



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 FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
MICRO-ORGANISMOS PROSPECTADOS EM COLEÇÕES DE CULTURAS
NACIONAIS**

FORTALEZA – CE

2012



GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
MICRO-ORGANISMOS PROSPECTADOS EM COLEÇÕES DE CULTURAS
NACIONAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Co-orientadora: Dra. Kally Alves de Sousa

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

F144p

Faheina Junior, Genilton da Silva.

Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais / Genilton da Silva Faheina Junior. - 2012.

75 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Processos químicos e bioquímicos

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

Coorientação: Profa. Dra. Kally Alves de Sousa.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas de fungos. 3. Biocombustível. I. Título.

CDD 660

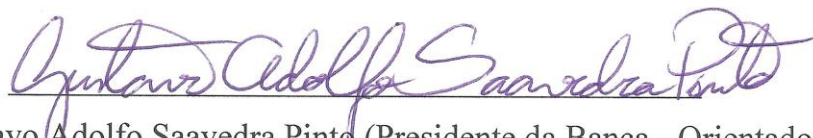
GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS PROSPECTADOS EM COLEÇÕES DE
CULTURAS NACIONAIS**

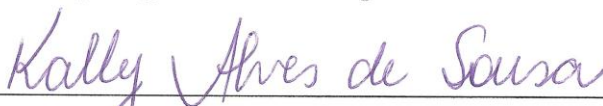
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 13/02/2012.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Presidente da Banca - Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE

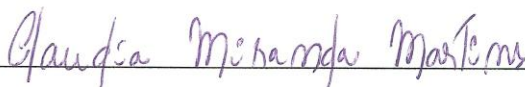


Dra. Kally Alves de Sousa (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC/CE

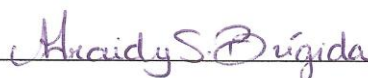


Dra. Sônia Couri

Instituto Federal do Rio de Janeiro – IFRJ/RJ



Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará - UFC/CE



Dra. Ana Iraidy Santa Brígida
Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE

A Deus, fonte de infinita sabedoria e Mestre de todos os mestres.

À minha família, fonte de amor, acolhimento e paciência.

Dedico-lhes mais uma conquista com imensurável gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus, meu criador e provedor de tudo, criador da biomassa vegetal, da celulose e da inteligência humana em querer transformar tudo isso em açúcares fermentescíveis utilizando celulasas.

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, Eduardo, Luquinha, Bia, Ígor, Miguel e meus avós Mãe Penha e Pai Tunino. A todos os meus familiares que torcem por mim e querem me ver realizado.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto por ter confiado no meu trabalho desde a graduação, por tantos 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.

A todos os meus companheiros de graduação e pós-graduação, em especial à Gisani, Natália Lima, Niédila, Thatyane, Tatiana Nunes, Tatiane Cavalcante e Simone. À toda turma de 2010.1 do mestrado em Engenharia Química. Com vocês pude compartilhar números, emoções e cuzcuz com ovo e café nos intervalos dos estudos. Foi duro, mas foi divertido!

A todos os companheiros do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical: Adriana, Andréa, Ana Paula, Bruno, Carol, Carina, Cívita, Cintya, Diego, Hélder, Ídila, Janaína, Leise, Luciana, Marcos, Manú, Mariza, Natália Lima, Natália Moura, Rakel, Renata e Virna. Vocês são muito mais que companheiros de trabalho. Muito obrigado por tanta torcida e pelos momentos de descontração.

Ao grupo de celulasas, Mariza, Carol e Diego. Assim como Verônica e Raíssa, que já alçaram voos mais distantes, mas serão eternamente do grupo Celulasas. Eu realmente não tenho palavras pra agradecer por tanta dedicação, esforço, risadas ao pé da pia lavando tubos e tubos, batas sujas de DNS... Vocês são demais! Serei sempre grato.

À Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins, que me concedeu a oportunidade de iniciar no mundo da pesquisa científica. Sempre serei grato por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e por ter me passado tanto conhecimento e incentivo. À Profa. Dra. Claudia Miranda Martins, pelo incentivo e dedicação incessantes para o meu crescimento profissional.

À Fundação Maria Nilva Alves, que permitiu o acesso à Reserva Ecológica da Saporanga.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram participar da avaliação do meu trabalho: Dra. Sonia Couri, Dra. Ana Iraidy Santa Brígida e Dra. Claudia Miranda Martins.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por permitir o desenvolvimento dos experimentos nos laboratórios de Bioprocessos, Processamentos Agroindustriais e de Físico-Química.

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

À Capes e ao CNPq, pela concessão da bolsa durante o curso.

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

“A falsa ciência cria os ateus, a verdadeira, faz
o homem prostrar-se diante da divindade.”

Voltaire

RESUMO

As pesquisas acerca de fontes alternativas de combustíveis tem se concentrado principalmente na biomassa composta de celulose, hemicelulose e lignina. Os carboidratos estruturais contidos na matriz celulósica representam o substrato que pode ser utilizado para produção de biocombustíveis por processos fermentativos. A opção pela hidrólise enzimática de biomassa vegetal, utilizando celulasas, pode gerar uma opção de menor impacto ambiental frente a outros processos de hidrólise. Estudos sobre novas fontes microbianas e, análises mais acuradas das etapas que compõem a produção de celulasas são essenciais como estratégias para diminuir os custos gerados pelo uso de celulasas nos processos de obtenção de açúcares fermentescíveis. Portanto, este trabalho tem como objetivo a seleção de fungos filamentosos, produtores de enzimas do complexo celulolítico, assim como a investigação dos parâmetros que envolvem a produção de celulasas através do processo de fermentação submersa. Em uma etapa inicial foram selecionados os micro-organismos por metodologia em placas, onde se averiguou o potencial celulolítico através do índice enzimático em meio específico. Foram selecionadas as linhagens que atingiram um diâmetro de crescimento de colônia de 150 mm, em placas de Petri, em menor tempo de incubação (48 horas). Da etapa de seleção inicial, foram escolhidos os micro-organismos com maior potencial enzimático que foram então submetidos aos testes em fermentação submersa. O primeiro teste consistiu em selecionar os micro-organismos como melhores produtores de celulasas totais (FPase) em erlenmeyer não aletados contendo 100 mL de meio de cultura específico. O teste subsequente analisou as três melhores linhagens da etapa anterior, que foram então submetidos à fermentação submersa em frascos contendo aletas. A etapa seguinte teve o intuito de investigar a produção enzimática em fermentação com quatro tipos de açúcares solúveis: glicose, lactose, sacarose e xilose. A linhagem fúngica selecionada nas etapas anteriores foi utilizada nos testes em biorreator, onde foram analisados três diferentes estratégias de inoculação. Dentre os fungos analisados na etapa inicial, destacaram-se as linhagens *Fusarium* sp. SAP 09, *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040, *Trichoderma* sp. LCB 79, *Trichoderma*, sp. INPA 666, *Trichoderma* sp. INPA 1014 e *Trichoderma* sp. INPA 1218. Na etapa de seleção por fermentação submersa em frascos não aletados, a melhor atividade de FPase foi apresentada pela linhagem *Trichoderma* sp. INPA 666 (48,0 FPU/L) e CMCCase pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040 (350,0 U/L). Na comparação com erlenmeyers aletados, houve uma maior produção tanto de FPase quanto de CMCCase em frascos sem a presença de aletas, apontando que as forças de cisalhamento aplicadas nas culturas fúngicas possivelmente foram

deletérias para a produção enzimática. O uso de sacarose mostrou-se ser a melhor opção dentre os açúcares solúveis testados, apresentando os maiores valores de atividade de FPase (49,9 FPU/L) e CMCase (119,7 U/L). A melhor estratégia de inoculação para o biorreator foi uma suspensão de esporos obtidos a partir de uma fermentação semi-sólida de farelo de trigo, no tempo de 72 horas de fermentação.

