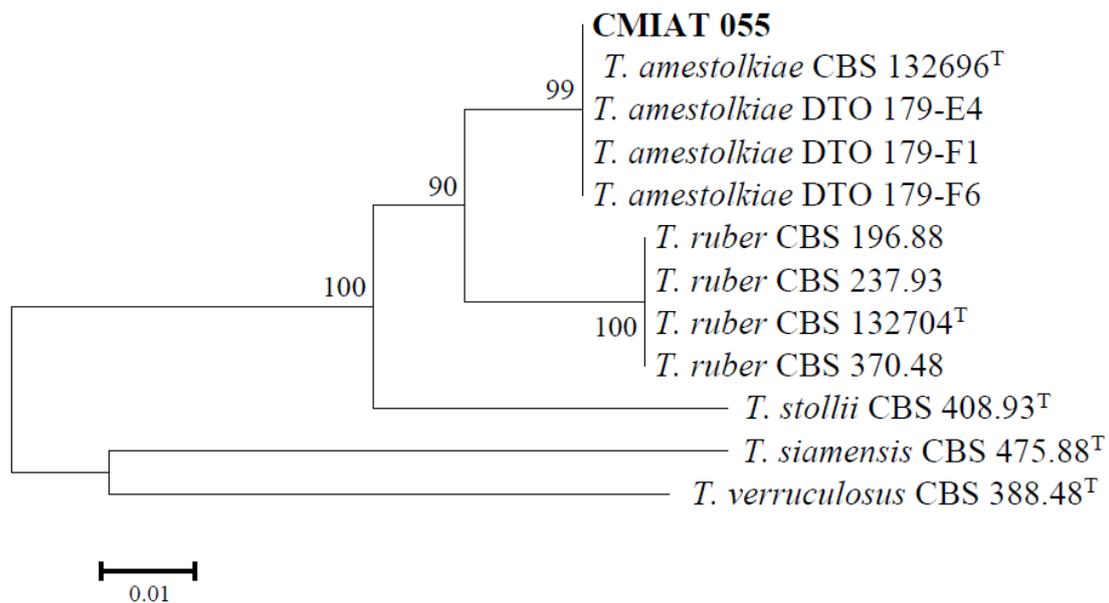
As figuras 10 e 11 mostram, respectivamente as filogenias baseadas no ITS e β -tubulina, nas quais estão expostas as relações entre a linhagem deste estudo de tese, em **negrito**, com outros membros de *Talaromyces* seção *Talaromyces*.

Figura 10 - Dendograma baseado na análise *Neighbour – joining* derivado das sequências das regiões ITS.



Os números nas ramificações representam os valores do teste de *bootstrap* (1000 réplicas), no qual somente os valores > 50% foram reportados. Fonte: elaborada pelo autor.

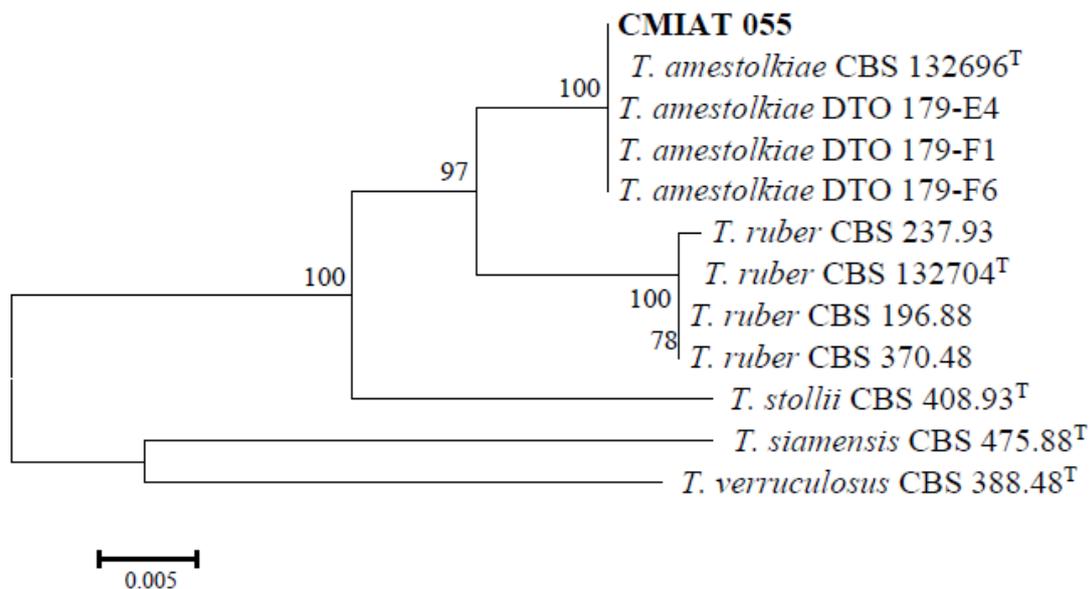
Figura 11 - Dendrograma baseado na análise *Neighbour – joining* derivado da β -tubulina.



Os números nas ramificações representam os valores do teste de *bootstrap* (1000 réplicas), no qual somente os valores > 50% foram reportados. Fonte: elaborada pelo autor.

As análises também foram realizadas de forma concatenada, que novamente denotou uma proximidade da amostra analisada com a espécie *almestolkiae* (Figura 12). Logo, baseado nas análises moleculares, conclui-se que a linhagem estudada CMIAT 055 corresponde ao fungo *T. amestolkiae*.

Figura 12 - Filogenia *Neighbour – joining* a partir de genes concatenados ITS + β -tubulina.



Os números nas ramificações representam os valores do teste de *bootstrap* (1000 réplicas), no qual somente os valores > 50% foram reportados. Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com o observado nas árvores genealógicas das Figuras 11 e 12, notou-se uma proximidade maior com dois grupos, tratados como duas diferentes espécies: *Talaromyces ruber* e *Talaromyces stollii*. Este mesmo perfil está de acordo com outros trabalhos reportados na literatura científica acerca da identificação molecular de *T. amestolkiae* (NGUYEN; PAUL; LEE, 2016; YILMAZ et al., 2012).

Baseado em observações realizadas por Yilmaz et al. (2012) em linhagens de *T. ruber*, esta aproxima-se morfologicamente da CMIAT 055 devido à textura aveludada em meio de cultura CYA e MEA cultivados a 25°C, assim como a presença das colorações amarelo e vermelho no verso da cultura.

Por outro lado, *T. ruber* diferencia-se da fraca produção de ácido, em meio CREA, por *T. amestolkiae*. Em contrapartida, o perfil de crescimento em meio CREA é

semelhante entre *T. stollii* e *T. amestolkiae*, mas diferenciam-se no crescimento em meio CYA a 37°C, no qual *T. stollii* cresce mais rapidamente.

A linhagem *T. dendriticus* CBS 600.80^T foi escolhida como *out-group*, ou seja, uma fração de código genético que conhecidamente é mais distante do resto do grupo e a árvore passa a ser enraizada ao ramo que liga esta proteína aos outros grupos.

Logo, baseado nos resultados de sequenciamento e morfologia obtidos no presente trabalho, a linhagem CMIAT 055 foi identificada como *Talaromyces amestolkiae*. As sequências do ITS e BenA do fungo foram depositadas no Genbank com os números de acesso respectivos KX827631 e KX827632.

O gênero *Talaromyces* constitui-se como um importante gênero fúngico largamente reportado na literatura como produtor de compostos bioativos, tais como ácidos orgânicos, pigmentos e enzimas (CHEN et al., 2016; DUFOSSÉ et al., 2014; ORENCIO-TREJO et al., 2016; YILMAZ et al., 2012a). Este fungo possui uma ampla distribuição mundial e pode ser isolado a partir de uma ampla gama de substratos: desde habitats humanos, presente em poeira e ar e associado a problemas de saúde do trato respiratório (VILLANUEVA-LOZANO et al., 2017); assim como em solos e vegetações pertencentes à diferentes biomas.

Dentre os escassos trabalhos acerca da síntese de celulasas por *T. amestolkiae*, encontra-se o artigo publicado por De Eugenio et al. (2017), que pesquisaram a produção, purificação e caracterização de β -1,4-endoglucanases secretadas por este microrganismo. Como fonte de carbono do processo fermentativo submerso (28°C, 180 rpm), os autores compararam o uso de celulose avicel com farelo de aveia, farinha de trigo e palha de trigo, todos na proporção de 1% (p/v). A maior produção de endoglucanases (CMCase) foi observada com avicel como fonte indutora, com atividade em torno de 3500 U/L, em 10 dias de cultivo. Valores menores foram relatados nesta tese devido, possivelmente, ao menor tempo de fermentação, de quatro dias.

Tendo em vista que trabalhos científicos envolvendo a síntese de enzimas celulolíticas por *T. amestolkiae* ainda são pouco explorados na literatura, aliado ao fato da inexistência de relatos do isolamento deste fungo a partir de materiais orgânicos de bioma amazônico, demonstram a pertinência da presente investigação.

5.3. Uso de materiais lignocelulósicos nas etapas do processo fermentativo submerso

5.3.1. Avaliação do uso de material lignocelulósico no preparo do inóculo

A Tabela 15 mostra os valores das atividades enzimáticas de FPase e CMCase após processo fermentativo usando os diferentes meios de cultura no desenvolvimento do inóculo.

O uso de farelo de trigo sem diminuição e padronização das partículas mostrou ser mais indutivo para a síntese de enzimas celulolíticas totais, com atividade de FPase 616,6 FPU/L. Tal valor de atividade enzimática foi maior do que o observado com o uso do meio sintético BDA (419,5 FPU/L) e este mesmo perfil foi verificado também no uso de farelo de trigo com padronização das partículas, assim como sabugo de milho nas duas formas.

Tabela 15 – Atividade de FPase com uso de biomassa lignocelulósica no pré-inóculo de *T. amestolkiae*.

Material lignocelulósico	FPase (FPU/L)	CMCase (U/L)
BDA	419,5 ± 0,7	600,1 ± 1,2
BC	416,5 ± 1,7	1047,0 ± 0,3
BC t	267,5 ± 1,1	1064,5 ± 5,0
FT	616,6 ± 2,0	1157,6 ± 5,3
FT t	478,5 ± 0,6	1372,9 ± 1,6
SM	447,3 ± 0,8	1165,7 ± 2,8
SM t	424,9 ± 1,8	1232,6 ± 0,5

BDA = Ágar Batata Dextrose; BC = bagaço de caju; FT = farelo de trigo; SM = sabugo de milho.

Fonte: elaborado pelo autor.

Pelo fato da atividade enzimática de FPase englobar o perfil de produção das três enzimas que atuam de forma sinérgica, os valores da síntese de celulases totais foram maiores no material sem diminuição das partículas devido, possivelmente, ao fato de que a celulose menos processada possui maior cristalinidade, o que pode ter favorecido a maior secreção e atuação das três enzimas em conjunto.

Por outro lado, a diminuição da biomassa vegetal e padronização das partículas foram mais propícias para a síntese de endoglucanases, a primeira das enzimas que atuam nas regiões internas da celulose diminuindo o grau de polimerização da mesma. A

diminuição e padronização das partículas podem ter facilitado a atuação de CMCase, ao expor as regiões amorfas da região que contém celulose.

Conforme enfatizam Hendriks; Zeeman (2009), a diminuição do tamanho das partículas do material celulósico, com consequente aumento da área superficial, estende as áreas de hidrólise, uma vez que expõe as regiões amorfas. Além disso, a porosidade do material a ser utilizado também é relevante no acesso da enzima ao substrato, conforme observado por Jager et al. (2011), em trabalho acerca do comportamento de celulasas de *T. reesei* em diferentes conformações das partículas do material celulósico estudado.

Logo, os materiais que foram mais processados apresentaram um perfil mais indutor para produção de CMCase. O farelo de trigo triturado apresentou a maior produção de endoglucanases com atividade 1372,9 U/L, valor 228,1% maior que o apresentado pelo meio de cultura sintético. Diferente da análise de FPase, todos os meios de cultura contendo biomassa lignocelulósica apresentaram maiores sínteses de CMCase frente ao uso de BDA.

A Tabela 16 mostra, com dados da literatura, a composição das frações de celulose, hemicelulose e lignina de bagaço de caju, farelo de trigo e sabugo de milho. A maior quantidade de celulose e menor percentual de lignina no farelo de trigo pode ter induzido a síntese de enzimas celulolíticas nas gerações subsequentes de *T. amestolkiae*, e este tornou-se mais adaptado no meio líquido com celulose pura como principal fonte de carbono para produção de celulasas.

Tabela 16 – Composição centesimal de bagaço de caju, farelo de trigo e sabugo de milho baseado em dados da literatura.

Biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas	Metodologia adotada	Referência
	17,73	19,22	33,41	6,41	1,5	-	Albuquerque et al. (2014)
Bagaço de caju	20,6 ± 2,2	10,2 ± 0,9	35,3 ± 0,9	7,8 ± 0,6	1,6 ± 0,1	Gouveia et al. (2009); Sluiter et al. (2008)	Costa et al. (2015)
	18,16 ± 0,8	12,83 ± 2,0	43,28 ± 4,2	5,89 ± 0,3	3,32 ± 0,7	Sluiter et al. (2008)	Reis et al. (2017)
Farelo de trigo	35,02	24,1	3,85	-	19,56	Goering; Van Soest (1970)	Zhang; Li; Fadel (2002)
	34,8	25,2	17,7	-	7,0	Sluiter et al. (2008)	Kristensen et al. (2007)
Sabugo de milho	27,7	40,4	18,3	2,7	3,2	Wise (1946)	Rabemanolontsoa; Ayada; Saka (2011)
	16,29	43,34	33,65	2,6	2,56	-	Ayeni; Daramola (2017)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os mesmos experimentos também foram realizados com a linhagem padrão *T. reesei* RUT C30, com a finalidade de verificar o comportamento de um fungo conhecido por ser produtor de celulases, assim como averiguar o comportamento de uma espécie diferente do gênero *Talaromyces*. Nas tabelas 17 está exposto o comportamento de *T. reesei* RUT C30, de acordo com análises de FPase e CMCCase, frente aos mesmos substratos lignocelulósicos utilizados para propagação do inóculo de *T. amestolkiae*.

Tabela 17 – Atividade de FPase com uso de biomassa lignocelulósica no pré-inóculo de *T. reesei* RUT C30.

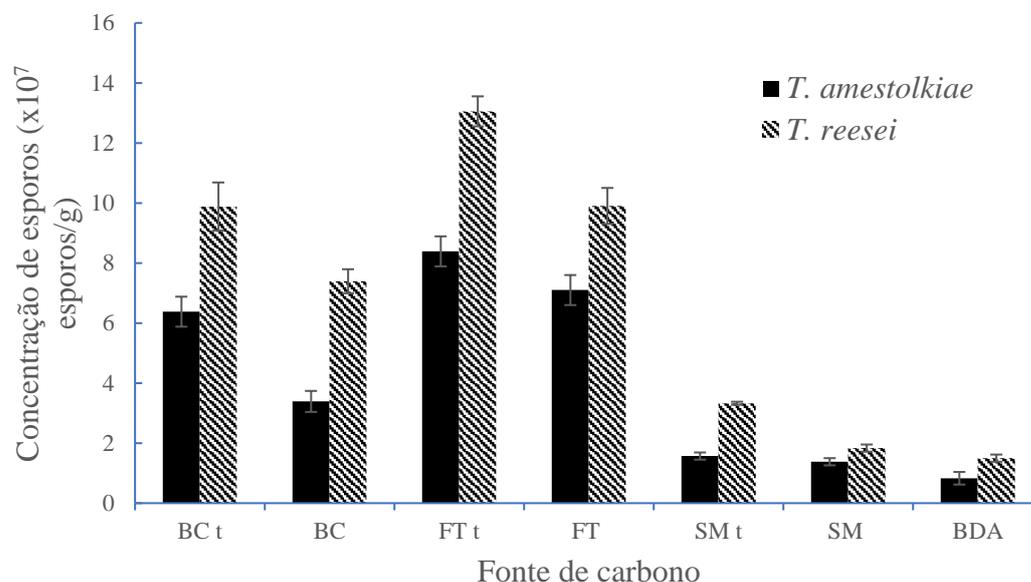
Material lignocelulósico	FPase (FPU/L)	CMCase (U/L)
BDA	743,1 ± 0,5	1605,4 ± 0,9
BC	343,9 ± 6,3	1060,4 ± 2,1
BC t	262,3 ± 4,5	1947,3 ± 2,2
FT	900,2 ± 0,9	1608,2 ± 3,0
FT t	424,1 ± 4,8	1960,7 ± 7,8
SM	247,5 ± 1,2	385,4 ± 0,7
SM t	178,5 ± 3,0	463,5 ± 2,3

BDA = Ágar Batata Dextrose; BC = bagaço de caju; FT = farelo de trigo; SM = sabugo de milho, t = material triturado e peneirado. Fonte: Elaborada pelo autor.

Constatou-se o mesmo perfil dos experimentos anteriores, com maior produção de celulases totais em farelo de trigo, com atividade 900,2 FPU/L. Maiores sínteses de CMCCase foram obtidas em meio FT triturado (1960,7 U/L) e BC triturado (1947,3 U/L).

O farelo de trigo também foi o meio de cultura onde houve maior multiplicação de esporos fúngicos, durante o período de incubação, com dados obtidos através da contagem de esporos totais. Tomando como base somente os dados de produção de FPase, não foi possível estabelecer uma relação entre maiores sínteses de celulases totais e propagação de esporos de *T. amestolkiae* e *T. reesei*, uma vez que os materiais mais particulados propiciaram maiores concentrações dos fungos, em 10^5 esporos por grama de biomassa vegetal (Figura 13).