Palavras-chave: enzimas celulolíticas, biocombustíveis, seleção de fungos

ABSTRACT

The research about alternative sources of fuels has been mainly focused on biomass composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The structural carbohydrates contained in the cellulosic matrix represent the substrate that can be used for biofuel production by fermentative processes. The choice of the biomass enzymatic hydrolysis of plants using cellulases, can generate an option less environmental impact compared to other processes of hydrolysis. Studies about microbial new sources, and more accurate analysis of the steps that make up the production of cellulases are essential as a strategy to reduce the costs generated by the use of cellulases in the process of obtaining fermentable sugars. This study aims at the selection of filamentous fungi producers of cellulolytic enzymes, as well as investigating the parameters of cellulase production by submerged fermentation process. In the initial stage were selected micro-organisms by methodology in plates. Was investigated the potential cellulolytic enzyme through the index in a specific medium and were selected strains that reached a diameter of colony growth of 150 mm in Petri dishes in a shorter time of incubation (48 hours). Were selected micro-organisms with the greatest potential enzymatic tests that were then tested in submerged fermentation. The first test consisted in selecting the best microorganisms as producers of FPase in non-baffled flask containing 100 mL of culture medium specific. In the subsequent test were examined the three best strains from the previous step, which were then subjected to submerged fermentation in baffled flasks. The next step was designed to investigate the enzyme production in fermentation with four types of soluble sugars: glucose, lactose, sucrose and xylose. The fungal strain was selected in the previous steps used in the tests in a bioreactor, which analyzed three different strategies of inoculation. The strains *Fusarium* sp. SAP 09, *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040, *Trichoderma* sp. LCB 79, *Trichoderma* sp. INPA 666, *Trichoderma* sp. INPA 1014 and *Trichoderma* sp. INPA 1218 were selected from the first stage. In the selection stage by submerged fermentation in non-baffled flasks, the best FPase activity was achieved by the strain *Trichoderma* sp. INPA 666 (48.0 FPU /L) and CMCCase by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040 (350.0 U /L). In comparison with baffled flasks, there was a greater production both FPase and CMCCase in Erlenmeyer without baffles, indicating that the shear forces applied to the fungal cultures were potentially harmful for enzyme production. The use of sucrose proved to be the best option among soluble sugars tested, with higher rates of FPase activity (49.9 FPU / L) and CMCCase (119.7 U / L). The best strategy for the inoculation was a spore suspension obtained from a solid state fermentation of wheat bran, in the time of 72 hours of fermentation.

Key-words: cellulolytic enzymes, biofuels, selection of fungi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração esquemática da parede celular de vegetais.....	23
Figura 2 -	Ilustração esquemática de cadeias de celulose unidas.....	25
Figura 3 -	Ilustração esquemática de microfibrilas de celulose até os monômeros de glicose que formam a estrutura celulósica na parede celular vegetal.....	26
Figura 4 -	Ilustração esquemática do ataque de enzimas celulasas na matriz de celulose	31
Figura 5 -	Fotografia de colônia de fungo em placa de Petri com halo de hidrólise evidenciado após coloração com vermelho congo, onde: ϕ_c = diâmetro de crescimento da colônia; ϕ_h = diâmetro do halo de hidrólise.....	41
Figura 6 -	Fotografia da vista da base de um frasco erlenmeyer. A. não aletado. B. aletado (presença de aletas).....	43
Figura 7 -	Fotografia do biorreator marca New Brunswick, modelo Bioflo®/Celligen®115 em operação	45
Figura 8 -	Perfil enzimático de FPase das linhagens nos testes de fermentação submersa em erlenmyers não aletados.....	53
Figura 9 -	Perfil enzimático de CMCCase das linhagens nos testes de fermentação submersa em erlenmyers não aletados.....	54
Figura 10 -	Crescimento dos fungos denotado através do peso seco da biomassa, em g/L.....	55
Figura 11 -	Comparação da atividade de FPase (FPU/L) de <i>Trichoderma</i> sp. INPA 666, <i>Trichoderma</i> sp. LCB 79 e <i>L. theobromae</i> CNPAT 040 em testes realizados com erlenmyers não aletados e aletados.....	57
Figura 12 -	Comparação da atividade de CMCCase (U/L) de <i>Trichoderma</i> sp. INPA 666, <i>Trichoderma</i> sp. LCB 79 e <i>L. theobromae</i> CNPAT 040 em testes realizados com erlenmyers não aletados e aletados.....	57

Figura 13 -	Aspecto cultural de <i>Trichoderma</i> sp. INPA 666 cultivada em frascos Erlenmeyer. A. Presença de pellets em frascos aletados. B. formação de filamentos de hifas do fungo em frascos não aletados.....	59
Figura 14 -	Perfil de produção de celulases por <i>Trichoderma</i> sp. INPA 666 com diferentes fontes de açúcares solúveis.....	61
Figura 15 -	Produção de FPase, CMCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em BDA.....	63
Figura 16 -	Produção de FPase, CMCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em meio farelo de trigo.....	64
Figura 17 -	Produção de FPase, CMCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em meio de cultura líquido.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de fermentação segundo adaptação de Mandels e Weber (1969).....	42
Tabela 2 -	Composição dos testes para a produção de celulasas sob diferentes fontes de açúcares solúveis.....	44
Tabela 3 -	Valores do índice enzimático (i.e.), diâmetros dos halos de crescimento ($\varnothing c$) e hidrólise ($\varnothing i$) apresentados pelas linhagens analisadas. (*) Tamanho do halo de crescimento após 48 horas de incubação, (-) ausência.....	52
Tabela 4 -	Perfil de pH final das linhagens analisadas.....	55
Tabela 5 -	Valores de FPAse das diferentes estratégias de inoculação em 72 horas de fermentação.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Biomassa Lignocelulósica.....	22
2.1.1	<i>Celulose.....</i>	25
2.2	Degradação da biomassa lignocelulósica.....	27
2.3	Enzimas.....	29
2.3.1	<i>Celulases.....</i>	29
2.3.1.1	<i>Endoglucanases.....</i>	31
2.3.1.2	<i>Exoglucanases.....</i>	32
2.3.1.3	<i>Celobiasas.....</i>	32
2.4	Micro-organismos produtores de celulases.....	32
2.5	Fermentação submersa para produção de celulases.....	34
3	OBJETIVOS.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Micro-organismos e Técnicas de Manutenção.....	39
4.2	Procedimentos e Meio de Ativação dos Micro-organismos.....	39
4.3	Etapa Inicial de Seleção das Linhagens.....	39
4.4	Testes de Fermentação Submersa.....	41
4.4.1	<i>Testes em erlenmeyers não aletados.....</i>	41
4.4.2	<i>Comparação entre erlenmeyers aletados e não-aletados.....</i>	42
4.4.3	<i>Estudo de diferentes açúcares solúveis nos meios fermentativos para produção de celulases.....</i>	43
4.5	Testes em Biorreator.....	44
4.5.1	<i>Obtenção de esporos em meio BDA.....</i>	46
4.5.2	<i>Obtenção de esporos em meio farelo de trigo.....</i>	46
4.5.3	<i>Obtenção de esporos em meio de pré-cultivo.....</i>	46
4.6	Determinações analíticas.....	47
4.6.1	<i>Teor de Açúcares Redutores Totais.....</i>	47
4.6.2	<i>Determinação de celulases totais em papel de filtro (FPase).....</i>	48
4.6.3	<i>Determinação de endo-β-1,4 glucanases (CMCase).....</i>	49
4.6.4	<i>Determinação de biomassa e pH.....</i>	50