Figura 13 – Perfil de propagação de esporos fúngicos de *T. reesei* RUT C30 e *T. amestolkiae* cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos.



BDA = Ágar Batata Dextrose; BC = bagaço de caju; FT = farelo de trigo; SM = sabugo de milho, t = material triturado e peneirado. Fonte: Elaborada pelo autor. Fonte: elaborada pelo autor.

Todos os meios de cultura compostos por material lignocelulósico proporcionaram maiores concentrações de esporos fúngicos frente ao meio sintético BDA, com destaque para o farelo de trigo que foi a biomassa vegetal que mais induziu a multiplicação dos conídios de ambos os fungos, com contagens $8,4 \times 10^7$ esporos/g de *T. amestolkiae* e $13,1 \times 10^7$ esporos/g de *T. reesei*. A relevância destes resultados deve-se ao fato de que os meios constituídos de biomassa vegetal, que propiciaram maior multiplicação de esporos de *T. amestolkiae*, se constituem como uma opção mais barata para propagação de esporos, frente ao uso de um meio de cultura sintético.

Além disto, conforme enfatizam Farias et al. (2010), as desvantagens no uso de meio sintético sólido para propagação de esporos, além da baixa produção, acontecem devido à perdas na recuperação das células microbianas no meio solidificado. Estes mesmos autores realizaram um estudo comparativo de produção de esporos de *Aspergillus niger* em dois distintos meios de cultura: BDA e meio semi-sólido composto por sabugo de milho triturado. Assim como no presente estudo de tese, as maiores contagens foram observadas no meio elaborado com o material lignocelulósico.

As maiores concentrações de esporos foram observadas nos materiais mais particionados. Tal perfil é discutido no trabalho de Miranda-Hernández; Angel-Cuapio; Loera-Corral (2017), em quem os autores afirmam que, para o desenvolvimento e propagação de conídios, o substrato ideal é aquele que possui maiores áreas superficiais para propiciar aeração ao microrganismo e aumentar o contato do fungo com os nutrientes. Se as partículas estiverem agrupadas, a área superficial da biomassa é reduzida e tal fato pode limitar a esporulação.

O estudo das condições de cultivo do inóculo para produção de celulasas é uma das etapas menos estudadas na síntese desta enzima. No entanto, o estudo das condições de cultivo do inóculo pode auxiliar na indução e manutenção da síntese de metabólitos de interesse, evitando a instabilidade genética de gerações subsequentes (MORAES et al., 2014). No que se refere ao preparo de inóculo para síntese de enzimas, é possível estudar condições de cultivo que contemplem dois resultados almejados: maior eficiência na propagação de esporos fúngicos e melhor adaptação destes a meios de cultura contendo material celulósico como principal fonte de carbono.

Logo, conforme visto anteriormente, o farelo de trigo apresentou maiores concentrações de celulose na sua constituição, fato que pode ter influenciado na maior capacidade indutora para síntese de celulasas frente aos outros materiais testados. O uso desta biomassa também foi mais propício para a propagação de esporos sexuais fúngicos. Face ao exposto, optou-se por utilizar, nas etapas seguintes dos experimentos, o farelo de trigo sem padronização das partículas, visto que adotou-se como parâmetro principal os dados dos valores de celulasas totais.

5.3.2. Utilização de material lignocelulósico como substituto da celulose pura na produção de celulases

De acordo com os resultados obtidos nas análises de FPase e CMCase (Tabela 18), denotou-se a necessidade da presença de sacarose no meio de cultura, uma vez que em todos os experimentos as atividades enzimáticas foram maiores no meio fermentativo enriquecido com o açúcar solúvel. Devido ao caráter insolúvel em água dos materiais sólidos utilizados, os mesmos, quando usados como única fonte de carbono, não foram suficientes para estimular por completo a síntese de celulases. Assim como o meio de cultura constituído somente com o açúcar solúvel não foi suficiente para induzir a secreção da enzima.

Tabela 18 – Atividades enzimáticas com uso de biomassa lignocelulósica no meio de produção de celulases.

Fonte de carbono	FPase (FPU/L)	CMCase (U/L)
SAC	15,2 ± 1,1	56,7 ± 0,7
CEL	351,4 ± 0,6	685,4 ± 3,4
CEL + sac	615,7 ± 0,5	1510,1 ± 1,7
CMC	60,8 ± 0,7	557,0 ± 0,9
CMC + sac	112,4 ± 1,1	1006,9 ± 1,2
BC	65,6 ± 1,8	173,6 ± 5,9
BC + sac	119,1 ± 1,7	262,8 ± 0,8
FT	140,8 ± 2,8	226,9 ± 0,3
FT + sac	237,7 ± 6,0	304,3 ± 1,5
PB	207,2 ± 2,4	1300,7 ± 4,7
PB + sac	292,5 ± 0,2	1536,5 ± 2,7
SM	82,9 ± 1,8	177,9 ± 0,7
SM + sac	192,1 ± 1,6	359,6 ± 0,5

BC = bagaço de caju, CEL = celulose microcristalina, CMC = carboximetilcelulose, FT = farelo de trigo, SM = sabugo de milho, PB = pseudocaule da bananeira, sac = adição de 1% (p/v) de sacarose no meio de cultura líquido. Fonte: Elaborada pelo autor.

Relevantes estudos da literatura científica admitem que, para maiores rendimentos na obtenção de celulases por processo fermentativo submerso, faz-se necessária a presença de fontes de carbono suplementares com menor peso molecular, como glicose, frutooligosacarídeos, lactose e sacarose. Apesar dos materiais celulósicos serem os mais adequados para induzir a síntese de celulases pela maioria dos microrganismos, estes

necessitam da presença de fontes de carbono mais facilmente assimilável em um estágio anterior à produção da enzima, devido à necessidade de desenvolvimento e propagação da biomassa microbiana (DELABONA et al., 2012a; LIBARDI et al., 2017).

Delabona et al. (2012) testaram as fontes de carbono solúveis como glicerol, frutooligosacarídeos e sacarose, como suplementos no meio de cultura líquido com bagaço de cana de açúcar como fonte principal de indutor para síntese de celulases, utilizando *Trichoderma harzianum*. Assim como nos resultados mostrados nesta tese, os autores também verificaram que o uso isolado da sacarose apresentou as menores atividades enzimáticas (420,0 FPU/L para FPase em 96 horas). Por outro lado, os cultivos com o uso do açúcar solúvel apresentaram maiores atividades enzimáticas de celulases totais, quando combinado com o bagaço de cana-de-açúcar. Neste mesmo trabalho foi verificado também que o uso da sacarose, se comparado ao meio de cultura composto somente com o material insolúvel, reduziu o tempo requerido para a atividade máxima de FPase, de 96 para 72 horas.

Já Libardi et al. (2017) testaram a influência de sacarose para a síntese de celulases como suplemento de meio de cultura, na quantidade de 5g/L, composto principalmente por águas residuais de esgoto. Apesar de ter sido a fonte de carbono alternativa à celulose que mais influenciou na produção de celulases totais ($8,0 \pm 0,3$ FPU/mL) e CMCCase ($11,6 \pm 0,5$ U/mL), estes resultados não foram suficientes para justificar o uso do açúcar como suplemento. Visto que, nas composições do meio de cultura nas quais não havia adição de sacarose, as atividades enzimáticas foram similares.

No presente trabalho observou-se um destaque para o meio de cultura com celulose pura e sacarose, cujas atividades de FPase e CMCCase foram, respectivamente, 615,7 FPU/L e 1510,1 U/L. Por outro lado, o experimento composto por PB como material celulósico e sacarose apresentou a maior atividade enzimática dentre todos os experimentos, com 1536,5 U/L. A relevância dos resultados obtidos com uso do resíduo da bananeira também reside no fato de que as atividades enzimáticas foram maiores se comparadas àquelas obtidas com carboximetilcelulose como fonte indutora. Esta mesma biomassa vegetal também se destacou dentre os outros materiais lignocelulósicos, com a maior indução de celulases totais (292,5 FPU/L).

O maior efeito indutor de celulasas evidenciado pelo pseudocaule da bananeira pode ser justificado através da composição centesimal desta biomassa frente aos outros materiais já expostos na Tabela 16. Após a observação de melhores resultados na síntese de celulasas utilizando PB, este material foi caracterizado quanto a porcentagem de cinzas, extrativos, celulose (alfacelulose), hemicelulose e lignina (insolúvel e solúvel). Na tabela 19 está descrita a composição centesimal do pseudocaule da bananeira na forma *in natura*.

Tabela 19 – Caracterização do pseudocaule da bananeira *in natura*.

Amostra	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos
PB In natura	37,2 ± 1,6	22,0 ± 1,8	11,31 ± 2,3	7,58 ± 0,6	1,16 ± 0,01

Fonte: elaborada pelo autor.

É válido ressaltar que o pseudocaule da bananeira utilizado nos experimentos se trata da amostra de *Musa spp.*, cultivar Pacovan. Esta informação torna-se relevante visto que, para efeitos de comparação com outros trabalhos de caracterização deste mesmo material, deve-se levar em consideração que a composição do vegetal varia de acordo com o local de coleta e a variedade, dentre outros fatores (JAYAPRABHA; BRAHMAKUMAR; MANILAL, 2011).

Isto está evidenciado na Tabela 20, que expõe a composição dos constituintes de pseudocaule da bananeira relatada em trabalhos da literatura científica. Tal fato mostra a dificuldade de comparação entre variados perfis centesimais obtidos a partir dos resultados desta tese e os divulgados na literatura. No entanto, em ambos os casos, observou-se a maior prevalência de fração celulósica frente aos outros constituintes como hemicelulose e lignina.

Tabela 20 – Valores de referência da literatura científica para caracterização do pseudocaule da bananeira (em % de material seco).

Referência	Local	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos
Guimarães et al. (2009)	Brasil	50,15	0,77	17,44	4,14	-
Bilba; Arsene; Ouesanga (2007)	Caribe	31,27	14,98	15,07	8,65	4,46
Jústiz-Smith; Virgo; Buchanan (2008)	Jamaica	43,46	38,54	9,0	8,3	-
Abdullah et al. (2014)	China	44,0	17,5	37,3	11,0	9,7

Fonte: elaborada pelo autor.

Realizando um comparativo quanto ao teor de celulose presente no farelo de trigo (em torno de 35%, segundo dados da literatura) e no pseudocaule da bananeira (37,2%, segundo dados experimentais do presente trabalho), estes possuem frações centesimais próximas e tal característica possivelmente influenciou nas maiores atividades de celulases totais, no meio com sacarose, dentre os materiais lignocelulósicos analisados: 292,5 e 237,7 FPU/L, respectivamente dos ensaios com uso de PB e FT. O fato dos resíduos de frutas possuírem maiores concentrações de açúcares solúveis e maior acessibilidade aos polissacarídeos do material, quando comparados com o farelo de trigo, possivelmente favoreceu um crescimento mais abundante do fungo no pseudocaule da bananeira e promoveu melhor assimilação ao material celulósico (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINGCKX, 2008).

Resultados similares, mas utilizando outras linhagens fúngicas, foram encontrados por Elisashvili; Kachlishvili; Penninckx (2008). Neste trabalho, foram determinados os perfis de síntese de FPase, CMCase e xilanases de seis distintos gêneros de fungo, utilizando, dentre outros materiais vegetais, farelo de trigo e resíduos oriundos de plantações de bananeira. Os autores obtiveram um perfil parecido com os apresentados nesta tese, em que em todos os microrganismos expressaram maiores atividades enzimáticas de FPase e CMCase quando crescidos nestes dois materiais vegetais supracitados.

Após confirmar a necessidade de uma fonte de carbono solúvel no meio de cultura, verificou-se o potencial de indução da enzima utilizando o material vegetal deslignificado, conforme tratamento descrito no ítem 4.1.2. A Tabela 21 mostra os resultados das análises enzimáticas.

Tabela 21 – Atividade de FPase e CMCase com uso de biomassa lignocelulósica tratada no meio de produção de celulases.

Material lignocelulósico tratado	FPase (FPU/L)	CMCase (U/L)
BC	46,0 ± 3,2	210,1 ± 0,9
FT	210,4 ± 0,7	252,3 ± 2,7
SM	102,9 ± 1,6	220,3 ± 1,5
PB	256,4 ± 3,8	957,4 ± 0,9

BC = bagaço de caju, FT = farelo de trigo, SM = sabugo de milho, PB = pseudocaule da bananeira. Os ensaios foram conduzidos com sacarose 1% (p/v) no meio de cultura. Fonte: elaborada pelo autor.

A composição centesimal de celulose, cinzas, extrativos, hemicelulose e lignina das amostras de pseudocaule da bananeira após passar pela etapa de tratamento ácido-base está descrita na Tabela 22. Observa-se que o objetivo do tratamento para deslignificação da biomassa vegetal foi eficiente, visto que o teor de lignina diminuiu de 11,31% para 1,75%.

Tabela 22 – Caracterização do pseudocaule da bananeira in natura e após tratamento ácido-base.

Amostra	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos
PB Pré- tratado	83,9 ± 5,2	8,0 ± 0,7	1,75 ± 0,01	1,59 ± 0,09	1,26 ± 0,01

Fonte: elaborada pelo autor.

Segundo Silva et al. (2017), não há consenso na literatura científica específica acerca da relação entre o uso de tratamento alcalino da biomassa para aumentar a disponibilidade de celulose livre que porventura possa potencializar a indução de celulases.

O pré-tratamento ácido-alcalino do pseudocaule da bananeira proporcionou diminuição de 9,56% do teor de lignina. Apesar da expectativa de que o material com

menores quantidades de lignina fosse mais propício para a indução do complexo celulolítico, uma vez que isto expõe a matriz celulósica e reduz a possibilidade de adsorção do complexo enzimático na fração de lignina da biomassa, em nenhum dos materiais pré-tratados foi possível verificar maiores valores de atividade enzimática se comparado à biomassa na forma *in natura*.

Assim como demonstrado no presente estudo, alguns trabalhos da literatura científica também relataram que o tratamento do material lignocelulósico foi deletério para a síntese de celulases. Delabona et al. (2012) estudaram a produção de celulases, em processo de fermentação submersa, utilizando como fontes indutoras o bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor, assim como submetido a tratamento com NaOH para deslignificação. Os autores verificaram maiores atividades de FPase no cultivo de *Trichoderma harzianum* em bagaço de cana-de-açúcar não deslignificada.

Conforme discutido anteriormente no ítem 4.2, as publicações científicas acerca do uso do gênero *Talaromyces* para a produção de celulases não são recentes e variadas espécies tem sido reportadas na literatura com características de potenciais promotores de celulases, como *T. cellulolyticus*, *T. emersonii*, *T. piceus*, *T. stollii* e *T. thermophilus* (HE et al., 2015; MALLEK-FAKHFAKH et al., 2017; OKUDA et al., 2016; ORENCIO-TREJO et al., 2016). Por outro lado, são crescentes as pesquisas sobre o aproveitamento de resíduos agroindustriais como indutores de enzimas celulolíticas produzidas por este gênero.

Como exemplo, em trabalho abordando o uso de *T. stollii* para obtenção de celulases e xilanases em fermentação submersa, Orencio-Trejo et al. (2016) utilizaram palha de milho e sorgo como material celulósico e obtiveram valores de CMCase em torno de 1300 U/L (10 dias de processo fermentativo), abaixo do obtido no presente estudo de tese utilizando pseudocaule da bananeira (1536,5 U/mL, em 96 horas de processo fermentativo).

Devido à proximidade genética de cepas do gênero *Talaromyces* com *Penicillium*, é válido destacar o trabalho desenvolvido por Shah; Kalia; Patel (2015), no qual foi averiguada a síntese de celulases totais, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases por *Penicillium oxalicum* utilizando pseudocaule da bananeira sem tratamento, assim como tratado com NaOH 2N. Assim como os testes do presente trabalho, os autores

também realizaram experimentos com celulose microcristalina e CMC. Dentre as fontes de carbono testadas, foram observadas maiores atividades enzimáticas no teste com pseudocaule da bananeira pré-tratado com NaOH (em torno de 1700,00 U/L de CMC_{ase}, em 96 horas de fermentação e 500,00 FPU na análise de FP_{ase} em 144 horas de processo).

Todavia, a espécie *T. amestolkiae* ainda é pouco relatada como excretora de enzimas do complexo celulolítico. Dentre os escassos trabalhos encontra-se o dos autores De Eugenio et al. (2017), que estudaram a síntese de endoglucanases por esta espécie utilizando aveia e farelo de trigo como fontes de carbono. Isto soma-se ao fato de que também ainda há pouca abordagem nas pesquisas científicas sobre o uso de resíduos de bananeira como fonte de carbono para induzir a síntese da referida enzima.

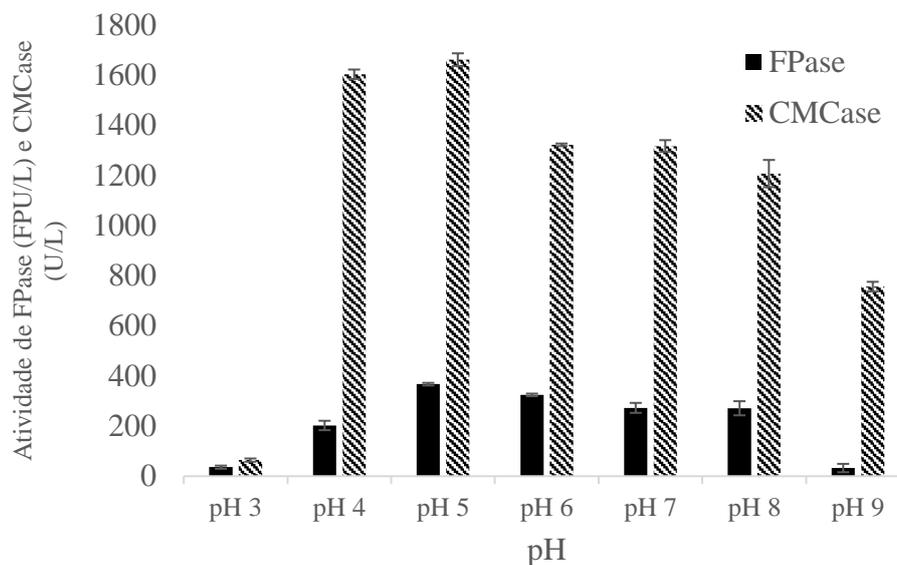
Diante do exposto, os processos fermentativos das etapas seguintes foram realizados com o pseudocaule da bananeira sem tratamento como principal componente para indução de celulasas e sacarose como fonte de carbono solúvel.