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Etapa Inicial de Seleção das Linhagens com Potencial Celulolítico.....	52
5.2	Testes de fermentação submersa: testes em erlenmeyers não aletados.....	53
5.3	Comparação entre erlenmeyers aletados e não-aletados.....	56
5.4	Estudo de diferentes açúcares solúveis nos meios fermentativos para produção de celulasas.....	60
5.5	Testes em Biorreator.....	62
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

A necessidade por fontes alternativas de energia tem desencadeado uma busca intensiva por combustíveis de origem não fóssil. Destacam-se, neste cenário, o bioetanol e o biodiesel obtidos a partir de matérias-primas renováveis, que conhecidamente ocasionam a redução das emissões de monóxido de carbono na atmosfera (ASHBY *et al.*, 2005). É pertinente enfatizar a importância que passa a ter a biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a obtenção de energia. Esta biomassa é conhecida como material de carbono neutro, pois quando utilizada não representa acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, não contribuindo para o aquecimento global (LIN; TANAKA, 2006). A síntese de bioprodutos e a geração de bioenergia baseadas na matriz lignocelulósica, a baixos custos, é um passo chave no ciclo do carbono global, importante para o desenvolvimento sustentável da espécie humana (DUTTA *et al.*, 2008; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Pesquisas tem se concentrado na fração da biomassa composta de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é a fonte biológica natural renovável mais abundante do planeta, com representação de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas da produção anual de biomassa (KLEMM *et al.*, 2005).

As frações de celulose e hemicelulose, que compõem cerca de dois terços da matéria seca celular, podem ser utilizadas para obtenção de açúcares fermentescíveis. A celulose constitui-se como o principal componente, com cerca de 30 a 60% de matéria seca total da matéria-prima. É um homopolissacarídeo insolúvel em água e de difícil digestão pelos seres humanos devido a sua estrutura robusta composta de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e com ligações de hidrogênio intermoleculares rígidas, dando a esta forma de fita (BON; GIRIO; PEREIRA JR, 2008; HAMELINK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósicas representam o substrato que podem ser utilizados para produção de biocombustíveis por processos fermentativos (SUN; CHENG, 2002).

Uma eficiente bioconversão do material lignocelulósico em açúcares e biocombustível celulósico envolve três etapas principais: 1. fracionamento da matéria-prima para diminuição do tamanho e pré-tratamento; 2. sacarificação enzimática; e 3. fermentação ou conversão catalítica (LYND *et al.*, 2005). A forte interação entre hemiceluloses e lignina forma uma barreira física em torno do material celulósico presente na estrutura da célula vegetal, assim, inicialmente a biomassa precisa sofrer um pré-tratamento para separar a celulose dos demais componentes. O hidrolisado rico em celulose, por sua vez, sofre tratamento específico até a obtenção de glicose (OGEDA; PETRI, 2010). A resistência inicial dos componentes do material celulolítico tem ocasionado um grande esforço na implementação de técnicas capazes de degradar a celulose, tais como, a clivagem ácida, enzimática e o emprego de água

supercrítica e bases (GUERRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2011; WANG; KANG; LEE, 2010; FUKUOKA; DHEPE, 2006; KLINKE *et al.*, 2002). Frente ao desafio de degradar a celulose, o emprego da hidrólise enzimática apresenta-se como uma opção de baixo impacto ambiental. Ao contrário da hidrólise ácida, por exemplo, que gera contaminantes ambientais (CONDE-MEJÍA; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2011; YUE; JIAN-XIN; LI-WEI, 2009).

As celulasas estão em terceiro lugar dentre as enzimas mais produzidas no mundo, com uso intensivo nas indústrias de alimentação humana e, como aditivos de alimentação animal, além de fazer-se presente na indústria de papel. No entanto, podem transformar-se nas principais enzimas em uso na indústria, caso o etanol ou outros produtos derivados de processos fermentativos, a partir de açúcar de biomassa vegetal, tornem-se os principais combustíveis de transporte (WILSON, 2009). O mecanismo da hidrólise enzimática da celulose é uma ação sinérgica de mais de um tipo de enzimas celulolíticas, que em conjunto apresentam especificidade para as ligações glicosídicas $\beta - 1,4$. Primariamente, há a atuação de três grupos distintos da enzima: as endoglucanases (Endo-1,4- β -glucanases, E.C. 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (Exo-1,4- β -glucanases, E.C. 3.2.1.91) e as celobiasas β -glicosídicas (E.C. 3.2.1.21). A primeira enzima atua randomicamente sobre a celulose amorfa, diminuindo o grau de polimerização e gerando como produtos finais, glicose e celobiose. A exoglucanase é ativa sobre celulose cristalina e inicia a hidrólise nas extremidades da cadeia, liberando celobiose a partir dos terminais redutores e não redutores da cadeia. Finalmente, a celobiase atua clivando as ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose (WOOD; MCCRAE, 1979).

Micro-organismos celulolíticos, principalmente fungos e bactérias, são os grandes responsáveis pela degradação desse material presente em plantas e solos. Devido à eficiência na decomposição de materiais lignocelulósicos, os micro-organismos que produzem enzimas do complexo celulolítico desempenham um importante papel no meio ambiente estabelecendo um elo chave no ciclo de carbono. A maioria secreta as celulasas fora da parede celular, pois são incapazes de transportar materiais insolúveis, como a celulose, caracterizando-as como enzimas extracelulares (WILSON, 2008).

Atualmente, as linhagens mais utilizadas para produção de enzimas celulolíticas são dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (YUE; JIAN-XIN; LI-WEI, 2009). Pesquisas envolvendo potenciais fontes de enzimas são recorrentes e, dentre uma das estratégias, está a investigação de novos micro-organismos potenciais produtores de celulasas e xilanases, necessárias para a solubilização completa e efetiva do material lignocelulósico (DAS;

ROYER; LEFF, 2007). Apesar da hidrólise enzimática da biomassa possuir vantagens frente à hidrólise ácida, principalmente por não gerar inibidores, os custos relacionados à aplicação das enzimas ainda representam uma barreira na quebra da biomassa por esse processo (BON; GIRIO; PEREIRA JR., 2008; LYND *et al.*, 2008). Vale ressaltar que a sacarificação enzimática é identificada como um dos passos que mais geram custos ao processo de produção de etanol celulósico, sendo assim, faz-se necessário produzir enzimas a baixos custos, pois essa etapa é primordial na conversão enzimática da biomassa a etanol (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; LYND *et al.*, 2008;).