5.3.3. Produção de celulasas em diferentes perfis de pH inicial e temperatura no processo fermentativo submerso.

5.3.3.1 Estudo do pH inicial do meio de cultura em frascos Erlenmeyer

Os resultados apresentados na Figura 14 revelaram que *T. amestolkiae* CMIAT 055 expressou máximas atividades tanto de FP_{ase} (367,0 FPU/L), assim como de CMC_{ase} (1661,7 U/L) em pH 5.0. Ambas as análises enzimáticas obtiveram um perfil semelhante, com menores atividades em pH inicial 3,0 e 9,0.

Figura 14 – Perfil de produção de FPase e CMCase em diferentes condições de pH inicial do processo fermentativo.



Fonte: elaborada pelo autor.

Muitos dos fungos reportados na literatura, como os dos gêneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Leohumicola* e *Trichoderma* (ADEOYO; PLETSCHKE; DAMES, 2017; GOLDBECK et al., 2013; PRASETYO et al., 2010), requerem o meio de cultura com condições ligeiramente ácidas para a máxima produção de celulases em meio líquido.

Adeoyo; Pletschke; Dames (2017) investigaram os efeitos do pH e fatores nutricionais na síntese de endoglucanases por três distintas linhagens de fungos filamentosos. Em todos os testes, foi identificada maior atividade específica de CMCase em pH 5,0. Saini et al. (2015) também apresentaram o mesmo perfil dos testes em *Penicillium oxalicum* cultivados em meio líquido, no qual a máxima atividade de FPase foi observada em pH 5,0 e as atividades decaíram quando o pH do ensaio aumentou ou diminuiu. As mesmas características também foram observadas em artigo publicado por Xiong et al. (2004), no qual estudou-se o comportamento de *Trichoderma reesei* RUT C30 em diferentes condições iniciais de pH. As maiores atividades de FPase e xilanases foram observadas entre os pH 4,5 e 5,0.

Dentre os poucos trabalhos no qual foi estudado este mesmo perfil de pH inicial em meio de cultura com celulose como única fonte de carbono, usando linhagem de *Talaromyces*, Goyari et al. (2015) investigaram as melhores condições operacionais para

crescimento e produção de celulases por *T. verruculosus*. Neste trabalho, o pH 3,3 foi o que apresentou maior valor de atividade de FPase. Goyari et al. (2014), apresentaram resultados similares para a linhagem *T. verruculosus*, no entanto, o mesmo perfil exposto na presente tese, com atividade máxima em pH 5,0, foi mostrado por cepas do gênero *Trichoderma*. Os autores explicaram que a queda abrupta da atividade no pH 4,0 ocorreu, possivelmente, pelo fato de que a atividade enzimática pode ser afetada negativamente quando as enzimas secretadas permanecem por longo tempo no pH de crescimento do fungo e não no pH ótimo de atividade enzimática.

Apesar do fato de que os estudos desta etapa não propiciaram o acompanhamento do perfil de pH durante o período do processo fermentativo, a obtenção de dados do pH inicial tornou-se relevante para guiar as condições operacionais dos estágios subsequentes dos experimentos, em biorreator. Xiong et al. (2004), por exemplo, destacaram que há uma correlação direta entre o pH inicial do meio de cultura e a produtividade de celulases excretadas por *Trichoderma reesei* RUT C30. Tal fato, reforça a importância desta investigação. Face ao exposto, o pH inicial adotado nos estágios seguintes dos experimentos foi 5,0.

5.3.3.2 Estudo da temperatura inicial de produção de celulases

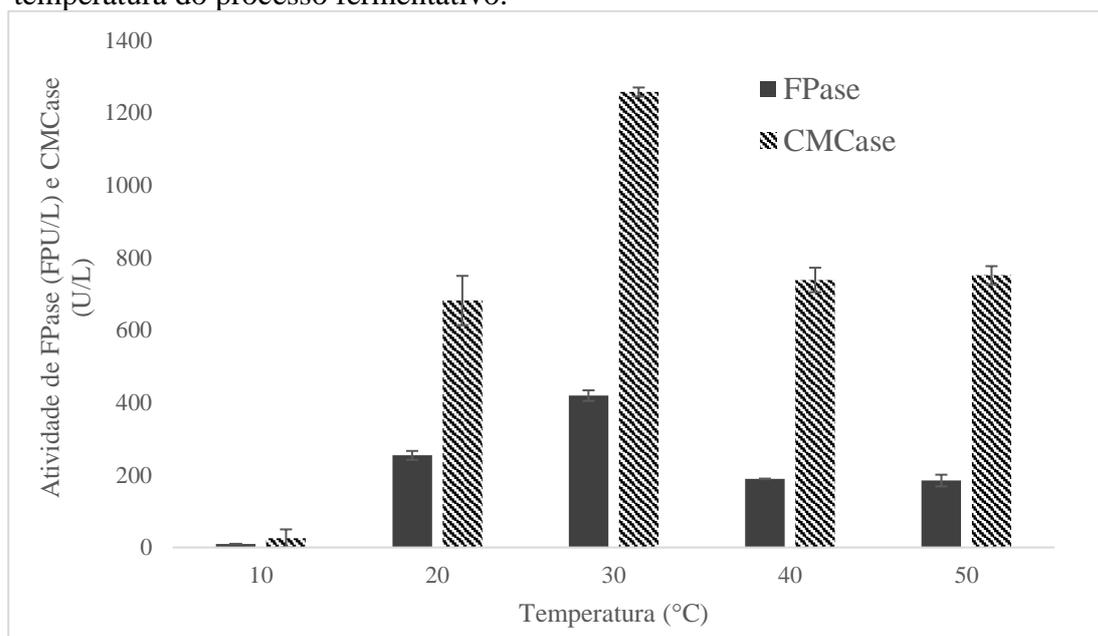
As maiores atividades produzidas de FPase (419,2 FPU/L) e CMCase (1457,31 U/L) foram encontradas a 30°C, a temperatura máxima de produção da enzima (Figura 15). Apesar do declínio na produção a partir de 40°C, observou-se o perfil termotolerante do fungo *T. amestolkiae* CMIAT 055.

Resultados similares foram encontrados por Goyari et al. (2014), em estudo de síntese de enzimas do complexo celulolítico por *T. verruculosus* em fermentação submersa, no qual os autores também identificaram atividade máxima de FPase a 30°C (em torno de 4000 FPU/L). Apesar deste fungo ter apresentado maior valor de atividade enzimática, quando comparado aos dados aqui publicados, a 40°C houve um decaimento acentuado na produção da enzima (<500,0 FPU/L). A linhagem *T. amestolkiae* CMIAT 055 manteve 54,8 % e 58%, respectivamente, de atividades de FPase e CMase no teste a 40°C.

Por outro lado, a maioria dos fungos filamentosos produtores de celulases são termófilos ou seja, as enzimas secretadas são tipicamente mais efetivas e termoestáveis a temperaturas a partir de 50°C (BUSK; LANGE, 2013; MURRAY et al., 2004). Mallek-Fakhfakh et al. (2017) obtiveram atividades de β -glucosidase mais altas ($3000 \pm 0,35$ U/L) quando o fungo *T. thermophilus* foi cultivado em fermentação submersa a 50°C.

O crescimento e produção de celulases a 20°C também mostrou a versatilidade de desenvolvimento do fungo CMIAT 055 em temperatura abaixo de 30°C. O experimento mostrou haver, em confronto com os dados a 30°C, atividade menor 39% para FPase e 45% na análise de CMCase. Este perfil está em desacordo com o observado por *T. verruculosus*, no trabalho de Goyari et al. (2014), em que os pesquisadores relataram atividade de FPase em torno de 90% menor a 20°C, quando comparado aos testes conduzidos a 30°C.

Figura 15 – Perfil de produção de FPase e CMCase em diferentes condições de temperatura do processo fermentativo.



Fonte: elaborada pelo autor.

No entanto, no que se refere à dados de perfil de temperatura do processo fermentativo, ainda são escassos dados publicados na literatura científica quando se trata do gênero *Talaromyces*. Isto reforça a relevância do presente estudo.

5.3.3.3. Diferentes concentrações de pseudocaule da bananeira no meio líquido.

O meio de cultura para a produção de celulases por *T. amestolkiae* CMIAT 055 ficou assim definido, de acordo com os resultados dos experimentos anteriores: pseudocaule da bananeira in natura como material celulósico (1% p/v), sacarose (1% p/v) como fonte auxiliar de carbono e meio de cultura líquido de acordo com Mandels; Weber (1969), cultivado em pH inicial 5,0 e temperatura 30°C. Para tal, foram realizados experimentos prévios pontuais, com a finalidade de verificar se quantidades maiores de PB estimularia ou teria efeito inibitório para síntese de celulases. Realizou-se um teste inicial, com a fermentação executada com todos os parâmetros operacionais definidos nas etapas anteriores, mas com a concentração de PB a 4% (p/v), frente a quantidade de 1% (p/v) adotada desde o início dos experimentos. Os resultados estão expostos na Tabela 23.

Tabela 23 – Perfil enzimático em diferentes concentrações de PB in natura em meio líquido.

Análise	Concentrações de PB (% p/v)		
	0%	1%	4%
FPase (FPU/L)	15,2 ± 0,01	292,5 ± 0,021	373,4 ± 0,001
CMCase (U/L)	56,7 ± 0,01	1536,5 ± 0,027	2123,7 ± 0,015

Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com estes testes, verificou-se que quantidades maiores de PB seriam benéficas para a síntese de celulases, uma vez que houve um incremento de 22% na atividade de FPase e 27% nos valores de CMCase. No entanto, com estes dados ainda não foi possível prever o efeito deletério de quantidades maiores do material sólido, que porventura poderia ser causado através da saturação no meio, limitando a transferência de oxigênio e nutrientes para o microrganismo. E, conseqüentemente, causar efeito inibidor na produção da enzima. Para tal, foi realizado um delineamento estatístico em duas etapas: a primeira, de triagem dos constituintes do meio em diferentes níveis; e uma segunda etapa, para otimizar o meio de cultura, considerando as interações entre os componentes do meio de cultura que foram selecionados, conforme será discutido no ítem a seguir.

5.3.4. Otimização da composição do meio de cultura através de Planejamento Estatístico: Delineamento Plackett-Burman (DPB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Nesta etapa da investigação foram empregadas ferramentas estatísticas, aplicadas sequencialmente, com intuito de otimizar a síntese de FPase e CMC_{Case}.

A metodologia de Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) foi adotada para selecionar, dentre nove componentes do meio de cultivo, os nutrientes mais significativos ou impactantes na síntese de FPase e CMC_{Case}. Em seguida, foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para finalizar o processo de otimização de síntese enzimática, considerando as interações entre os componentes do meio, previamente estabelecidos pelo Plackett-Burman.

5.3.4.1. Seleção de variáveis por Delineamento Plackett-Burman (DPB).

Na etapa de triagem, o DPB foi conduzido para avaliar os efeitos principais lineares de PB, sacarose, ureia, peptona, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na produção de FPase e CMC_{Case}. Como destaca Haaland (1991), os efeitos principais são obtidos avaliando-se a diferença na performance do processo, desencadeada pela mudança do nível inferior (-1) para o superior (+1) do fator correspondente. A Tabela 24 apresenta os valores codificados e reais das variáveis empregadas no DPB, bem como, os valores experimentais das variáveis respostas FPase e CMC_{Case} nos diferentes testes. A atividade de celulases totais variou de 39,2 FPU/L a 793,8 FPU/L e de CMC_{Case} de 1,7 U/L a 2720,0 U/L.

Tabela 24 – Matriz do DPB com os valores codificados e reais para as variáveis independentes e respostas FPase e CMCase.

Teste	PB ^{*a}	Sacarose ^b	Ureia ^c	Peptona ^d	EL ^{**e}	(NH ₄) ₂ SO ₄ ^f	KH ₂ PO ₄ ^g	MgSO ₄ .7H ₂ O ^h	CaCl ₂ .2H ₂ O ⁱ	FPase ^j	CMCase ^l
1	+1 (50,0)	-1 (5,0)	+1 (0,9)	-1 (0,75)	-1 (0,25)	-1 (1,4)	+1 (6,0)	+1 (0,9)	+1 (1,2)	793,8	2720,0
2	+1 (50,0)	+1 (50,0)	-1 (0,3)	+1 (2,25)	-1 (0,25)	-1 (1,4)	-1 (2,0)	+1 (0,9)	+1 (1,2)	39,2	1,7
3	-1 (5,0)	+1 (50,0)	+1 (0,9)	-1 (0,75)	+1 (0,75)	-1 (1,4)	-1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (1,2)	114,5	23,7
4	+1 (50,0)	-1 (5,0)	+1 (0,9)	+1 (2,25)	-1 (0,25)	+1 (3,4)	-1 (2,0)	-1(0,3)	-1 (0,4)	322,8	1587,4
5	+1 (50,0)	+1 (50,0)	-1 (0,3)	+1 (2,25)	+1 (0,75)	-1 (1,4)	+1 (6,0)	-1 (0,3)	-1 (0,4)	41,0	2,0
6	+1 (50,0)	+1 (50,0)	+1 (0,9)	-1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (3,4)	-1 (2,0)	+1 (0,9)	-1 (0,4)	102,0	434,8
7	-1 (5,0)	+1 (50,0)	+1(0,9)	+1 (2,25)	-1 (0,25)	+1 (3,4)	+1 (6,0)	-1 (0,3)	+1 (1,2)	104,9	42,5
8	-1 (5,0)	-1 (5,0)	+1 (0,9)	+1 (2,25)	+1 (0,75)	-1 (1,4)	+1 (6,0)	+1 (0,9)	-1 (0,4)	76,8	104,0
9	-1 (5,0)	-1 (5,0)	-1 (0,3)	+1 (2,25)	+1 (0,75)	+1 (3,4)	-1 (2,0)	+1 (0,9)	+1 (1,2)	120,1	219,3
10	+1 (50,0)	-1 (5,0)	-1 (0,3)	-1 (0,75)	+1 (0,75)	+1 (3,4)	+1 (6,0)	-1 (0,3)	+1 (1,2)	684,1	2247,2
11	-1 (5,0)	+1 (50,0)	-1 (0,3)	-1 (0,75)	-1 (0,25)	+1 (3,4)	+1 (6,0)	+1 (0,9)	-1 (0,4)	127,4	29,9
12	-1 (5,0)	-1 (5,0)	-1 (0,3)	-1 (0,75)	-1 (0,25)	-1 (1,4)	-1 (2,0)	-1 (0,3)	-1 (0,4)	61,3	571,4
13***	0 (27,5)	0 (27,5)	0 (0,6)	0 (1,50)	0 (0,50)	0 (2,4)	0 (4,0)	0 (0,6)	0 (0,8)	110,8	37,3
14***	0 (27,5)	0 (27,5)	0 (0,6)	0 (1,50)	0 (0,50)	0 (2,4)	0 (4,0)	0 (0,6)	0 (0,8)	127,4	38,8
15***	0 (27,5)	0 (27,5)	0 (0,6)	0 (1,50)	0 (0,50)	0 (2,4)	0 (4,0)	0 (0,6)	0 (0,8)	140,4	41,0

*PB = pseudocaule da bananeira; **EL = extrato de levedura; ***Pontos Centrais; ^aPB: g/L; ^bSacarose: g/L; ^cUreia: g/L; ^dPeptona: g/L; ^eEL: g/L; ^f(NH₄)₂SO₄: g/L; ^gKH₂PO₄: g/L; ^hMgSO₄.7H₂O: g/L; ⁱCaCl₂.2H₂O: g/L; ^jFPase: FPU/L; ^lCMCase: U/L.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O teste *t*-Student e o *p*-valor foram os parâmetros usados para confirmar a significância das variáveis estudadas na produção de FPase e CMCCase. O teste *t*-Student estimou a amplitude do coeficiente em relação ao erro padrão e foi obtido dividindo cada coeficiente pelo seu erro padrão. O *p*-valor menor que 0,05 sugere que a variável estudada é estatisticamente significativa. Geralmente, o valor do teste *t* elevado associado a um baixo valor de *p* indica elevada significância do termo correspondente (SHAJAHAN et al., 2016).

As variáveis independentes mais relevantes na produção de FPase podem ser confirmadas na Tabela 25. Um efeito positivo ou negativo de um fator sobre as respostas sinaliza que um aumento nos valores desse fator é acompanhado por um aumento ou uma diminuição da variável resposta, respectivamente.

Tabela 25 – Estimativa dos efeitos do DPB para atividade de FPase.

	Efeitos	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i> -valor
Média	197,767	3,830753	51,6261	0,000375*
PB (x ₁)	229,650	8,565824	26,8100	0,001388*
Sacarose (x ₂)	-254,983	8,565824	-29,7675	0,001127*
Ureia (x ₃)	73,617	8,565824	8,5942	0,013270*
Peptona (x ₄)	-196,383	8,565824	-22,9264	0,001897*
EL (x ₅)	-51,817	8,565824	-6,0492	0,026256*
(NH ₄) ₂ SO ₄ (x ₆)	55,783	8,565824	6,5123	0,022777*
KH ₂ PO ₄ (x ₇)	178,017	8,565824	20,7822	0,002307*
MgSO ₄ .7H ₂ O (x ₈)	-11,550	8,565824	-1,3484	0,309939
CaCl ₂ .2H ₂ O (x ₉)	187,550	8,565824	21,8952	0,002079*

*significativo para $p < 0,05$; $R^2 = 0,948$ e $R^2_{ajust} = 0,855$. PB = pseudocaule da bananeira, EL = extrato de levedura. Fonte: elaborada pelo autor.

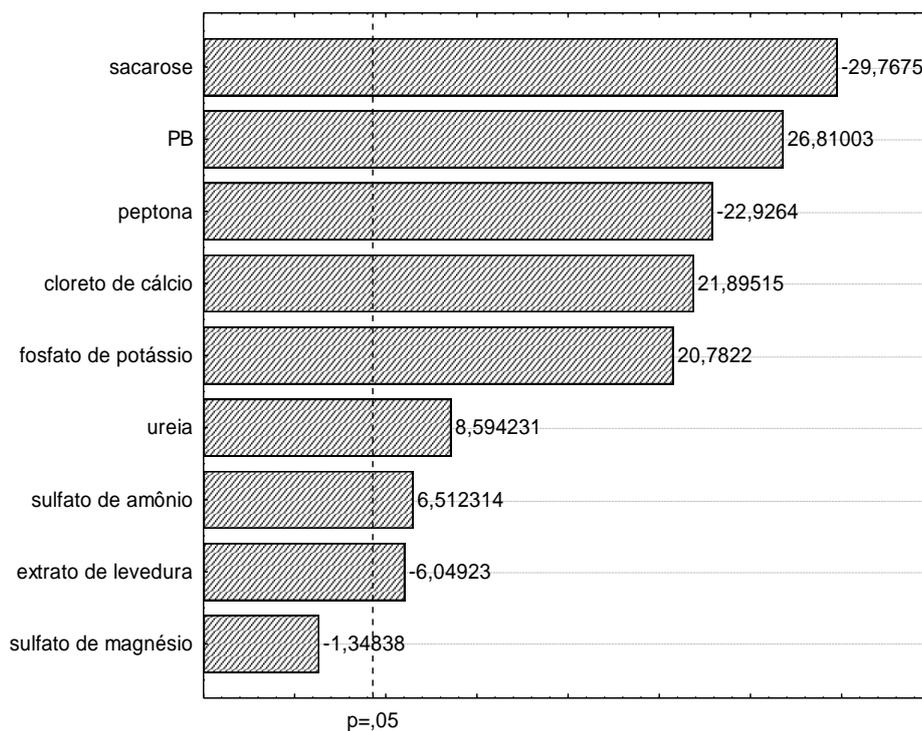
De acordo com os resultados na Tabela 25, PB foi a variável que mais impactou na produção de FPase na faixa experimental avaliada (5,0–50,0 g/L), ou seja, um aumento neste fator implicaria em aumento significativo da produção dessa enzima. CaCl₂.2H₂O, KH₂PO₄, ureia e (NH₄)₂SO₄ também tiveram efeito positivo no aumento da atividade enzimática e apresentaram a seguinte ordem de relevância na resposta: CaCl₂.2H₂O > KH₂PO₄ > ureia > (NH₄)₂SO₄. Por outro lado, sacarose, peptona e extrato de levedura apresentaram efeito negativo na síntese de FPase. MgSO₄.7H₂O, embora tenha efeito negativo, não foi significativo na resposta. Como apontaram Gunny et al. (2014), parâmetros com efeito negativo sugerem que, mesmo em quantidades mínimas, tais componentes poderiam ter efeito

deletério na síntese de celulases. O impacto negativo na produção de FPase obedeceu a decrescente ordem: sacarose > peptona > extrato de levedura > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

O teste 1 apresentou as maiores determinações de FPase (793,8 FPU/L). Na referida condição experimental, as concentrações das variáveis PB, ureia, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram mantidas no nível superior (+1), enquanto as variáveis sacarose, peptona, extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram mantidas no nível inferior (-1). É relevante pontuar que a produção de FPase caiu cerca 95,0% no teste 2 (39,2 FPU/L), quando as concentrações de sacarose e peptona passaram a ser empregadas em níveis superiores e a ureia e KH_2PO_4 em níveis inferiores.

A plotagem do Diagrama de Pareto (Figura 16) dos efeitos principais ($p < 0,05$), no intervalo de confiança de 95%, reforçou essas constatações e hierarquiza o impacto dos efeitos, em ordem decrescente, na produção de FPase.

Figura 16 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para a produção de FPase.



Fonte: elaborada pelo autor.

A Tabela 26 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis independentes na produção de CMCase.

Tabela 26 – Estimativa dos efeitos do DPB para atividade de CMC_{Case}.

	Efeitos	Erro padrão	<i>t</i> (2)	<i>p</i> -valor
Média	540,07	0,480509	1123,95	0,000001*
PB (x ₁)	1000,38	1,074451	931,06	0,000001*
Sacarose (x ₂)	-1152,45	1,074451	-1072,59	0,000001*
Ureia (x ₃)	306,82	1,074451	285,56	0,000012*
Peptona (x ₄)	-678,35	1,074451	-631,35	0,000003*
EL (x ₅)	-320,32	1,074451	-298,12	0,000011*
(NH ₄) ₂ SO ₄ (x ₆)	189,72	1,074451	176,57	0,000032*
KH ₂ PO ₄ (x ₇)	384,55	1,074451	357,90	0,000008*
MgSO ₄ .7H ₂ O (x ₈)	-160,75	1,074451	-149,61	0,000045*
CaCl ₂ .2H ₂ O (x ₉)	420,82	1,074451	391,66	0,000007*

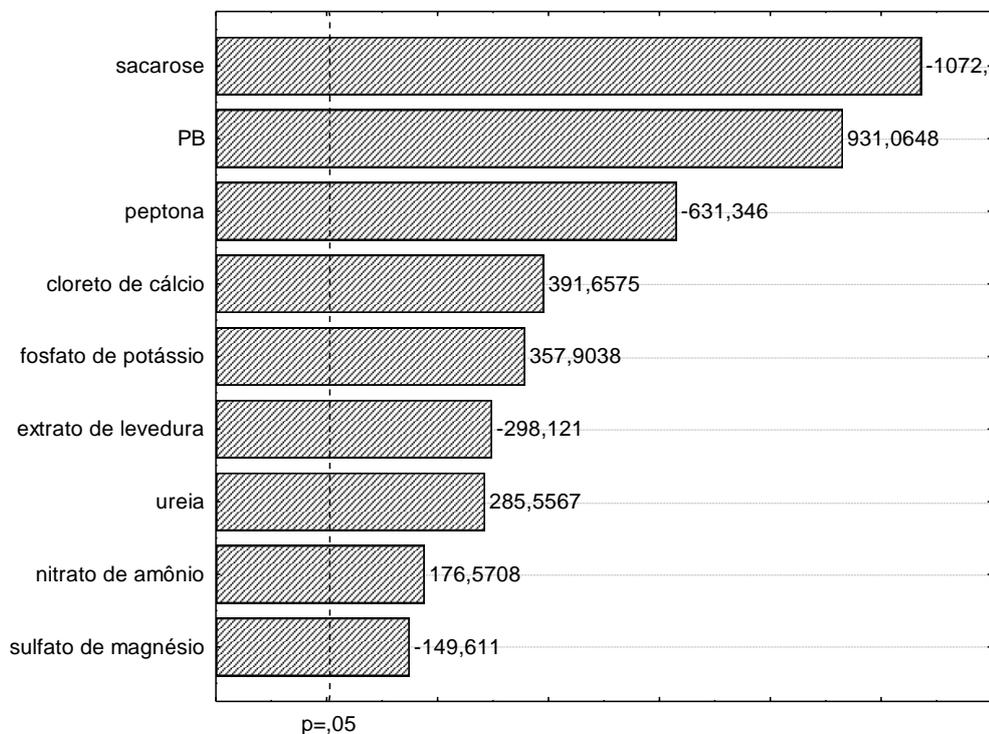
*significativo para $p < 0,05$; $R^2 = 0,905$ e $R^2_{ajust} = 0,735$. PB = pseudocaule da bananeira; EL = extrato de levedura. Fonte: elaborada pelo autor.

A produção de CMC_{Case} foi influenciada consideravelmente pelo fator PB, situação similar foi evidenciada na produção de FPase. Aumento no nível de PB relacionou-se a aumento da produção de CMC_{Case}. CaCl₂.2H₂O, KH₂PO₄, ureia e (NH₄)₂SO₄ também tiveram efeito positivo no aumento da enzima e, como ocorreu em FPase apresentaram a seguinte ordem de relevância na resposta: CaCl₂.2H₂O > KH₂PO₄ > ureia > (NH₄)₂SO₄. Sacarose, peptona, extrato de levedura e MgSO₄.7H₂O apresentaram efeito negativo na síntese de CMC_{Case}, ou seja, aumento no nível desses fatores promoveu diminuição na resposta. O impacto negativo na produção de CMC_{Case} obedeceu a ordem: sacarose > peptona > extrato de levedura > MgSO₄.7H₂O.

A síntese de CMC_{Case} e FPase exibiu o mesmo comportamento nos diferentes testes, uma vez que o impacto dos fatores sobre as duas respostas foi bastante similar. Como anteriormente pontuado para FPase, no teste 1 a produção de CMC_{Case} alcançou as maiores determinações (2720,0 U/L). Os níveis das variáveis PB, ureia, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e CaCl₂.2H₂O mantidos nos níveis superiores (+1) e as variáveis sacarose, peptona, extrato de levedura e (NH₄)₂SO₄ mantidas nos níveis inferiores (-1) resultaram na melhor condição experimental. No teste 2, onde registou-se a menor determinação de CMC_{Case} (1,07 U/L), houve queda superior a 99,0 % na atividade da enzima em relação ao teste 1. Nessas condições experimentais, a sacarose e peptona foram empregadas nas maiores concentrações (nível superior) e a ureia e KH₂PO₄ nas menores concentrações (níveis inferiores).

O Diagrama de Pareto (Figura 17) apresenta o impacto dos efeitos principais na produção de CMCCase.

Figura 17 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para a produção de CMCCase.



Fonte: elaborada pelo autor.

O DPB demonstrou a necessidade de manter alguns componentes do meio em níveis mais elevados, a fim de potencializar a síntese de FPase e CMCCase. Em contrapartida, o teste também evidenciou que certos componentes do meio deveriam ser omitidos ou mantidos em níveis inferiores para assegurar o desempenho na produção da enzima. Assim, para a condução do DCCR, a sacarose foi fixada no nível inferior (5,0 g/L) e os demais fatores negativos significativos (peptona e extrato de levedura) foram retirados da composição do meio.

MgSO₄.7H₂O também foi omitido no DCCR, já que o efeito dessa variável foi negativo para a síntese de CMCCase e FPase. Ademais, o fator MgSO₄.7H₂O não foi significativo na produção de FPase. A robustez do modelo para a produção de FPase foi conservada, uma vez que o R² e R²_{ajust} ainda mantiveram-se altos (0,947 e 0,878, respectivamente), mesmo após MgSO₄.7H₂O ser prontamente ignorado na rotina estatística.

Cabe salientar, que embora o efeito de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tenha sido positivo na produção de FPase e CMCase, decidiu-se conduzir o DCCR apenas com uma fonte de nitrogênio (ureia). A decisão de retirar essa variável foi pautada em alguns pontos: 1) a retirada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não comprometeu a acurácia do modelo, já que os valores de R^2 e R^2_{ajust} permaneceram igualmente altos, sendo $R^2 = 0,935$ e $R^2_{\text{ajust}} = 0,850$ para FPase e $R^2 = 0,8957$ e $R^2_{\text{ajust}} = 0,75664$ para CMCase; 2) o impacto da variável ureia foi maior na produção das enzimas e por fim 3) o emprego de ureia é mais vantajoso economicamente para o processo de produção de enzima.

Alguns trabalhos da literatura que realizaram seleção de componentes por DPB para síntese de celulasas, reportam similaridades com os resultados obtidos no presente estudo. Matkar et al. (2013) realizaram seleção de componentes do meio de cultura para produção de celulasas sob fermentação submersa, utilizando *Aspergillus sydowii*. Na seleção por DPB, os autores também identificaram a necessidade de manutenção de cloreto de cálcio na etapa de otimização por DCCR. Jung et al. (2015) estudaram otimização do meio de cultura para síntese de celulasas por *Penicillium brasilianum* em condições de fermentação submersa similares aos estudos da tese. Assim como no presente estudo, na investigação supracitada foram testados os seguintes componentes, nos mesmos níveis estabelecidos: cloreto de cálcio, extrato de levedura, fosfato de potássio monobásico, peptona, sulfato de amônio, sulfato de magnésio e ureia. No entanto, baseado nas respostas de endoglucanases (maior atividade apresentada 860,0 U/L), apenas ureia e sulfato de amônio foram consideradas variáveis significativas para a etapa de DCCR.

Diante do exposto, as variáveis PB, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 e ureia foram selecionadas para o DCCR e as suas respectivas faixas experimentais ajustadas e ampliadas. Assim, foram estabelecidas as seguintes concentrações das variáveis para o DCCR: PB de 0 a 80,0 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0 a 4,8 g/L, KH_2PO_4 de 0 a 12,0 g/L e ureia de 0 a 4,8 g/L.

5.3.4.2 Otimização do meio de cultura através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os resultados anteriores estabeleceram as condições experimentais da etapa de otimização, assim no DCCR foram incluídas como variáveis independentes: PB, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 e ureia. O DCCR foi composto de três réplicas no ponto central e oito pontos axiais (2^4 mais a configuração do tipo estrela, totalizando 27 experimentos). A condução do DCCR

teve com desdobramento a obtenção de um modelo de segunda ordem para a produção de FPase e CMCase (variáveis respostas ou dependentes) em função das variáveis investigadas (variáveis independentes). A Tabela 27 apresenta a matriz do DCCR com os valores codificados e reais das variáveis independentes, bem como os resultados da produção de FPase e CMCase.

Tabela 27 – Matriz do DCCR com os valores codificados e reais para as variáveis independentes e as respostas FPase e CMCase.

Teste	PB* ^a	CaCl ₂ .2H ₂ O ^b	KH ₂ PO ₄ ^c	Ureia ^d	FPase ^e	CMCase ^f
1	-1 (20,0)	-1 (1,2)	-1 (3,0)	-1 (1,2)	442,5	1428,9
2	-1 (20,0)	-1 (1,2)	-1 (3,0)	+1 (3,6)	303,9	1692,3
3	-1 (20,0)	-1 (1,2)	+1 (9,0)	-1 (1,2)	590,1	1469,1
4	-1 (20,0)	-1 (1,2)	+1 (9,0)	+1 (3,6)	379,5	1714,0
5	-1 (20,0)	+1 (3,6)	-1 (3,0)	-1 (1,2)	706,1	1818,7
6	-1 (20,0)	+1 (3,6)	-1 (3,0)	+1 (3,6)	410,0	1626,4
7	-1 (20,0)	+1 (3,6)	+1 (9,0)	-1 (1,2)	689,5	1901,0
8	-1 (20,0)	+1 (3,6)	+1 (9,0)	+1 (3,6)	277,0	1433,8
9	+1 (60,0)	-1 (1,2)	-1 (3,0)	-1 (1,2)	90,0	491,6
10	+1(60,0)	-1 (1,2)	-1 (3,0)	+1 (3,6)	389,7	1321,2
11	+1 (60,0)	-1 (1,2)	+1 (9,0)	-1 (1,2)	156,3	262,2
12	+1 (60,0)	-1 (1,2)	+1 (9,0)	+1 (3,6)	399,5	1089,1
13	+1 (60,0)	+1 (3,6)	-1 (3,0)	-1 (1,2)	278,5	582,0
14	+1 (60,0)	+1 (3,6)	-1 (3,0)	+1 (3,6)	459,7	1187,2
15	+1 (60,0)	+1 (3,6)	+1 (9,0)	-1 (1,2)	256,3	234,6
16	+1 (60,0)	+1 (3,6)	+1 (9,0)	+1 (3,6)	424,4	1220,5
17	- α (0,00)	0 (2,4)	0 (6,0)	0 (2,4)	2,7	9,9
18	+ α (80,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	0 (2,4)	57,0	133,8
19	0 (40,0)	- α (0,0)	0 (6,0)	0 (2,4)	742,2	1853,6
20	0 (40,0)	+ α (4,8)	0 (6,0)	0 (2,4)	1032,4	2463,2
21	0(40,0)	0 (2,4)	- α (0,0)	0 (2,4)	331,5	328,1
22	0 (40,0)	0 (2,4)	+ α (12,0)	0 (2,4)	350,9	978,0
23	0 (40,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	- α (0,0)	204,9	142,0
24	0 (40,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	+ α (4,8)	148,9	1305,7
25**	0 (40,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	0 (2,4)	162,6	175,3
26**	0 (40,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	0 (2,4)	193,6	172,3
27**	0 (40,0)	0 (2,4)	0 (6,0)	0 (2,4)	194,3	155,3

*PB = pseudocaule da bananeira; ** Pontos Centrais; ^aPB: g/L; ^bCaCl₂: g/L; ^cKH₂PO₄: g/L; ^dUreia: g/L; ^eFPase: FPU/L e ^fCMCase: U/L. Fonte: elaborada pelo autor.