Estudos sobre novas fontes microbianas, assim como estudos mais acurados das etapas que compõem a produção de celulasas, são essenciais como estratégias para diminuir os custos do complexo enzimático. Portanto, este trabalho tem como objetivo a seleção de fungos filamentosos, produtores de enzimas do complexo celulolítico, bem como a investigação dos parâmetros que envolvem a produção de celulasas através do processo de fermentação submersa. O trabalho está inserido em um projeto mais amplo, que abrange pesquisas em diversas áreas do conhecimento, colaborando para um conhecimento mais aprofundado sobre a utilização de fontes de energia sustentáveis e suas respectivas rotas biotecnológicas, que propõem como principal meta viabilizar a obtenção de biocombustíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica

O sistema energético global é fortemente dependente do uso de combustíveis de origem fóssil (como carvão, petróleo e gás) e representa um crescimento de consumo anual estimado em 2%. A necessidade por fontes alternativas de combustíveis tem desencadeado uma busca intensiva por combustíveis de origem renovável. Para suprir as necessidades atuais de energia global são utilizados cerca de 85 milhões de barris de óleo por dia e 220 bilhões de galões de gasolina e outros derivados do petróleo, sendo apenas 2,5% da energia gerada de origem renovável (DEMAIN, 2009).

Segundo Saxena, Adhikari e Goyal (2009), dois grandes problemas se destacam em relação ao uso dos combustíveis convencionais: a estimativa de extinção das reservas petrolíferas até o ano 2050 devido à exploração maciça dos recursos fósseis no último século e a emissão de gases na atmosfera, como SO₂ e CO₂. O consumo acelerado de petróleo força cada vez mais uma severa mudança climática, diminuindo a qualidade no meio ambiente, gerando enormes quantidades de gases que ocasionam o efeito estufa. Dentre esses gases, o principal é o dióxido de carbono, com aumento estimado em cerca de 1,9 bilhões de toneladas/m² em 2004 para 2,7 bilhões de toneladas/m² em 2030 (DEMAIN, 2009).

Frente ao crescente consumo de energia pelo planeta e ao desaparecimento de reservas de combustíveis fósseis, assim como, os transtornos ambientais causados pelo uso extensivo de combustíveis de origem fóssil, são cada vez mais necessárias pesquisas que visem o desenvolvimento de tecnologias de aproveitamento de fontes renováveis, como por exemplo, a produção de biocombustíveis (CHANG, 2007). Dentre os materiais renováveis, destaca-se a biomassa vegetal e sua bioconversão em açúcares fermentescíveis para a geração de bioenergia (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

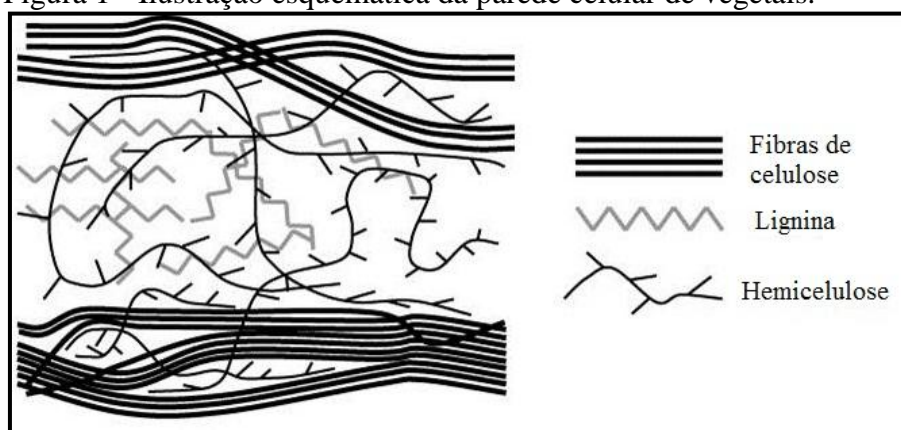
Diferente do uso de fontes de combustível fóssil, a utilização de biomassa para geração de energia fornece vantagens ambientais bastante relevantes. No desenvolvimento de plantas e consequente geração de matéria-prima de biomassa, ocorre remoção de dióxido de carbono da atmosfera, compensando assim a quantidade deste composto no meio ambiente. Entretanto, ainda não foi desenvolvida uma maneira viável para compensar a quantidade de dióxido de carbono presente na atmosfera e suas consequências, como o efeito estufa, fenômeno considerado um problema ambiental sério (MOHAN; PITTMAN JR.; STEELE, 2006).

O interesse por combustíveis alternativos, como a energia gerada através de biomassa vegetal, tem levado alguns países a adotar cada vez mais o uso dos biocombustíveis, tais

como o etanol produzido de açúcares fermentescíveis e o biodiesel. A tendência para os avanços nessa área apontam para o emprego de resíduos agroindustriais como matéria-prima principal na geração de energia. A utilização de biomassa lignocelulósica, oriunda de resíduos da agricultura, reflorestamento e resíduos sólidos de esgoto, pode auxiliar no controle de custos no processo de produção de combustíveis, bem como, auxiliar no controle de dejetos e emissão de gases (ADSUL *et al.*, 2004).

A biomassa lignocelulósica é o principal recurso renovável disponível no meio ambiente, é uma fonte de carbono neutro e considerada a quarta maior fonte de energia do mundo depois do carvão, petróleo e gás natural, oferecendo cerca de 14% do consumo mundial de energia primária (SAXENA; AHIKARY; GOYAL, 2009). Pode-se definir biomassa como qualquer matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser quebrada de forma a liberar energia ou fornecer açúcares no processo final. Esta constitui-se principalmente por três frações, conforme ilustrado na Figura 1: microfibrilas de celulose cobertas por uma matriz formada por hemiceluloses e lignina (TAIZ; ZEIGER, 2004; SÁNCHEZ; CORDONA, 2008). As frações de celulose e hemiceluloses representam os principais componentes biodegradáveis e constituem, respectivamente, em torno de 30-50 e 20-30% do peso seco do material vegetal (OGEDA; PETRI, 2010; TAMANINI; HAULY, 2004; VARGA *et al.*, 2004).

Figura 1 - Ilustração esquemática da parede celular de vegetais.



Fonte: adaptação de Leunga *et al.*, 2006.

Dependendo de fatores como a espécie do vegetal, as condições de crescimento, da parte da planta escolhida e da idade da colheita, a composição da biomassa varia em relação aos seus componentes (OGEDA; PETRI, 2010).

As pectinas, também chamadas de ácido poligalacturônico, constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos, que contém açúcares ácidos, como ácido galacturônico e

açúcares neutros como raminose, galactose e arabinose. Caracterizam-se por serem os polissacarídeos mais solúveis da parede celular, de alto peso molecular, carga negativa e acidez, possuindo uma estrutura primária relativamente simples. É um polímero de resíduos do ácido D-glucorônico unidos entre si por ligações α -1,4 (TAIZ; ZEIGER, 2004).