As determinações de FPase variaram de 2,7 a 1032,4 FPU/L e de CMCCase de 9,9 a 2463,2 U/L. A pouca variação das determinações de FPase e CMCCase nos pontos centrais,

empregados para estimar o erro do delineamento estatístico, sugerem a reprodutibilidade dos dados experimentais.

O teste 20 apresentou a composição mais adequada para produção de FPase (1032,4 FPU/L) e CMCase (2463,2 U/L), dentro das faixas experimentais previamente estabelecidas no DPB. Observou-se acréscimo em 98,53% na atividade de FPase em teste conduzido sem PB e acréscimos de 71,6 e 63,83%, respectivamente, em testes realizados com 10,0 e 40,0 g/L de PB. Em relação a CMCase, o aumento da atividade foi de 97,70% quando comparado ao teste sem PB e de 37,62 e 13,78% em testes que empregaram 10,0 e 40,0 g/L de PB, respectivamente (item 4.3.3.2). Tais constatações reforçam a importância dos procedimentos de otimização em bioprocessos. É pertinente ainda destacar que o teste 17, cuja composição do meio de cultura não continha material lignocelulósicos (ponto axial inferior), apresentou atividade de FPase e CMCase negligenciáveis. As atividades de 2,7 FPU/L para FPase e 9,9 U/L para CMCase possivelmente relacionaram-se às frações de enzimas já presentes na suspensão de esporos fúngicos empregada como inóculo nos testes.

Empregando análise de regressão, equações (Equações 19 e 20) de segunda ordem foram propostas, respectivamente, para a produção de FPase e CMCase em função somente das variáveis independentes consideradas significativas ($p < 0,05$):

$$FPase = 190,05 - 51,48 x_1 - 34,31 x_1^2 + 55,43 x_2 + 180,05 x_2^2 + 43,53 x_3^2 + 121,87 x_1 x_4 - 31,65 x_2 x_3 - 34,56 x_2 x_4 \quad (19)$$

$$CMCase = 167,63 - 268,67 x_1 + 28,59 x_1^2 + 73,12 x_2 + 550,23 x_2^2 + 19,82 x_3 + 173,89 x_3^2 + 225,99 x_4 + 191,59 x_4^2 - 25,96 x_1 x_2 - 45,45 x_1 x_3 + 212,42 x_1 x_4 - 77,07 x_2 x_4 \quad (20)$$

Onde x_1 , x_2 , x_3 e x_4 são os valores codificados para as concentrações de PB, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 e ureia, respectivamente. Os dados experimentais também foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e a validade dos modelos foi atestada pelo Teste F (Tabela 28), comparando-se os valores de F dos modelos com os valores de F tabelados.

Tabela 28 – ANOVA do DCCR para as respostas FPase e CMCase.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}
FPase				
Regressão	1354824,0	8	169353,0	40,25 ^a
Resíduo	75739,0	18	4207,72	
Falta de ajuste	75084,0	16	4692,75	14,33 ^b
Erro Puro	655,0	2	327,5	
Total	1430563,0	26		
R ² : 0,95306; R ² _{ajust} : 0,89829; $F_{0,05, 8,18}$: 2,51; $F_{0,05,16,2}$: 19,43. ^a F_{calc} (regressão/resíduo). ^b F_{calc} (<i>lack of fit</i> /erro puro).				
CMCase				
Regressão	11057523,0	12	921460,25	6,36 ^c
Resíduo	2115484,0	14	151106,0	
Falta de ajuste	2115251,0	12	176271,0	1513,06 ^d
Erro Puro	233,0	2	116,5	
Total	13173007,0	26		
R ² : 0,83941; R ² _{ajust} : 0,70176; $F_{0,05, 12,14}$: 2,53; $F_{0,05,12,2}$: 19,41. ^c F_{calc} (regressão/resíduo). ^d F_{calc} (<i>lack of fit</i> /erro puro).				

Fonte: elaborada pelo autor.

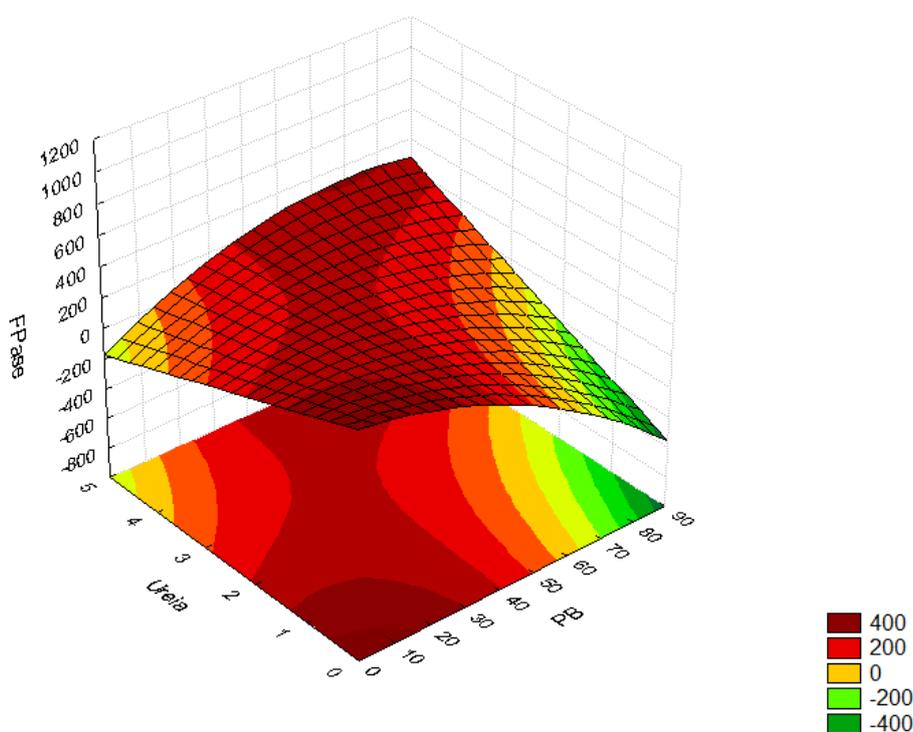
Na análise de variância levaram-se em conta apenas os parâmetros significativos, nos quais o valor de p encontrava-se abaixo de 0,05, sendo os fatores não significativos adicionados à Falta de Ajuste.

O modelo para a produção de FPase apresentou coeficiente de correlação (R^2) altamente significativo, conseguindo explicar em torno de 95,0% da variação total em torno da média. Somente 5,0% do total da variabilidade não foram explicados pelo modelo de regressão. O teste F para a regressão (40,25) exibiu bom desempenho (superior ao F tabelado) e o *lack of fit* (14,33) não foi significativo. Para a produção de CMCase o modelo explicou 83% da variação total da média com teste F para a regressão (6,36) superior ao tabelado. No entanto, o *lack of fit* (1513,06) foi acentuadamente maior que o valor tabelado (19,41), evidenciando que o modelo não atende adequadamente a relação funcional entre as variáveis independentes e a variável de resposta. Além disso, resíduos consideravelmente altos impactaram na falta de ajuste. Assim, diante desses resultados, optou-se em delimitar nos procedimentos de otimização apenas a produção de FPase como variável resposta. O modelo da equação 19 foi utilizado para gerar os gráficos de superfície de resposta, para melhor compreender a otimização dos quatro constituintes do meio de cultura (Figuras 18, 19 e 20).

Pela análise da Figura 18, que apresenta a interação entre o material lignocelulósico e a fonte de nitrogênio, fica evidente que maiores valores de FPase (coloração vermelho-escuro

do gráfico) ocorreram quando as concentrações de PB variaram de 0 a 30,0 g/L e ureia de 0 a 1,0 g/L. Observou-se também que a atividade de FPase foi inibida quando maiores concentrações de ureia foram empregadas. O mesmo foi constatado em trabalho de Jung et al. (2015), no qual os autores demonstraram que maiores concentrações de ureia foram deletérias à síntese de endoglucanases.

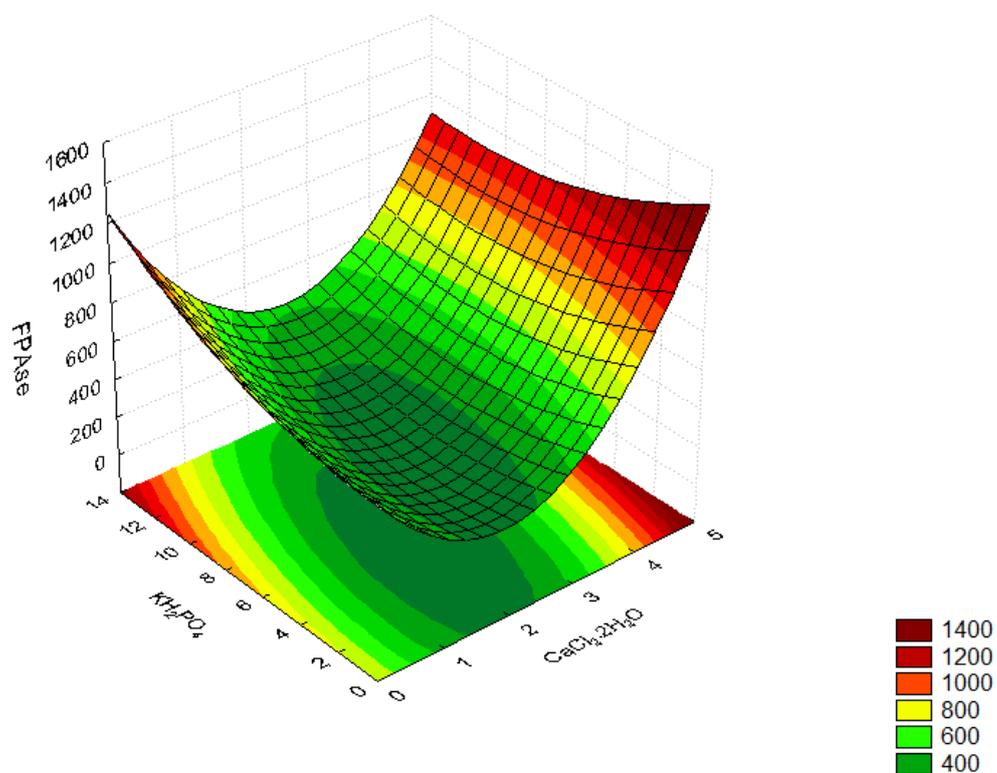
Figura 18 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de PB e ureia, com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 fixados em 2,4 e 6,0 g/L, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

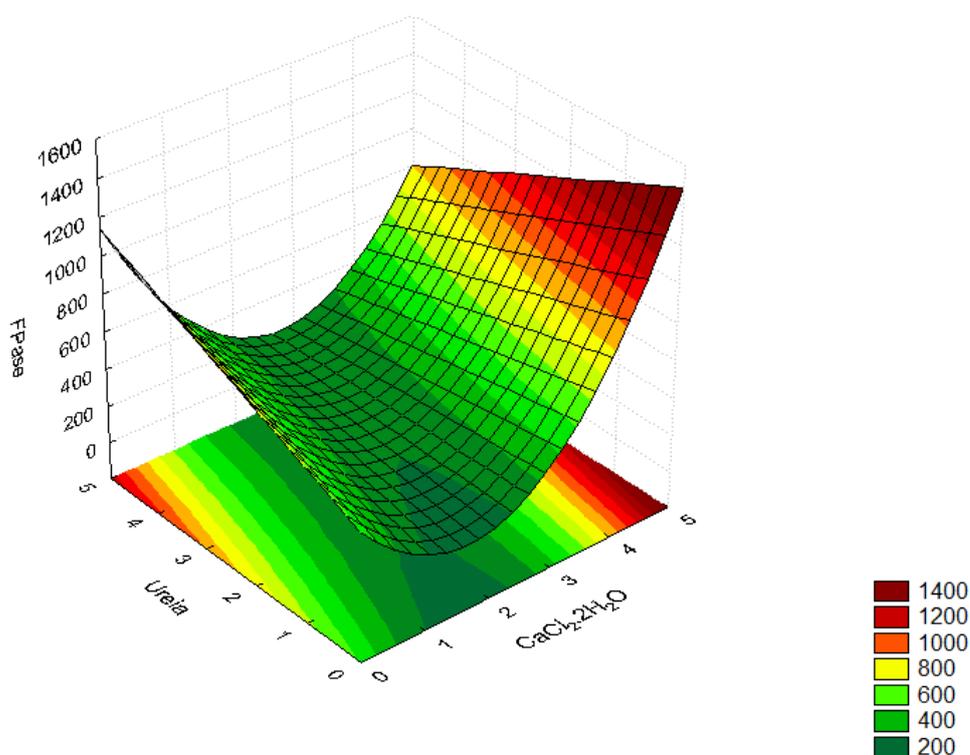
Por outro lado, pela análise do gráfico de superfície de resposta da interação entre os dois sais (cloreto de cálcio e fosfato de potássio) (Figura 19), ficou evidente que maiores quantidades destes componentes são benéficas para expressão de celulasas no meio de cultura. O mesmo foi observado na Figura 20, que mostrou a interação entre a fonte de nitrogênio e cloreto de cálcio.

Figura 19 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 , PB e ureia fixados em 40,0 e 2,4 g/L, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Superfície de resposta para a produção de FPase em função das concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e ureia, PB e KH_2PO_4 fixados em 40,0 e 6,0 g/L, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Diante do exposto, as concentrações dos componentes do meio de cultura, para a etapa seguinte, foram definidas através do cálculo dos valores críticos de cada variável independente. O procedimento sinaliza quais as concentrações ideais de cada componente no meio para obter-se o melhor rendimento na síntese de FPase. Ademais, tal procedimento foi essencial, uma vez que pode ocorrer saturação do meio de cultura mediante aumento da concentração de material sólido. Esta tendência pode ser constatada no teste 18, onde a atividade de FPase foi de apenas 57,0 FPU/L. Nessa condição experimental, a concentração de PB foi de 80 g/L, enquanto as concentrações de CaCl_2 , KH_2PO_4 e ureia foram mantidas, respectivamente, em 2,4, 6,0 e 2,4 g/L. Logo, o meio de cultura para os ensaios em biorreator ficou assim definido: 41,9 g/L de PB; 2,26 g/L de CaCl_2 ; 5,96 g/L de KH_2PO_4 e 2,98 g/L de ureia.

5.3.5. Produção de celulases em biorreator

5.3.5.1. Controle de pH do processo fermentativo

Esta etapa do estudo de produção de celulases por *T. amestolkiae* CMIAT 055 consistiu em analisar o comportamento do fungo em condições operacionais mais controladas, em biorreatores, o que não era permissível nos experimentos executados em frascos Erlenmeyers. Em contrapartida aos ensaios realizados anteriormente, nas fermentações em reatores foi possível o controle dos seguintes parâmetros: manutenção do pH, maior controle sobre a distribuição de temperatura, oxigenação do meio, assim como propiciou o controle e configuração do sistema de agitação (rotação e tipo de impelidor). Além de permitir analisar o comportamento do fungo em um processo com maior escala de produção, de 100 mL para 4000 mL.

Em todas as etapas anteriores, o pH do caldo fermentado foi medido após o final do processo (dados não reportados) e observou-se que houve uma tendência à acidificação do meio pelo fungo, com valores de pH que variaram de 1,5 a 3,0 após 48 horas de cultivo. Logo, em relação à obtenção de dados sobre o perfil de pH durante o processo fermentativo, executou-se um teste sem controle de pH e outro com manutenção do pH em 5,0. A escolha do pH deste último teste deve-se aos dados coletados no item 5.3.3.1, em que o meio de cultura com pH inicial 5,0 foi o mais propício para síntese de celulases.

Nos ensaios realizados em biorreator também foi estudada a configuração do sistema de agitação do caldo fermentativo, a partir de dois parâmetros principais: velocidade da rotação e escolha do impelidor (Rushton ou *pitched blade*). A relevância destes resultados reside no fato de que a escolha inadequada do sistema de agitação pode causar possíveis danos na morfologia do microrganismo devido a forças cisalhantes. Embora existam um grande número de estudos sobre produção de celulases, pouco ainda tem sido feito sobre a influência das condições de operação como pH, transferência de massa e oxigênio no processo, associado às configurações do sistema de agitação do meio líquido (GABELLE et al., 2012).

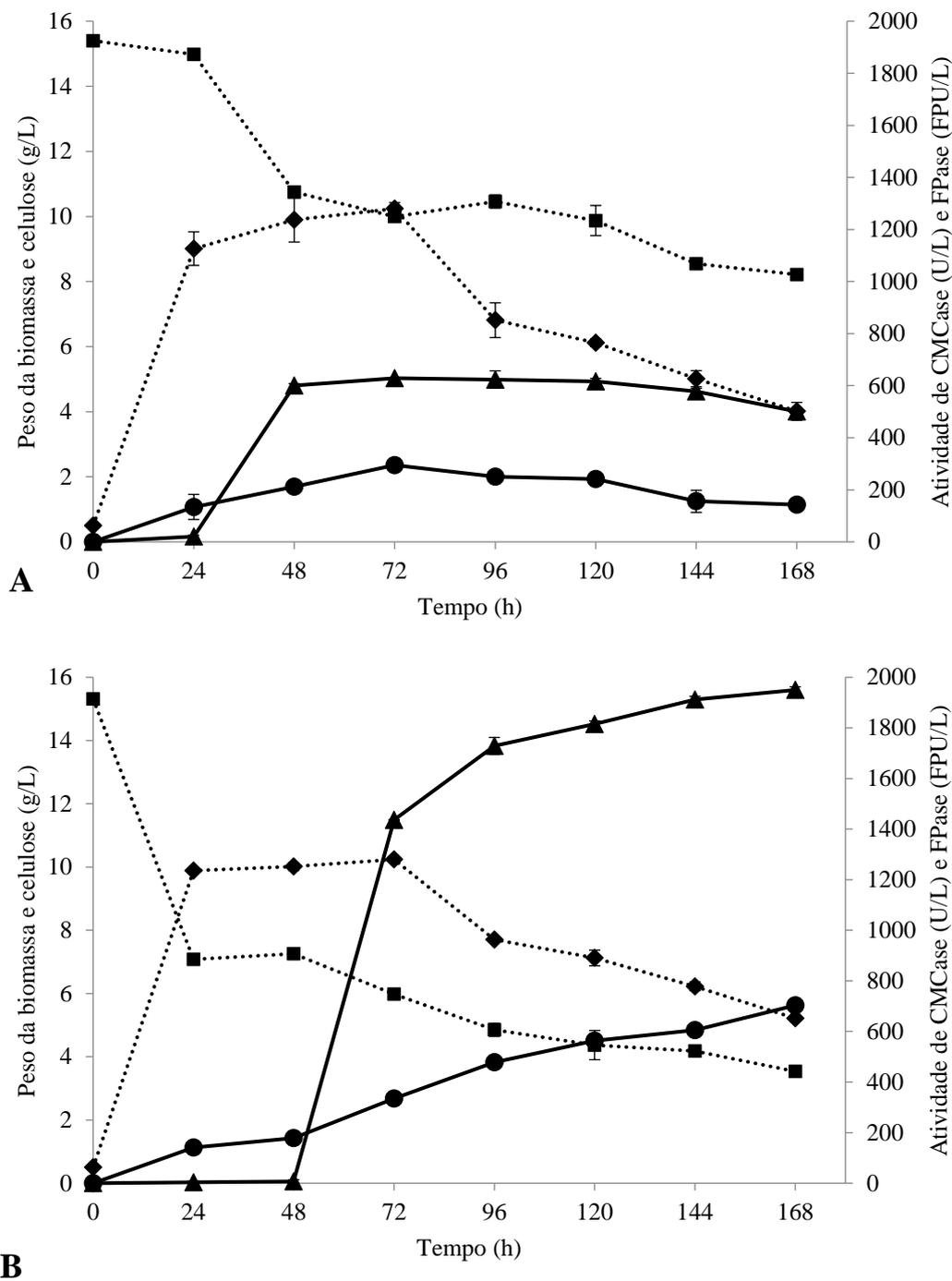
O primeiro experimento foi realizado com pH inicial 5,0, no entanto não houve manutenção deste parâmetro durante todo o processo fermentativo. A Figura 21 mostra um comparativo entre os dados coletados nas fermentações com e sem controle de pH (Figuras 21A e 21B, respectivamente). Na Figura A, sem controle de pH, observou-se que maior atividade de FPase foi alcançada em 72 horas de fermentação ($294,8 \pm 2,21$ FPU/L), a partir do qual a atividade apresentou decréscimo até $143,0 \pm 2,52$ FPU/L após 168 horas. O consumo de celulose do pseudocaule da bananeira ocorreu a partir de 24 horas, totalizando um declínio de 7,2 g deste material até o final do processo.

De acordo com os pontos experimentais escolhidos para a execução dos testes, não foi possível identificar a fase lag de crescimento do fungo. Esta informação seria relevante visto que, as estratégias de síntese de metabólitos secundários, principalmente os que envolvem enzimas, giram em torno da fase em que o microrganismo já se adaptou ao meio de cultura. Neste caso, seriam necessários ensaios com menor espaço de tempo antes de 24 horas.

No entanto, observou-se que o crescimento do fungo, denotado pela biomassa seca em g/L, apresentou um valor máximo em 72 horas de cultivo (10,2 g/L), a partir do qual há declínio do crescimento. Logo, é nítida a relação entre o período de desenvolvimento e manutenção celular de *T. amestolkiae* CMIAT 055 no meio de cultura e a diminuição das atividades enzimáticas de FPase e CMCase.

Todavia, ainda não foi possível confirmar se há uma relação única entre a concentração de biomassa e a expressão da enzima. E alguns trabalhos presentes na literatura específica reforçam a necessidade de avaliar outros parâmetros do processo, com a finalidade de estudar de forma mais acurada a relação entre o crescimento celular e atividade enzimática. Zheng et al. (2002), em trabalho sobre efeitos da agitação em fermentação submersa para produção de enzimas por *Aspergillus oryzae*, concluíram que a redução na síntese enzimática não ocorreu devido à diminuição da taxa de crescimento do fungo. Esta conclusão foi obtida após estudos de outros parâmetros, como o a fragmentação do microrganismo e alteração da morfologia do mesmo devido à configuração do sistema de agitação.

Figura 21 – Perfil de atividade de FPase, CMCase, produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação sem e com controle de pH.



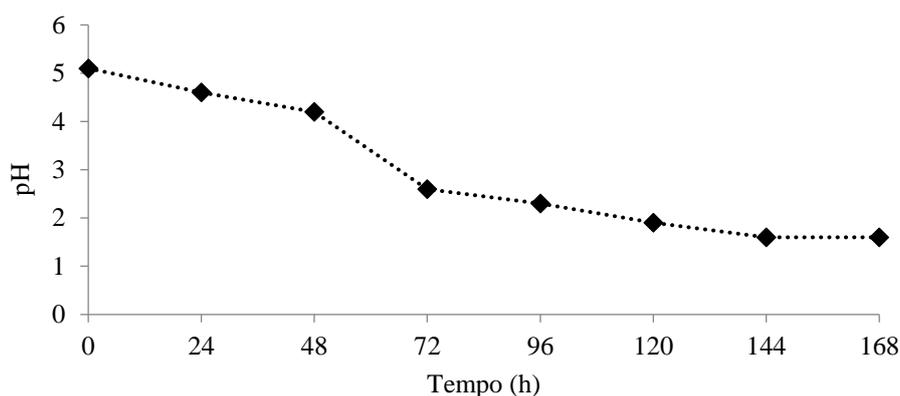
FPase (●), CMCase (▲), Celulose (■), Biomassa microbiana (◆), A. Fermentação sem controle de pH, B. Fermentação com pH mantido em 5,0. Fonte: elaborada pelo autor.

Uma vez que neste primeiro experimento não houve controle de pH, para melhor compreensão do consumo do substrato, produção de biomassa microbiana e atividades

enzimáticas, na Figura 22 está exposta a representação do pH no meio de cultura durante o período de fermentação.

O comportamento de *T. amestolkiae* CMIAT 055 para produção de ambas as enzimas também pode ser explicada através da acidificação do meio, possivelmente um ácido orgânico sintetizado e excretado no meio líquido pelo próprio microrganismo. Nota-se que no tempo 72 horas houve um decréscimo acentuado no pH, de 4,2 para 2,6, e que coincide com: menor expressão de ambas as atividades enzimáticas, possivelmente pelo fato da enzima não manter sua conformação em meio ácido; diminuição expressiva na quantidade de biomassa a partir de 72 horas, denotando uma menor capacidade do microrganismo desenvolver-se em cultivos com pH mais baixo; e, conseqüentemente, observa-se também menor consumo do substrato, visto que também foi evidenciada o menor crescimento celular fúngico.

Figura 22 – Perfil do pH no processo fermentativo em biorreator.



Fonte: elaborada pelo autor.

No segundo experimento, mostrado na Figura 25-B, o meio de cultura foi ajustado para pH 5,0 e este foi mantido durante todo o tempo de fermentação. Realizando um comparativo entre as duas primeiras fermentações observou-se que o controle de pH propiciou maior consumo de celulose, em consequência da maior manutenção da biomassa microbiana, o que acarretou em maiores sínteses de celulases totais e endoglucanases.

A degradação do material celulósico iniciou nas primeiras 24 horas, em que houve diminuição da quantidade do material em 8,24 g, valor 0,43 g superior ao consumo do primeiro teste. Todavia, foi notório que, considerando apenas a produção de CMC_{Case}, na

fermentação com controle de pH, o microrganismo precisou de um período maior de tempo para assimilar o material lignocelulósico e então expressar a síntese de endoglucanases.

Isto foi esclarecido pelo fato de que, sem manutenção do pH, a produção de CMCase já pode ser observada nas primeiras 24 horas de processo. Enquanto que com pH mantido em 5,0, a síntese da enzima só foi vista entre 48 e 72 horas. Tal fato pode ser explicado em decorrência de que o pH se manteve em 4,2 até 48 horas na primeira, possivelmente um valor benéfico para a síntese de endoglucanases por *T. amestolkiae* CMIAT 055.

Na fermentação com controle de pH não houve declínio na atividade de ambas as enzimas após 168 horas, em contrapartida ao que ocorreu no primeiro teste. Logo, 168 horas foi considerado o tempo máximo de produção de ambas as enzimas com atividades de $702,9 \pm 1,98$ FPU/L e $1949,8 \pm 0,93$ U/L, respectivamente para FPase e CMCase. Para efeitos de comparação entre a fermentação com e sem controle de pH, tomando como base o tempo 72 horas, houve um incremento de atividade de FPase em 12,5% e de CMCase em 128,4%. Li et al. (2013) apresentaram, em artigo sobre o efeito do pH na síntese de celulases e morfologia do fungo *Trichoderma reesei*, resultados parecidos com o da presente tese. Apesar da atividade FPase ter permanecido crescente após 72 horas, por tratar-se de um fungo geneticamente modificado e conseqüentemente mais estável às condições extremas de acidez, a produção de celulases totais foi maior na batelada com controle de pH.

Conforme afirmam variadas pesquisas publicadas na literatura científica, a conexão entre a produção de celulases, morfologia do microrganismo e controle de pH é uma estratégia chave para os estudos acerca do aumento da produção de celulases em processos fermentativos (LI et al., 2013; SOHAIL et al., 2009). Li et al. (2013) enfatizaram que as fermentações em que o pH é controlado sob valores constantes podem promover a produção de um único componente dentre os três pertencentes ao complexo celulolítico, negligenciando as características particulares de cada enzima que age em sinergia. Estes autores concluíram que as máximas atividades de cada enzima em particular foram expressas em diferentes valores de pH. Nos casos em que há controle de um único valor de pH, o objetivo principal deve ser a obtenção de valores máximos da atividade enzimática considerando todos os três componentes do complexo celulolítico.

Visto isso, faz-se necessário experimentos mais acurados em perspectivas futuras, com o estudo de diferentes perfis de pH de acordo com cada enzima celulolítica em particular, e

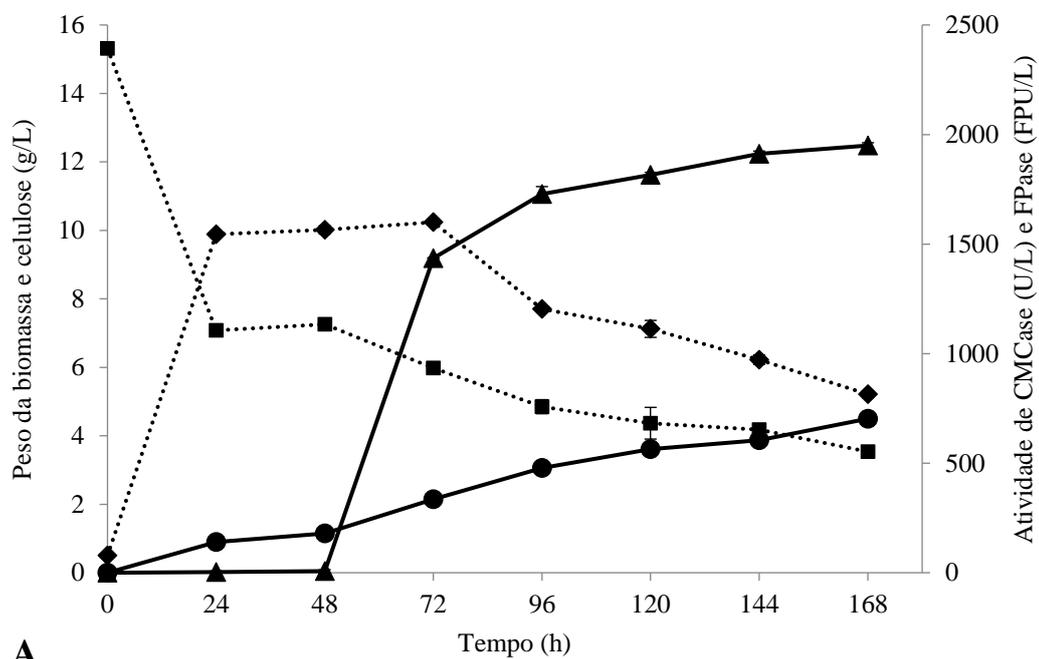
também observando o melhor comportamento de crescimento e manutenção do fungo. No entanto, os dados aqui coletados e discutidos na tese servirão como guia para futuros experimentos.

5.3.5.2. *Comparação do uso de diferentes impulsores*

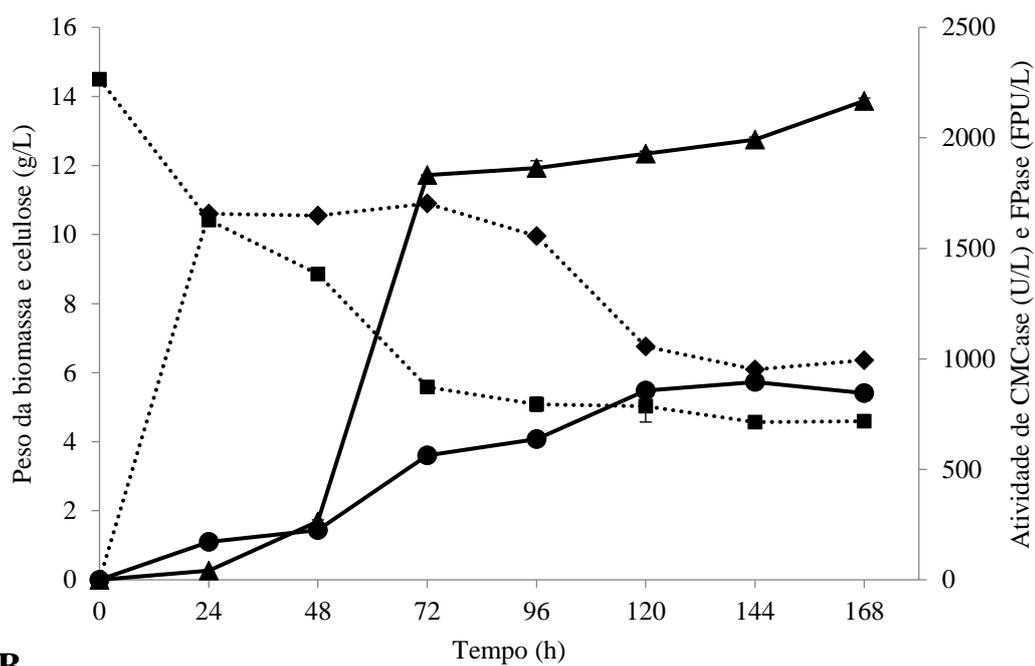
O próximo teste realizado em biorreator foi executado levando-se em consideração os melhores resultados obtidos anteriormente, com manutenção do pH mantido em 5,0 durante todo o processo fermentativo. O objetivo deste experimento foi verificar o comportamento do crescimento do microrganismo e, principalmente da síntese de celulases, frente ao uso do impelidor *pitched blade*.

Os gráficos da Figura 23, mostram as atividades de FPase e CMCase, assim como o consumo de celulose e produção de biomassa fúngica, no processo fermentativo com manutenção de pH 5,0, a 150 rpm de agitação e uso do impelidor do tipo Rushton (Figura 23A) e *pitched blade* (Figura 23B).

Figura 23 – Perfil de atividade de FPase, CMCCase, produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação nos dois tipos de impelidores: Rushton e *Pitched blade*.



A



B

FPase (●), CMCCase (▲), Celulose (■), Biomassa microbiana (◆), A. Fermentação com impelidor do tipo Rushton, B. Fermentação com impelidor *Pitched blade*. Fonte: Elaborada pelo autor.

Em oposição ao que foi apresentado na fermentação com impelidores Rushton, a síntese de CMCCase foi expressa já nas primeiras 48 horas. Neste mesmo período de tempo, a

atividade de FPase também foi maior ($562,3 \pm 0,93$ FPU/L), se comparado à fermentação com uso de impelidor do tipo Rushton ($334,3 \pm 0,3$ FPU/L).

Uma vez que as fermentações realizadas em frascos Erlenmeyers não permitiram o controle do sistema de homogeneização do caldo fermentado, no aumento de escala para reatores automatizados e com maiores capacidades volumétricas, o sistema de agitação tornou-se claramente um parâmetro chave a ser estudado de forma mais acurada. A mistura da cultura líquida é conseguida através da entrada de energia mecânica no reator, que depende de fatores como o tamanho da dorna, volume de meio líquido e de várias propriedades físicas do material a ser homogeneizado, em particular a viscosidade (VILLADSEN; NIELSEN; LIDÉN, 2011).

De acordo com Ahamed; Vermette (2010), os mecanismos de dispersão de gases e sólidos no caldo fermentado, através de agitação mecânica, ainda não são bem esclarecidos. Do mesmo modo, a influência da intensidade de agitação e o desenho dos impelidores na síntese de metabólitos. No entanto, os estudos dos sistemas de agitação em processos fermentativos são particulares para cada processo e devem ser estudados de forma que contemplem as características de possíveis partículas insolúveis no meio, a conformação do microrganismo utilizado e o metabólito sintetizado.