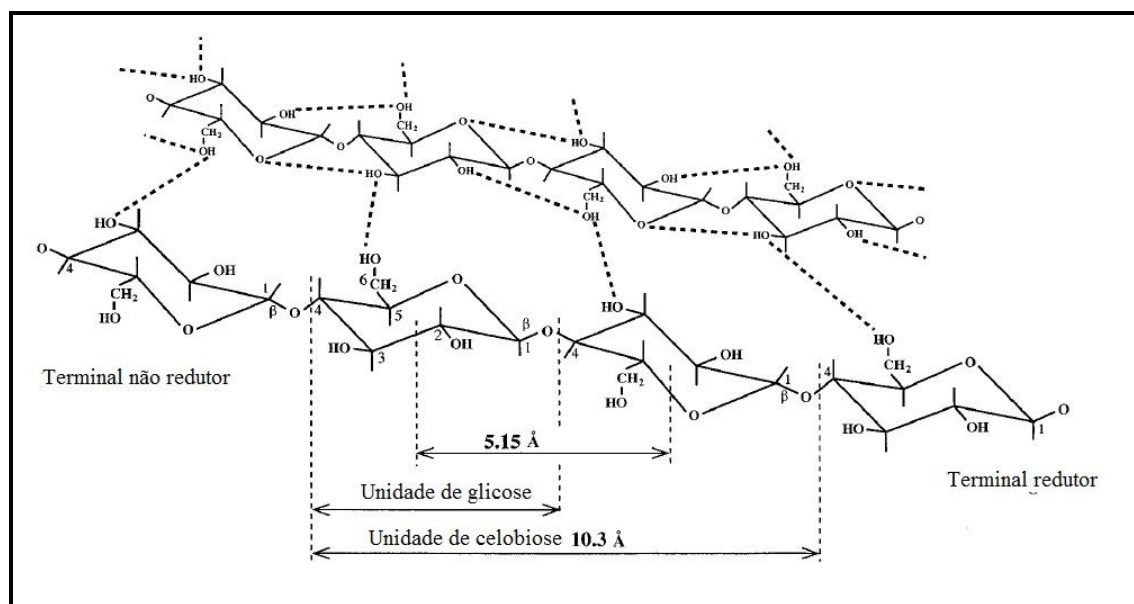
A lignina é um polímero fenólico com um padrão de ligações complexo e irregular, unindo as subunidades aromáticas de álcool. É um polímero altamente ramificado, aromático mononuclear, presente principalmente nas espécies lenhosas. As subunidades aromáticas, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase. Constitui uma rede hidrofóbica, ligando-se firmemente à celulose. Possui função de resistência mecânica de sustentação significativa às paredes celulares e a susceptibilidade ao ataque microbiano (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As hemiceluloses são o segundo mais abundantes polissacarídeos, consistem em polímeros de açúcar flexíveis que compõem cerca de 20 a 40% do peso seco da biomassa e que caracteristicamente atuam como um elo entre a celulose e a lignina. Conformam-se como correntes que reúnem microfibrilas de celulose ou funcionam como um revestimento deslizante para impedir o contato direto entre as microfibrilas. Assim como a celulose, possui ligações do tipo β -1,4 que unem resíduos de D-glicose. No entanto, possui cadeias laterais curtas compostas por pentoses e hexoses (SQUINA *et al.*, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2004). As frações de hemicelulose incluem arabinanas, galactanas, mananas e xilanas. Logo, os constituintes que são caracterizados como monômeros de hemiceluloses são as pentoses D-xilose e L-arabinose; hexoses como a D-galactose, D-glicose e D-manose; ácidos urônicos: 4-O-metilglucurônico e galacturônico, assim como radicais acetila (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006). Dentre as classes das hemiceluloses, as xilanas são as mais abundante, polímeros formados por xiloses ligadas nas posições 1 e 4 que compõe em torno de 30 a 35% do peso seco total das plantas (POLIZELI *et al.*, 2005). A degradação do complexo hemicelulolítico utiliza principalmente a hidrólise do seu constituinte principal: a xilana. A completa hidrólise da xilana requer atuação de diferentes enzimas como a 1,4- β -xilanaase (EC 3.2.1.8). Outras enzimas que participam do processo de despolimerização incluem: α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterase (EC 3.2.1.72), ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) e ácido p-cumárico esterase (EC 3.1.1.-) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; SHALLOM; SHOHAN, 2003).

2.1.1 Celulose

A celulose é um dos polissacarídeos mais abundantes no meio ambiente e é considerada como uma fonte inesgotável e única de material renovável para uma larga gama de aplicações (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006). Estruturalmente, a celulose consiste em um polissacarídeo linear com ligações do tipo β -1,4 que unem cerca de 8000 a 12000 monômeros de α -D-glicopiranosose (glicose) (Figura 2). Ao contrário da estrutura do amido, a celulose é um material cristalino com uma longa estrutura de conformação helicoidal, onde ligações de hidrogênio ajudam a manter a conformação plana e linear na cadeia (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006; LIMA *et al.*, 2005). As microfibrilas formadas, com 10 a 25 nanômetros de diâmetro, se cruzam constituindo as macrofibrilas, o que confere à celulose um componente de característica estrutural. As regiões com menor grau de ordenação são chamadas de regiões amorfas (RAVEN, 2001).

Figura 2 - Ilustração esquemática de duas cadeias de celulose unidas.