Segundo Villadsen; Nielsen; Lindén (2011), há uma tendência de acúmulo de bolhas de ar atrás das lâminas do impelidor Rushton, dificultando a distribuição de ar de forma mais rápida, se comparado a outros impelidores, como o *Pitched blade*. O decréscimo menos acentuado na produção de biomassa de *T. almostokiae* CMIAT 055 observada na fermentação conduzida com *Pitched blade*, mesmo que sutil em relação ao uso de impelidor Rushton, pode denotar que este perfil de maior dispersão de oxigênio tenha favorecido maior crescimento do microrganismo. Enquanto no processo com agitador Rushton a biomassa manteve-se em declínio até o final do processo, com uso de *Pitched blade* a quantidade de microrganismos manteve-se constante entre os tempos 120 h e 168 h. Esta manutenção da quantidade de microrganismos pode ter favorecido maiores atividades de FPase (845 FPU/L) e CMCase (2167 U/L) após encerrada a fermentação com estes últimos impelidores.

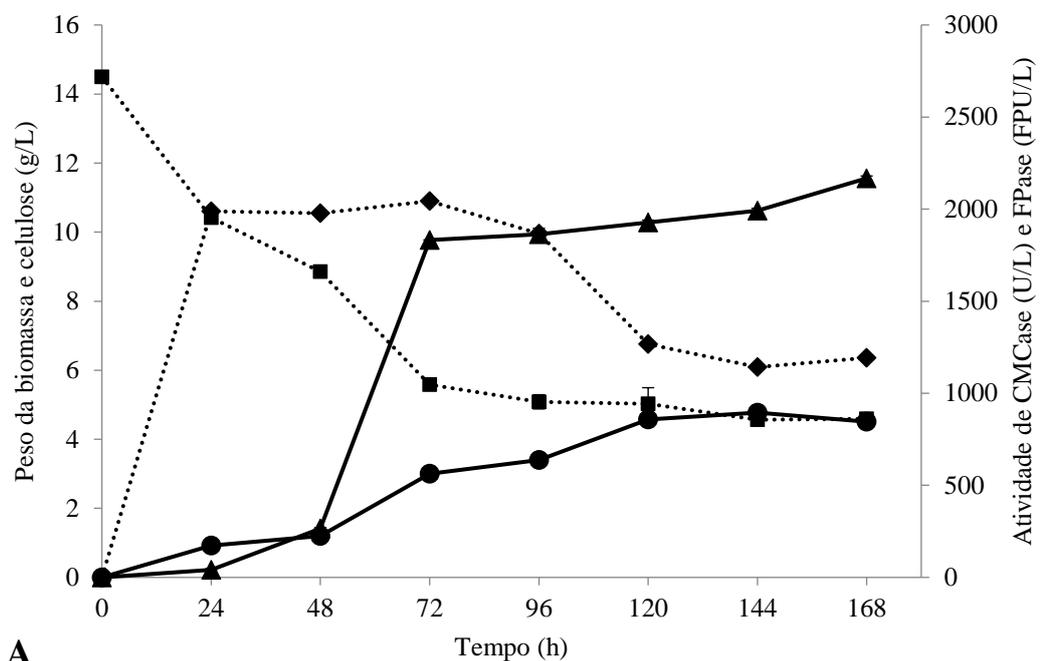
Um dos parâmetros geométricos mais importantes no estudo de reatores é a relação entre a altura e o diâmetro da dorna, que direciona as particularidades nas configurações de cada processo fermentativo. Principalmente aqueles relacionados ao perfil de

homogeneização do meio, se axial ou radial, que vai influenciar na intensidade de introdução de ar no cultivo microbiano, resultante do perfil de agitação. A mistura produzida por uma turbina Rushton é excelente na direção radial do tanque, mas a zona de mistura não se prolonga muito na direção axial. Além disso, o padrão de mistura radial típico da turbina Rushton é uma desvantagem na alta relação da altura do meio de cultura no tanque pelo diâmetro do tanque. Logo, deve-se considerar que todos os processos fermentativos estudados na tese mantiveram-se padronizados nas seguintes configurações: a) o mesmo volume de caldo de cultivo, obedecendo a um padrão de altura do volume reacional; b) obviamente, foram utilizadas as mesmas configurações da dorna em todos os experimentos; c) as turbinas, utilizadas em pares em todos os testes em biorreatores, foram fixadas no eixo central de forma equidistante, obedecendo a sugestão do fabricante e levando-se em consideração o volume de meio de cultura adotado; d) a vazão do ar injetado no caldo fermentado foi criteriosamente padronizada em todos os testes, assim como a localização do dispersor de ar logo abaixo dos impulsores; e) a quantidade de material sólido insolúvel também manteve-se padrão em todos os testes.

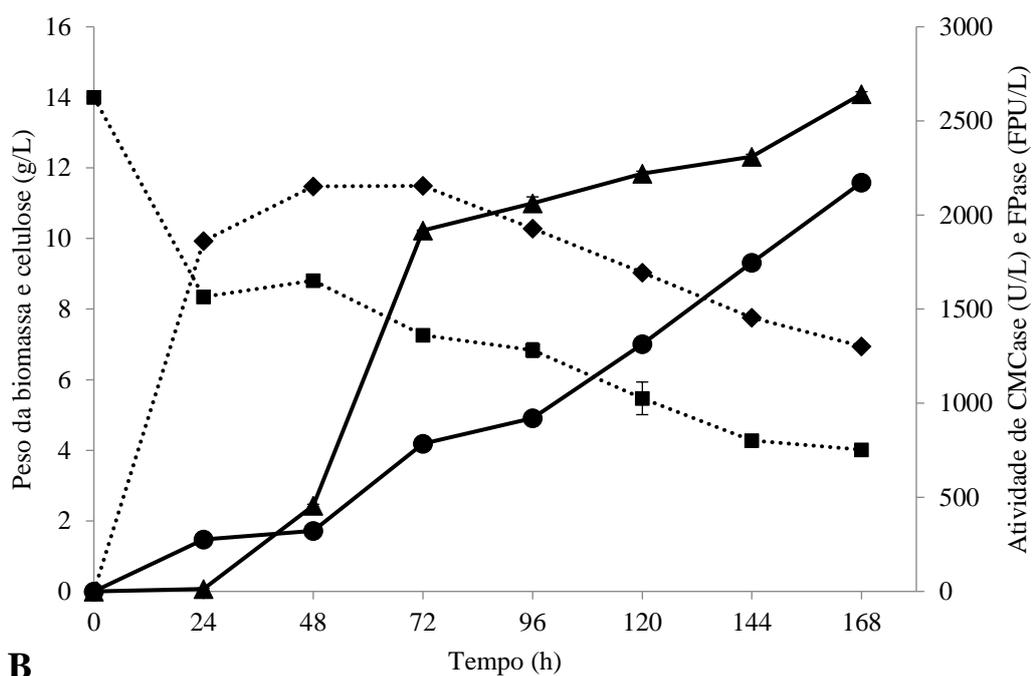
As particularidades do meio de cultura utilizado nos experimentos, com partículas insolúveis de pseudocaule da bananeira em suspensão no meio líquido, também devem ser consideradas. No geral, e dependendo das características do material a ser misturado, o padrão de fluxo radial pode resultar na redução da capacidade de bombeamento, assim como aumento na taxa de cisalhamento. Tais configurações de fluxo radial possivelmente não foram favoráveis para manutenção das partículas de pseudocaule da bananeira em suspensão de forma homogênea no meio de cultura. Segundo Villadsen; Nielsen; Lidén (2011), o padrão de escoamento através de impulsores axiais são mais apropriados para suspensão de sólidos em caldo fermentativo.

Diante do exposto, no experimento a seguir (Figura 24) foi utilizado o impelidor *pitched blade turbine* mantendo o pH 5,0 em todo processo fermentativo e a velocidade de rotação em 150 rpm.

Figura 24 – Perfil de atividade de FPase, CMCase, produção de biomassa e consumo de celulose em fermentação com velocidade de rotação 150 e 300 rpm.



A



B

FPase (●), CMCase (▲), Celulose (■), Biomassa microbiana (◆), A. Rotação dos impelidores 150 rpm, B. Rotação dos impelidores 300 rpm. Fonte: Elaborada pelo autor.

Se, em um processo fermentativo é observada a distribuição de um substrato de forma não homogênea, principalmente no uso de materiais que não se dissolvem no meio líquido, uma das principais estratégias torna-se aumentar a intensidade da agitação. Alguns autores afirmam que agitações com maiores velocidades rotacionais podem ocasionar mudanças na morfologia e comportamento do microrganismo e, conseqüentemente, influenciar de forma negativa na síntese de enzimas e outros metabólitos (AHAMED; VERMETTE, 2010a). De acordo com o exposto por Ganesh; Joshi; Sawant (2000), as enzimas celulolíticas tendem a perder atividade enzimática a medida que há um aumento na velocidade de agitação no meio líquido em biorreatores de tanque agitado. Nos experimentos realizados com turbinas do tipo Rushton, os autores destacam que o aumento da velocidade rotacional também acarreta em maiores forças cisalhantes no meio de cultivando, resultando em impacto negativo sobre o crescimento celular e produção de celulases.

Apesar de tais afirmações, os resultados aqui obtidos denotam que o aumento da velocidade rotacional de 150 rpm para 300 rpm foi benéfico para obtenção de maiores atividades de FPase e CMCCase. No tempo 168 horas, onde houveram as maiores atividades enzimáticas no terceiro e quarto experimento, houve um aumento em 3,15 vezes na atividade de FPase e 1,8 vezes na produção de endoglucanases.

Para efeitos de comparação de todos os testes realizados em biorreator, na tabela 29 estão expostos os resultados das maiores atividades enzimáticas observadas em todos as fermentações.

Tabela 29 – Comparação entre as máximas atividades enzimáticas dos testes realizados em biorreator*

Atividade enzimática	Teste 1	F2	F3	F4
FPase (FPU/L)	294,8 ± 14,1 (72 h)	702,9 ± 19,8 (168 h)	845,0 ± 15,9 (168 h)	2172,8 ± 6,0 (168 h)
CMCase (U/L)	628,6 ± 1,8 (72 h)	1949,8 ± 9,4 (168 h)	2167,0 ± 6,9 (168 h)	2642,05 ± 5,1 (168 h)

* Os dados em parênteses se referem ao tempo de fermentação no qual houve a maior atividade enzimática.

Fonte: elaborada pelo autor. F1 = teste sem controle de pH, rotação 150 rpm e impelidor Rushton; F2 = teste com pH mantido em 5,0, rotação 150 rpm e impelidor Rushton; F3 = teste com pH mantido em 5,0, rotação 150 rpm e impelidor Pitched blade; F4 = teste com pH mantido em 5,0, rotação 300 rpm e impelidor Pitched blade.

Logo, conclui-se que a fermentação com controle do pH em 5.0, uso de impelidor *Pitched blade* e velocidade de rotação 300 rpm foi a configuração mais propícia para a síntese de celulases por *T. almestokiae* 055 utilizando pseudocaule da bananeira como indutor.

5.3.4. Avaliação da estabilidade enzimática frente a diferentes pH e temperatura

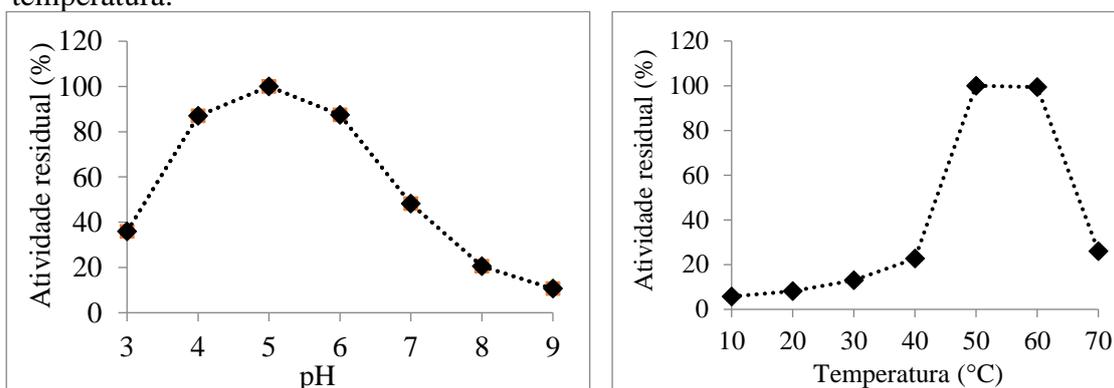
Foi realizado um estudo de estabilidade da enzima produzida mediante todos os parâmetros estabelecidos nos processos fermentativos dos experimentos anteriores. A relevância destes testes reside no fato de que diferentes aplicações requerem o uso de enzimas específicas com diferentes propriedades.

Para tal, uma amostra do extrato bruto enzimático coletada de processo fermentativo conduzido com os últimos parâmetros estabelecidos foi submetida a diferentes temperaturas e valores de pH, através da análise de atividade enzimática descrita no item 4.11 de Materiais e Métodos.

Inicialmente, os experimentos foram conduzidos de acordo com as condições estabelecidas na metodologia de análise enzimática (FPase), alterado o valor do pH do meio reacional em 3, 4, 5, 6, 7 e 9. Observa-se na Figura 25, que na análise de FPase apresentou maior atividade residual (%) em pH 5.

Já em relação à temperatura, o complexo enzimático manteve atividade entre 50 °C e 60°C, mas não apresentou tolerância abaixo de 40°C. Logo, em processos de hidrólise utilizando o extrato enzimático produzido por *T. amestolkiae* CMIAT 055 nas condições de fermentação aqui estabelecidas, seriam necessárias condições ambientais com pH em torno de 5.0 e temperaturas no intervalo 50 – 60°C.

Figura 25 – Perfil de estabilidade da enzima frente a diferentes valores de pH e temperatura.



Fonte: elaborada pelo autor.

São escassas as publicações acerca da estabilidade de celulasas oriundas de fungos do gênero *Talaromyces*. Wang al. (2014) analisaram uma amostra de *Talaromyces emersonii* para verificar a síntese de endoglucanases e a estabilidade destas em diferentes condições ambientais. O perfil de pH apresentado por esta linhagem mostra-se parecido com os resultados apresentados por *T. amestolkiae* CMIAT 055, com melhor atividade enzimática em pH 4.5 – 5.0. No entanto, os autores enfatizam que se trata de uma linhagem com característica termofílica, logo o complexo enzimático manteve melhores atividades enzimáticas na temperatura de 70°C.

5.3.5. Estimativa dos custos do meio de cultura para produção de celulases por *T. amestolkiae* CMIAT 055

A Tabela 30 mostra a estimativa de custos relacionados aos reagentes utilizados no meio de cultura utilizado do processo fermentativo em biorreator, com controle do pH em 5.0, uso de impelidor *Pitched blade* e velocidade de rotação 300 rpm.

Tabela 30 – Estimativa de custo do meio de cultura utilizado no ultimo processo fermentativo, com uso de pseudocaule da bananeira.

	Valor para 1L (R\$/U.L ⁻¹)
Pseudocaule da bananeira*	0,00
CaCl ₂ .7H ₂ O	0,77
KH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	4,48
Ureia	0,94
Sacarose**	4,49
Total	10,68
Maior atividade enzimática	FPase: 2172,8 ± 6,0 (168 h, em biorreator) CMCase: 2642,05 ± 5,1 (168 h, em biorreator)

*Não foi considerado o custo relativo ao consumo de energia elétrica dos processos de secagem e moagem do material. **Sacarose foi mantida no valor mínimo de 5g/L. Fonte: elaborada pelo autor.

Para efeitos de comparação somente do meio de cultura, desconsiderando a menor escala e o não controle de pH do meio de cultura, na Tabela 31 estão expostos os custos relacionados ao meio de cultura antes da seleção dos componentes através de planejamento experimental e sem o uso do material lignocelulósico como componente indutor para síntese de celulases.

Tabela 31 – Estimativa de custo do meio de cultura utilizado no primeiro processo fermentativo, com uso de celulose microcristalina.

	Valor para 1L (R\$/U.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,87
CaCl ₂ .7H ₂ O	0,13
Celulose microcristalina pura	12,04
Extrato de levedura	0,29
KH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,34
Peptona de carne	0,90
Sacarose	8,98
Ureia	0,18
Total	25,23
Maior atividade enzimática	FPase: 424,7 ± 6,0 (96 h, em Erlenmeyer) CMCase: 600,9 ± 2,2 (96h, em Erlenmeyer)

Fonte: elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÃO

O uso de estratégias para diminuição de custos e aumento de atividade enzimática na síntese de celulasas proposto neste estudo de tese foi alcançado, visto que propiciou um aumento de síntese de celulasas totais de $424,7 \pm 6,0$ (FPU/L), nas etapas iniciais dos experimentos, para $2172,8 \pm 6,0$ FPU/L no último processo fermentativo estudado. Este mesmo perfil foi observado na produção de endoglucanases.

As estratégias adotadas no processo foram: uso do fungo *T. almestokiae* CMIAT 055 selecionado dentre outras linhagens isoladas de solo amazônico; uso de pseudocaule da bananeira em substituição à celulose pura como componente indutor no meio de cultura; seleção e otimização do uso de apenas quatro componentes para elaboração do meio de cultura; fermentação em biorreator com uso de impelidores do tipo *Pitched blade* e velocidade de rotação 300 rpm.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Analisar o perfil de pH durante o processo fermentativo de forma mais acurada, variando este parâmetro em etapas, de acordo com o desenvolvimento do microrganismo.
- Realizar estudo de mais configurações do sistema de agitação, com outras turbinas e velocidades de rotação.
- Estudar o impacto da quantidade de inóculo inicial do processo fermentativo.
- Comparar a fermentação em regime de batelada simples com batelada alimentada.
- Realizar mais ensaios de estabilidade da enzima, frente a variados sais e condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N. et al. Characterization of banana (*Musa spp.*) pseudo-stem and fruit-bunch-Stem as a potential renewable energy resource. **AIP Conference Proceedings**, v. 8, n. 8, p. 325–330, 2014.
- ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 518–530, 2016.
- ADEOYO, O. R.; PLETSCHKE, B. I.; DAMES, J. F. Improved endoglucanase production and mycelial biomass of some ericoid fungi. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 15, 2017.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 5979–87, 2009.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 379–387, 2010.
- AYENI, A. O.; DARAMOLA, M. O. Lignocellulosic biomass waste beneficiation: Evaluation of oxidative and non-oxidative pretreatment methodologies of South African corn cob. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1771–1779, 2017.
- ALBUQUERQUE, T. L. et al. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p. 33–40, 2014.
- BAFFI, M. A. et al. Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 451–456, 2012.
- BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity and; biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2017.
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 634–647, 2016.

BILBA, K.; ARSENE, M. A.; OUENSANGA, A. Study of banana and coconut fibers. Botanical composition, thermal degradation and textural observations. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 58–68, 2007.

BUFFO, M. M. et al. Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 130–139, 2016.

BUSK, P. K.; LANGE, L. Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 47, 2013.

CALLOW, N. V; JU, L.-K. Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 6–7, p. 311–7, 2012.

CHEN, S. et al. Isocoumarins and benzofurans from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* possess α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities. **RSC Adv.**, v. 6, n. 31, p. 26412–26420, 2016.

COSTA, J. A. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 249–259, 2015.

COSTA, P. S. et al. Enhancement of *Penicillium echinulatum* glycoside hydrolase enzyme complex. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 627–639, 2016.

DELABONA, P. S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource technology**, v. 107, n. 2012, p. 517–21, 2012.

DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.

DHILLON, G. S. **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. London: Nikki Levy, 2016.

DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1531–8, 2008.

EUGENIO, L. I. et al. β -1,4-endoglucanases from *Talaromyces amestolkiae*: Production of glucooligosaccharides from different β -glucans. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2017.

EVELEIGH, D. E. et al. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, p. 21, 2009.

FARIAS, V. L. DE et al. Comparison of *Aspergillus niger* spore production on Potato Dextrose Agar (PDA) and crushed corncob medium. **J. Gen. Appl. Microbiol**, v. 56, p. 399–402, 2010.

FOLAN, M. A.; MICHAEL, P. The saccharifying ability of the cellulase complex of *Talaromyces emersonii* and comparison with that of other fungal species. **Int. J. Biochem**, v. 10, p. 505–510, 1979.

FRISVAD, J. C. et al. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 179–189, 1990.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FUJII, T. et al. Taxonomic revision of the cellulose-degrading fungus *Acremonium cellulolyticus* nomen nudum to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 1, p. 32–41, 2014.

FUJII, T. et al. Draft genome sequence of *Talaromyces cellulolyticus* strain Y-94, a source of lignocellulosic biomass-degrading enzymes. **Genome announcements**, v. 3, n. 1, p. 14–15, 2015.

FUJII, T.; INOUE, H.; ISHIKAWA, K. Decreased cellulase and xylanase production in the fungus *Talaromyces cellulolyticus* by disruption of *tacA* and *tctA* Genes, encoding putative zinc finger transcriptional factors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3218–3229, 2015.

GABELLE, J.-C. et al. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 75, p. 408–417, 2012.

GANESH, K.; JOSHI, J. B.; SAWANT, S. B. Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p. 137–141, 2000.

GERARDO, N. M. et al. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1550, p. 1791–1798, 2004.

GHOBADI, N. et al. Characterizations of the submerged fermentation of *Aspergillus oryzae* using a fullzone impeller in a stirred tank bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 101–108, 2017.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fibre and analyses. **Agric. Res. Serv**, v. 379, p. 1, 1970.

GOLDBECK, R. et al. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource technology**, v. 128, p. 797–803, jan. 2013.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. (Eds.). **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971. p. 241–266.

GOUVEIA, E. R. et al. Validación de metodología para caracterización química de bagazo de caña-de-azúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GOYARI, S. et al. Population, diversity and characteristics of cellulolytic microorganisms from the Indo-Burma Biodiversity hotspot. **SpringerPlus**, v. 3, p. 700, 2014.

GOYARI, S. et al. Unveiling the optimal parameters for cellulolytic characteristics of *Talaromyces verruculosus* SGMNPF3 and its secretory enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 88–98, 2015.

GUILHERME, A. A. et al. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 23–33, 2015.

GUIMARÃES, J. L. et al. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 407–415, 2009.

GUNNY, A. A. N. et al. Improvement of halophilic cellulase production from locally isolated fungal strain. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 476–483, 2014.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419–25, 2011.

GUSAKOV, A. V. Cellulases and hemicellulases in the 21st century race for cellulosic ethanol. **Biofuels**, v. 4, n. 6, p. 567–569, 2013.

HAALAND, P. D. Experimental design in biotechnology. **Drying Technology**, v. 9, n. 3, p. 817, 1991.

HASUNUMA, T. et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource technology**, v. 135, p. 513–22, 2013.

HE, R. et al. Mutagenesis and evaluation of cellulase properties and cellulose hydrolysis of *Talaromyces piceus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1811–1819, 2015.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.

ILMBERGER, N.; POTTKÄMPER, J.; STREIT, W. Cellulases in ionic liquids—the long term stability of *Aspergillus* sp. cellulase. **Catalysts**, v. 3, p. 584–587, 2013.

JA 'AFARU, M. I. et al. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. **ISRN Microbiology**, v. 7, 2013.

JÄGER, G. et al. Screening of cellulases for biofuel production: online monitoring of the enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose using high-throughput scattered light detection. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 1, p. 74–85, 2011.

JAYAPRABHA, J. S.; BRAHMAKUMAR, M.; MANILAL, V. B. Banana pseudostem characterization and its fiber property evaluation on physical and bioextraction. **Journal of Natural Fibers**, v. 8, n. 3, p. 149–160, 2011.

JING, L. et al. Isolation and characterization of a novel *Penicillium oxalicum* strain Z1-3 with enhanced cellobiohydrolase production using cellulase-hydrolyzed sugarcane bagasse as carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 77, n. 23, p. 666–675, 2015.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3519 – 3525, 2005.

JUNG, D. U. et al. Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 145–150, 2015.

JÚSTIZ-SMITH, N. G.; VIRGO, G. J.; BUCHANAN, V. E. Potential of Jamaican banana, coconut coir and bagasse fibres as composite materials. **Materials Characterization**, v. 59, n. 9, p. 1273–1278, 2008.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KONGRUANG, S. et al. Assaying the activities of *Thermomonospora fusca* E5 and *Trichoderma reesei* CBHI cellulase bound to polystyrene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 539–545, 2003.

KRISTENSEN, J. B. et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 888–895, 2007.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–91, 2008.

LE CROM, S. et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 38, p. 16151–16156, 2009.

LEÃES, F. L. et al. Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. In: PURCHASE D. (Ed.). **Research in Microbiology**. [s.l.] Springer, Cham, 2016. v. 167p. 83–89.

LI, C. et al. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 470–7, 2013.

LIBARDI, N. et al. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 190–199, 2017.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. In: **Bioprocess and Biosystems Engineering**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2016. v. 39p. 133–140.

LO, C.-M. et al. Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1494–1503, 2010.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.

MALLEK-FAKHFAKH, H. et al. Agricultural wastes as substrates for β -glucosidase production by *Talaromyces thermophilus*: Role of these enzymes in enhancing waste paper saccharification. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, n. 4, p. 414–423, 2017.

MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Eds.) **Advances in Chemistry**. WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1969. v. 95p. 391–414.

MANOCH, L.; DETHOUP, T. A potential use of *Talaromyces* species as biological agents against plant pathogenic fungi. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 44, n. 2, p. 81–91, 2011.

MARTINS, A. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Org.)**. Técnica modificada de microcultura de fungos para visualização microscópica. 2008. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN-2009-09/31525/3/cot176_0808.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2016.

MATKAR, K. et al. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 24–33, 2013.

MIRANDA-HERNÁNDEZ, F.; ANGEL-CUAPIO, A.; LOERA-CORRAL, O. Production of fungal spores for biological control. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production, Isolation and Purification**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2017. p. 757–779.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 22, p. 6115–6, 1992.

MOLONEY, A. P.; CONSIDINE, P. J.; COUGHLAN, M. P. Cellulose hydrolysis by the cellulases produced by *Talaromyces emersonii* when grown on different inducing substrates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, p. 1169–1173, 1983.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Campina Grande: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>>.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119–1127, 2011.

MURRAY, P. et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3- β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**, v. 38, n. 2, p. 248–257, 2004.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulases: from production to biotechnological applications. In: GOLAN, A. E. (Ed.). **Cellulase: types and action, mechanism, and uses**. New York: Nova Science, 2011. p. 306.

NGUYEN, T. T. T.; PAUL, N. C.; LEE, H. B. Characterization of *Paecilomyces variotii* and *Talaromyces amestolkiae* in Korea based on the morphological characteristics and multigene phylogenetic analyses. **Mycobiology**, v. 44, n. 4, p. 248, 2016.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M. et al. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3 - β - xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: An enzyme displaying regioselective transxylosylation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6380–6392, 2015.

OGEDA, L. T.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OKUDA, N. et al. Enhancing cellulase production by overexpression of xylanase regulator protein gene, *xlnR*, in *Talaromyces cellulolyticus* cellulase hyperproducing mutant strain. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 8451, p. 1–4, 2016.

SILVA, C. O. G.; FILHO, E. X. F. A Review of Holocellulase Production using pretreated lignocellulosic substrates. **Bioenerg. Res.**, v. 10, p. 592–602, 2017.

OLSSON, L. et al. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 612–619, 2003.

ORENCIO-TREJO, M. et al. Cellulase and xylanase production by the Mexican strain *Talaromyces stollii* LV186 and its application in the saccharification of pretreated corn and sorghum stover. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1034–1045, 2016.

ORGILL, J. J. et al. A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, Hollow fiber membrane and stirred tank reactors. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 340–346, 2013.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452–81, 2006.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PRASETYO, J. et al. Response of cellulase activity in pH-controlled cultures of the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 52–61, 2010.

QUEIROZ, V. L.; AWAN, A. T.; TASIC, L. Low-cost enzymes and their applications in bioenergy sector. In: **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 111–131.

RABEMANOLONTSOA, H.; AYADA, S.; SAKA, S. Quantitative method applicable for various biomass species to determine their chemical composition. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4630–4635, 2011.

RADCHENKOVA, N. et al. Optimization of the aeration and agitation speed of *Aeribacillus palidus* 418 exopolysaccharide production and the emulsifying properties of the product. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 576–582, 2014.

RAGHUWANSHI, S. et al. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183–189, 2014.

REIS, C. L. B. et al. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 694–701, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROMERO, S. M. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3–5, p. 244–250, 1999.

ROMERO, S. M. et al. *Talaromyces systylus*, a new synnematosous species from Argentinean semi-arid soil. **Nova Hedwigia**, v. 102, n. 1, p. 241–256, 2016.

- SAINI, R. et al. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource technology**, v. 188, p. 240–246, 28 Jan. 2015.
- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and indoor fungi. In: **Food and indoor fungi**. Utrecht, The Netherlands: [s.n.]. p. 390.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159–183, 2011.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.
- SHAH, S. P.; KALIA, K. S.; PATEL, J. S. Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* using banana agrowaste as a substrate. **J Gen Appl Microbiol**, v. 43, p. 35–43, 2015.
- SHAJAHAN, S. et al. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 3, 2016.
- SHARMA, A. et al. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346–1380, 2016.
- SHARMA, R.; OBEROI, H. S.; DHILLON, G. S. Fruit and vegetable processing waste: renewable feed stocks for enzyme production. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production**. [s.l.] p. 23 - 59. Elsevier Inc., 2016.
- SINGH, S. et al. Production, optimization and evaluation of multicomponent holocellulase produced by *Streptomyces sp.* ssr-198. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 5, p. 2379–2386, 2014.
- SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SLUITER, A. et al. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, p. 9, 2008.

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

SOUSA, K. A. et al. Optimization of cellulase production by *Trichoderma* strains using crude glycerol as a primary carbon source with a 24 full factorial design. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2016.

STATE, V. et al. *Talaromyces ocotl* sp. nov. and observations on *T. rotundus* from conifer forest. **Mycological Society of America**, v. 93, n. 3, p. 528–540, 2016.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421–424, 2009.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832–844, 2005.

TANG, W. et al. Improvement of glucoamylase production using axial impellers with low power consumption and homogeneous mass transfer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 167–176, 2015.

TAPPI. **T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. Disponível em: <<http://www.tappi.org/content/SARG/T222.pdf>>. Acesso em: 7 ago. 2015.

TERVASMÄKI, P. et al. Mass transfer, gas hold-up and cell cultivation studies in a bottom agitated draft tube reactor and multiple impeller Rushton turbine configuration. **Chemical Engineering Science**, v. 155, p. 83–98, 2016.

TIMUNG, R. et al. Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 9–18, 2015.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9 - 18, 2013.

VANDENBERGHE, L.P. CARVALHO, S. J. C. et al. Microbial nzyme factories: current trends in production processes and commercial aspects. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. (Eds.). **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. London: Elsevier, 2016. p. 1–22.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa**, p. 1–59, 2013.

VENTORINO, V. et al. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. DEC, p. 1–15, 2016.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. Scale-Up of Bioprocesses. In: **Bioreaction Engineering Principles**. Boston, MA: Springer US, 2011. p. 497–546.

VILLANUEVA-LOZANO, H. et al. Successful treatment of *Talaromyces amestolkiae* pulmonary infection with voriconazole in an acute lymphoblastic leukemia patient. **Journal of Infection and Chemotherapy**, p. 2016–2018, 2017.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343–371, 2014a.

VISAGIE, C. M. et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, 2014b.

WANG, K. et al. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1448–1456, 2014.

WANG, Q. et al. *Talaromyces neofusisporus* and *T. qii*, two new species of section *Talaromyces* isolated from plant leaves in Tibet, China. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. April 2015, p. 1–9, 2016.

WISE, L. E. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. **Paper Trade Journal**, v. 122, n. 2, p. 35–43, 1946.

XIONG, H. et al. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 731–736, 2004.

YANG, W. et al. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 262–267, 2014.

YAO, R.; HOU, W.; BAO, J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. **Bioresource Technology**, ago. 2017.

YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 39–54, 2012.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 175–341, 2014.

YILMAZ, N. et al. Four novel *Talaromyces* species isolated from leaf litter from Colombian Amazon rain forests. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10–11, p. 1041–1056, 2016.

YUAN, L. et al. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium oxysporum*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, n. Icese 2011, p. 1213–1219, 2012.

ZHANG, R.; LI, X.; FADEL, J. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 277–284, 2002.

ZHANG, Z. et al. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 107, 2014.

ZHENG, J. L. et al. Effects of increased impeller power in a production-scale *Aspergillus oryzae* fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 437–444, 2002.

ZHOU, S.; YANG, Q.; RUNGE, T. M. Ambient-temperature sulfuric acid pretreatment to alter structure and improve enzymatic digestibility of alfalfa stems. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 410–416, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Tabela 1 – Meio Mandels e Weber (1969) – solução estoque

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0037 g
KH ₂ PO ₄	2,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0016 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 2 – Meio de cultura para produção de celulases com celulose microcristalina como componente indutor*

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Celulose microcristalina (SIGMA)	10,0 g
Sacarose	10,0 g
Solução estoque – Mandels e Weber	1000 mL

*pH final do meio de cultura = 5,0. Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3 – Meio de cultura para produção de celulases com substratos lignocelulósicos como componentes indutores*¹

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Material lignocelulósico	10,0 g ^{*2}
Sacarose	10,0 g ^{*3}
Solução estoque – Mandels e Weber	1000 mL

*pH final do meio de cultura = 5,0. ^{*2} BC, FT, SM e PB. A quantidade de material lignocelulósico variou nos ensaios de planejamento experimental. ^{*3} Também foram realizados ensaios sem a presença de açúcar solúvel. A quantidade de material lignocelulósico também variou nos ensaios de planejamento experimental. Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 4 – Meio de cultura Ágar Batata Dextrose

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Ágar Batata Dextrose (SIGMA)	39,0 g
Água destilada	1000 mL

*pH final do meio de cultura = 5,0. Fonte: elaborada pelo autor

APÊNDICE 2 – MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Tabela 1 – Meio de cultura Czapek - solução estoque

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 2 – Solução de sais (elementos traços) - solução estoque

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3 – Meio de cultura Ágar Extrato de Malte

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Extrato de malte (Oxoid)	50,0 g
Agar	20,0 g
Elementos traços - estoque	1 mL

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 4 – Meio de cultura Agar Sacarose Creatinina (CREA)

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Sacarose	30 g
Creatinina.H ₂ O	3 g
K ₂ PO ₄ .7H ₂ O	1,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
Elementos traços - estoque	1 mL

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 5 – Meio de cultura Agar Czapek

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Solução estoque Czapek	10 mL
Sacarose	30,0 g
Elementos traços - estoque	1,0 mL
Agar	20,0 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 6 – Meio de cultura Agar Czapek Extrato levedura (CYA)

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Solução estoque Czapek	10,0 mL
Sacarose	30,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Elementos traços - estoque	1,0 mL
Agar	20,0 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 7 – Meio de cultura Agar Czapek com 5% de NaCl (CYAS)

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Solução estoque Czapek	10,0 mL
Sacarose	30,0 g
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Elementos traços - estoque	1,0 mL
NaCl	50,0 g
Agar	20,0 g

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 8 – Meio de cultura Agar Aveia

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Aveia em flocos	30,0 g
Elementos traços - estoque	1,0 mL

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 9 – Meio de cultura Agar extrato de levedura - sacarose

Componentes	Quantidade (g/1000 mL)
Extrato de levedura	20 g
Sacarose	150 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Elementos traços - estoque	1 mL

Fonte: elaborada pelo autor