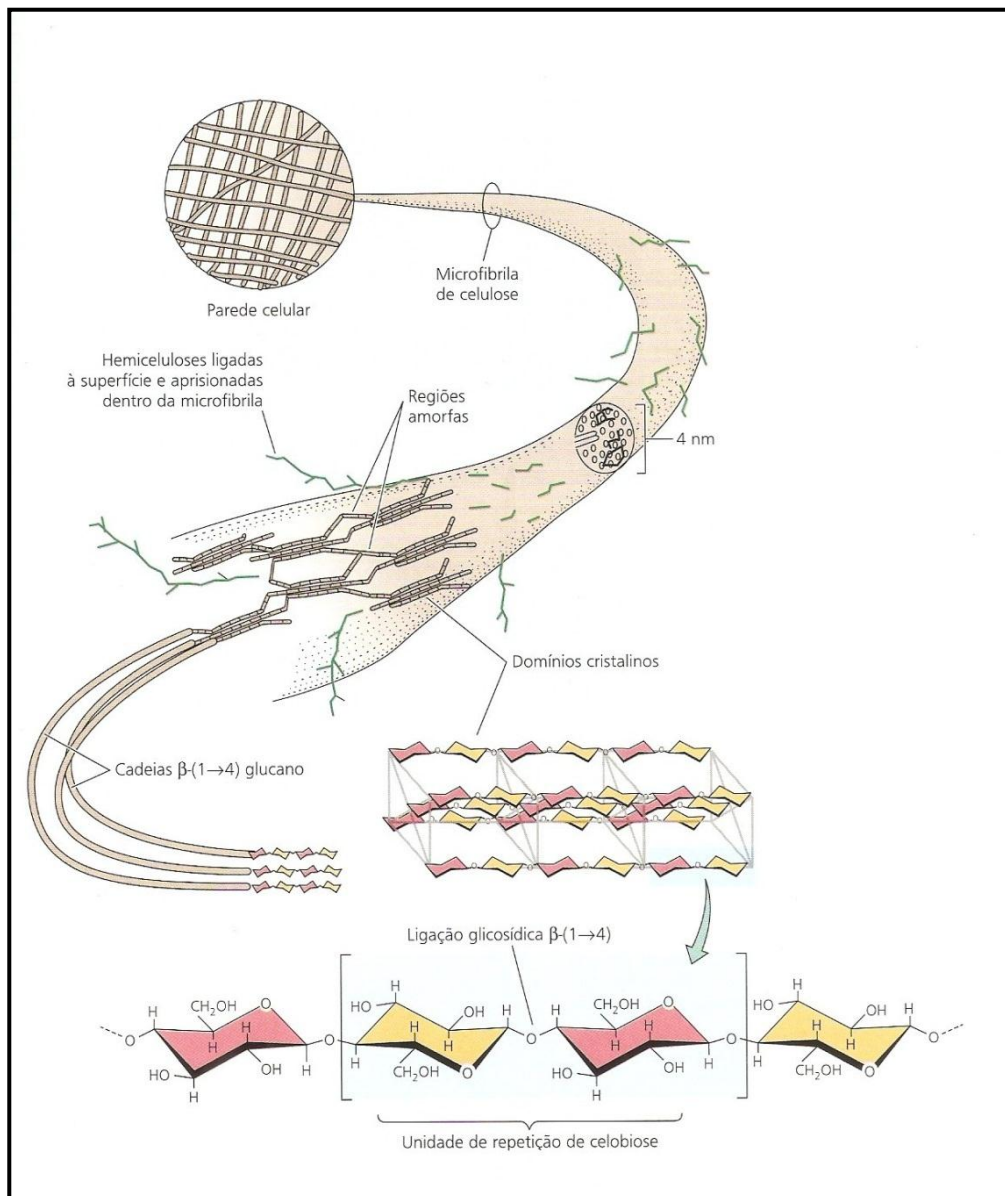


Fonte: adaptação de Hildén e Johansson (2004).

As moléculas de celulose dividem-se em duas partes: uma cristalina e de caráter insolúvel e outra amorfa, que é mais facilmente hidrolisável. A parte superior e inferior das cadeias de celulose são essencialmente de caráter hidrofóbico, devido à presença de interações intra e intermoleculares, como pontes de hidrogênio e forças de Van der Waal's, tornando a celulose resistente à ação de agentes externos como enzimas e agentes químicos. As laterais das cadeias de celulose são hidrofílicas e capazes de formar pontes de

hidrogênio, porque todos os átomos de hidrogênio alifáticos estão em posição axial e os grupos polares hidroxila estão na posição central (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006; PERCIVAL ZHANG; HIMMEL; MIELENZ 2006). A Figura 3 mostra um esquema das fibras de celulose e o envolvimento destas com a cadeia de hemicelulose e lignina.

Figura 3 - Ilustração esquemática de microfibrilas de celulose até os monômeros de glicose que formam a estrutura celulósica na parede celular vegetal.



Fonte: Taiz e Zeiger, 2004.

As microfibrilas de celulose são de comprimento indeterminado e variam em largura e grau de ordem de acordo com a origem do vegetal. A largura das microfibrilas varia de acordo com o número de cadeias paralelas que constituem a secção transversal (TAIZ; ZEIGER,

2004). O grau de polimerização da celulose é de aproximadamente 10000 a 15000 monômeros de glicopiranoose, respectivamente, na madeira e fibras de algodão e é o que define o tamanho da cadeia presente na molécula de celulose, representado através das unidades repetidas de anidroglicose. O valor do grau de polimerização pode variar de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu tempo de envelhecimento (PITARELO, 2007).

2.2 Degradação da biomassa lignocelulósica

A biomassa pode ser convertida em formas úteis de energia através de variados tipos de processo, dentre os quais se destaca a hidrólise do material celulósico para obtenção de açúcares e posterior produção de bioprodutos, como o etanol. Os polissacarídeos presentes no material lignocelulósico e, que incluem celulose e hemiceluloses, são de grande interesse como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração. Se comparados ao uso de cana-de-açúcar e milho, a tecnologia é mais complexa, uma vez que envolve a etapa de pré-tratamento e a produção de etanol pode gerar mais custos. No entanto, deve-se considerar a questão do reaproveitamento dos resíduos oriundos de agroindústrias, que possuem potencial para produção de biocombustível em larga escala e uso deste como fonte de energia renovável (MUSSATO *et al.*, 2010).

A escolha do processo a ser utilizado depende das características da biomassa vegetal, da quantidade de matéria-prima, a forma desejada de energia ou mesmo das condições econômicas. A conversão de biomassa para geração de energia começa com uma etapa de pré-tratamento, na qual são realizados tratamentos físicos e químicos (uso de ácidos diluídos, bases, extração por solventes e outros) para diminuir a cristalinidade da celulose e tornar as frações poliméricas mais acessíveis para conversão por processos enzimáticos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; STEPHANOPOULOS, 2007).

Segundo Ogeda e Petri (2010), os processos que envolvem a hidrólise de materiais lignocelulósicos não são triviais, devido principalmente às interações entre a fração celulósica com as hemiceluloses e lignina nas paredes celulares. A dificuldade aumenta devido à adsorção das celulasas sobre as ligninas, que restringem a hidrólise, pois estão envoltas sobre a superfície de celulose. A presença da barreira física, ocasionada pela matriz de lignina e pelo material hemicelulósico, torna-se necessária a execução de um processamento inicial na biomassa, com a finalidade de hidrolisar a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e

remover a lignina, expondo a celulose e hemicelulose ao ataque das enzimas (OGEDA; PETRI, 2010).

O pré-tratamento da biomassa deve, dentre alguns critérios: auxiliar na melhor obtenção de açúcares fermentescíveis ou aumentar a habilidade de se obter esses açúcares na hidrólise enzimática; evitar a perda de carboidratos; evitar a síntese de produtos de inibição dos processos de hidrólise e fermentação (SUN; CHENG, 2002). O tipo de pré-tratamento define o complexo enzimático mais adequado a ser utilizado, assim como a composição dos produtos gerados na hidrólise. Alguns tipos de pré-tratamento, como a hidrólise ácida, que resultam na solubilização dos açúcares da hemicelulose, geralmente começam separando a biomassa em uma fração líquida contendo pentoses e uma parte sólida composta de celulose e lignina. Nessa primeira etapa, a hidrólise da celulose pode ser realizada tanto com ácido quanto por enzima. A primeira é a tecnologia mais avançada, enquanto o uso de enzimas representa uma tecnologia com maiores chances de redução de custos na produção de etanol a partir de biomassa (MUSSATO; ROBERTO, 2004). O uso de celulases na hidrólise do material celulósico ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH quando comparado aos processos químicos, além disso, possui elevada especificidade ao substrato (BADGER, 2002).

As subsequentes conversões biológicas envolvem trivialmente as etapas de produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas; conversão, através de hidrólise, do material de celulose e hemiceluloses até açúcares fermentescíveis e por último a fermentação das pentoses e hexoses em produtos de interesse (LYND *et al.*, 2005). A conversão inclui dois processos básicos: hidrólise da celulose contida no material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis e fermentação dos açúcares obtidos no produto final, como etanol. A hidrólise é geralmente catalisada por enzimas celulolíticas e a fermentação realizada por leveduras ou bactérias. No entanto, alguns fatores podem afetar a hidrólise, tais como a acessibilidade à superfície do material biológico, a cristalinidade das fibras de celulose e ainda o conteúdo de lignina e hemiceluloses aderido. A presença desses dois últimos componentes pode dificultar o acesso às fibras de celulose, reduzindo a eficiência do processo. A remoção de frações de lignina, hemicelulose e outras proteínas estruturais, a redução da rigidez da celulose e o aumento da porosidade são fatores que podem aumentar o rendimento na hidrólise (LYND *et al.*, 2005).

A hidrólise enzimática reproduz um processo natural, que converte a celulose em açúcares e, como anteriormente ressaltado, possui a vantagem de produzir elevadas quantidades de açúcares de forma mais amena. Nas etapas subsequentes, os açúcares podem

ser utilizados para a produção de uma vasta gama de bioprodutos, dentre os quais o etanol, um biocombustível de elevado interesse (AGBOGBO; COWARD-JELLY, 2008).

2.3 Enzimas

Enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações nos sistemas biológicos, aumentando a velocidade de uma reação química por meio da diminuição da energia livre de ativação, sem interferir nos aspectos termodinâmicos da reação. Estão associadas a biomoléculas, devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, maior que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX, 2002).

A história da Bioquímica está intrinsicamente ligada com pesquisas associadas a enzimas. A origem da palavra enzima remota ao termo grego *énzymo* (*én* = no; *zymos* = levedura), sugerida no primeiro trabalho do fisiologista alemão Wilhelrn Friedrich Kühne (1837-1900), como nome genérico para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos. Anos mais tarde foi sugerido que a denominação se estendesse para todos os “fermentos não organizados” (NELSON; COX, 2002).

Cada vez mais a biotecnologia vem oferecendo mecanismos que atendam as necessidades humanas e, a tecnologia enzimática vem sendo utilizada como ferramenta chave para criação de novos processos que atendam essa demanda. Segundo Musatto *et al.* (2007), é crescente o uso de enzimas nos mais variados processos, com um mercado mundial estimado em torno de 2,34 bilhões de dólares anuais. O uso da catálise enzimática é de grande interesse, pela facilidade de obtenção e pelas vantagens em comparação com catalisadores químicos, além de possuir maior especificidade e maior velocidade de reação (MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

2.3.1 Celulases

As enzimas do complexo celulolítico estão classificadas em terceiro lugar como as enzimas que mais movimentam o mercado de enzimas devido às variadas aplicações no processamento de algodão; reciclagem de papel, na extração de suco, como enzimas detergentes e aditivos para a alimentação animal. Todavia, se o etanol produzido a partir de biomassa se transformar no combustível principal nos meios de transporte, a indústria de enzimas celulolíticas pode tornar-se líder no uso de enzimas em processos industriais (SINGHANIA *et al.*, 2010).

O início da aplicação de celulases foi em torno dos anos 80, na indústria de alimentos, como aditivo para rações de ruminantes, pois permitia o aumento da digestibilidade desses animais. Dentre outras aplicações de celulases estão seu uso na indústria de alimentos, juntamente com hemicelulases e pectinases, em processos de maceração enzimática; fermentação de cerveja e produção de vinho; extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais; produção de néctares de frutas e purês; alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais e extração de óleo de oliva. Também são plenamente usadas como aditivos na indústria de ração animal, indústria têxtil e indústrias de polpa e papel, assim como na agricultura e para propósitos de pesquisa (BHAT, 2000).

Nos dias atuais, além das inúmeras aplicações de celulases em processos industriais, a bioconversão da biomassa para produção de etanol através do uso dessas enzimas passou a ser considerada uma alternativa promissora e relevante, que tem desencadeado uma intensificação nos estudos sobre a temática (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Celulases são enzimas que hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 glicosídicas da celulose, sendo classificadas de acordo com a *Enzyme Commission* (EC) com o código 3.2.1.x. Estão presentes em 13 das 82 famílias de hidrolases identificadas por análise de sequencia. Esse grupo de enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas na matriz celulósica gerando como produtos primários glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. É o grupo de enzimas mais estudado, composto de endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases (BG). As exoglucanases, por sua vez que, são compostas pelas celobio-hidrolases do tipo I e II (CBHs I e II) e pelas glucano-hidrolases (GH). Estas três classes de enzimas, em conjunto, apresentam especificidade por ligações β -1,4 e sinergismo na atuação (SINGHANIA *et al.*, 2010), sendo tal mecanismo de hidrólise o mais aceito.

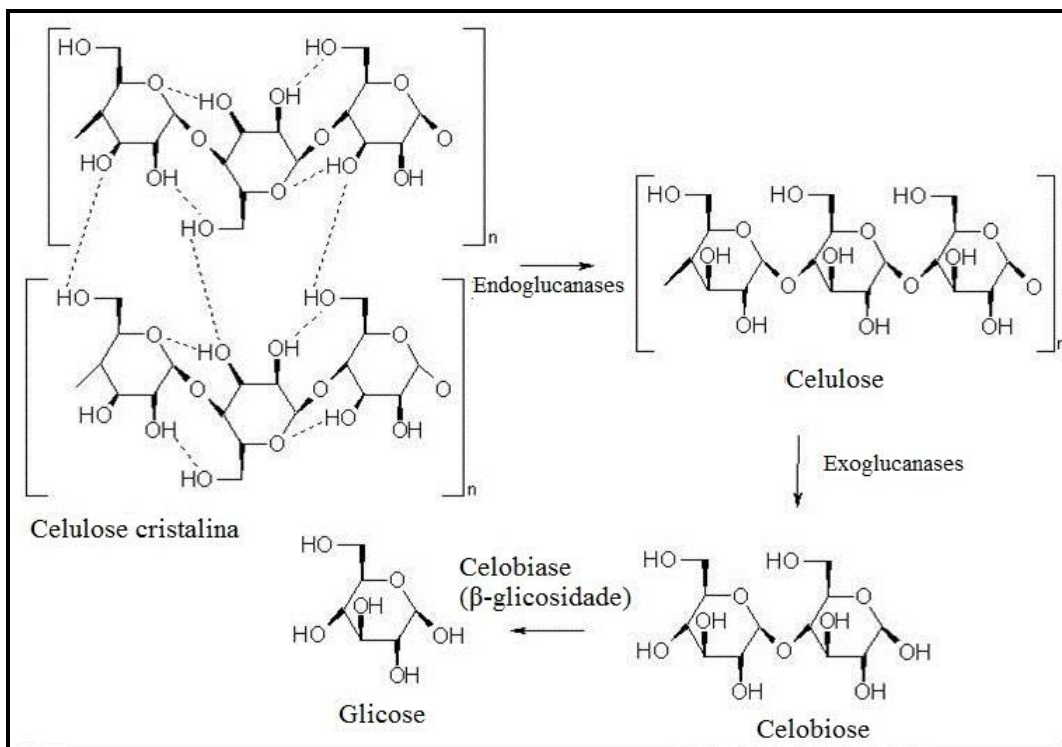
Segundo Lynd *et al.* (2002), quando atuam conjuntamente, as enzimas celulolíticas apresentam um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais. De acordo com os autores, as enzimas celulolíticas não atuam individualmente no substrato celulósico e conseqüentemente não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação de sinergismo. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia (LYND *et al.*, 2002):

- Sinergia EnG-ExG: atuação das endoglucanases nas regiões amorfas e liberação dos terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as celobio-hidrolases (CBH) do tipo I e do tipo II, respectivamente.
- 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 celobiose e oligossacarídeos, substrato da β -glucosidase.

O esquema da Figura 4 apresenta a classificação das celulases de acordo com o local onde agem na matriz celulósica. Apresentam-se também, sucintamente, as características de cada grupo de celulases.

Figura 4 - Ilustração esquemática do ataque de enzimas celulases na matriz de celulose.



Fonte: adaptação de Kamakar e Ray (2011).

2.3.1.1 Endoglucanases

As endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glicano-hidrolase, EC 3.3.1.4) possuem ação randômica sobre as regiões internas da celulose, principalmente nas regiões amorfas, causando mudança rápida no grau de polimerização e produzindo celo-oligossacarídeos (glicose e celobiose) a serem clivados por celobio-hidrolases. O consumo de uma molécula de água gera novos terminais, um redutor e um não redutor (LYND *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Exoglucanases

As exoglucanases são formadas por dois grupos ativos sobre celulose cristalina: glucano-hidrolase (GH) (EC 3.2.1.74) e pela celobio-hidrolase (CBH I e II) (EC 3.2.1.91). Enquanto as GH liberam glicose diretamente do polímero, as celobio-hidrolases CBH I e CBH II hidrolisam os terminais redutores e não redutores, respectivamente. Na clivagem, liberam celobiose, um dissacarídeo resultante da hidrólise parcial da celulose cristalina (MARTINEZ *et al.*, 2008; LYND *et al.*, 2002).

2.3.1.3 Celobiasas

As 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 (MARTINEZ *et al.*, 2008).

2.4 Micro-organismos produtores de celulases

Devido à eficiência na decomposição de materiais lignocelulósicos, os micro-organismos que produzem enzimas do complexo celulolítico desempenham um importante papel no meio ambiente, estabelecendo um elo chave no ciclo de carbono. A maioria secreta as celulases fora da parede celular, uma vez que esses organismos são incapazes de transportar materiais insolúveis, como a celulose, caracterizando-as como enzimas extracelulares (WILSON, 2008). Atualmente, as linhagens mais utilizadas para produção de enzimas celulolíticas são dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (YUE; JIAN-XIN; LI-WEI, 2009).

Os micro-organismos celulolíticos degradam principalmente carboidratos e geralmente são incapazes de usar as proteínas e lipídios como fonte de energia (LYND *et al.*, 2002). A capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares é característica de micro-organismos específicos e somente algumas linhagens produzem a enzima em níveis mais elevados (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Sistemas celulolíticos completos são derivados de diferentes gêneros e espécies de fungos e bactérias. Há uma grande variedade de micro-organismos envolvidos na produção de celulases, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas e fungos filamentosos

(MONTENECOURT; EVELEIGH, 1997 *apud* BANERJE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010).

Dentre as bactérias celulolíticas incluem, espécies aeróbias e aeróbias facultativas, como os actinomicetos, *Cellulomonas*, espécies do gênero *Bacillus* (*subtilis*, *polymyxa*, *cereus*) e anaeróbias estritas, como *Clostridium* e *Acetivibrio* (MAKI; LEUNG; QIN, 2009; LYND *et al.*, 2002).

A produção de fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo uma grande variedade de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Os organismos que predominantemente degradam o material lignocelulósico são fungos, principalmente basidiomicetos (BENNETT *et al.*, 1998). Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são conhecidos como bons produtores de muitas enzimas de interesse biotecnológico, incluindo celulases e xilanases a partir de substratos lignocelulósicos (SÁNCHEZ, 2009). Cepas de *Aspergillus* tem sido relatadas como boas produtoras de β -glucosidases melhor do que *Trichoderma* (FLACHNER; RECZEY, 2004). No entanto, linhagens de *Trichoderma reesei* são conhecidas como boas produtoras de exoglucanases, porém limitadas quanto à produção de celobiase, sendo deficientes na produção dessas enzimas (CHANDRA *et al.*, 2009).

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 linhagens 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 (CBH I 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).

2.5 Fermentação submersa para produção de celulases

Os processos microbianos de produção enzimática ocorrem sob fermentação submersa (FSm) ou então com o meio de cultura no estado semi-sólido ou sólido (FES), sendo o primeiro o mais utilizado em escala industrial (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Os processos submersos são aqueles em que o micro-organismo, ou mesmo outras células, desenvolvem-se em meio de cultura com excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente, com volumes que podem chegar a 1000 m³. A fermentação submersa é o processo mais utilizado na produção comercial de enzimas, pois junto ao desenvolvimento de novos equipamentos houve também o maior número de pesquisas e instrumentações para controle do processo, tornando-o mais acessível que a fermentação semi-sólida, assim como melhor facilidade de monitoramento (KIRK; BORCHET; FUGLSANG, 2002). Dentre outras vantagens da fermentação submersa, frente à fermentação no estado sólido, são: facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos, como controle de temperatura devido ao alto teor de água; melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e ainda redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas com baixa termoestabilidade (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

A maioria das celulases comerciais é produzida por *Trichoderma* e *Aspergillus* em processos de fermentação submersa. O cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente onde o crescimento celular e a formação de produto são influenciados pelos parâmetros operacionais que envolvem a fermentação, como: composição do meio de cultura, temperatura, pH do meio, forças de cisalhamento, reologia e morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato celulósico, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores e, outros parâmetros como agitação do meio reacional, configuração dos impelidores, quantidade de oxigênio dissolvido, etc. Todos esses parâmetros podem variar durante o processo fermentativo e a relação desses parâmetros com o complexo formado deve ser analisado durante a fermentação. A produção em larga escala de enzimas celulolíticas requer o adequado conhecimento acerca desses parâmetros (SINGHANIA *et al.*, 2010).

O meio de cultura a ser utilizado é específico para cada micro-organismo analisado. A composição do meio de cultura mais comumente utilizado para produção de celulases em FES são aqueles propostos por Mandels e Reese (1957) e Mandels e Weber (1969). No entanto, várias pesquisas tem se concentrado na resposta dos fungos para produção de celulases frente a diferentes alterações na composição do meio de cultura, com o intuito de reduzir os custos

de produção. Ahamed e Vermette (2008), por exemplo, em estudos para produção de celulasas utilizando *T. reesei* RUT-C30, testaram diferentes composições de meio de cultura, dentre os quais: concentração de açúcares solúveis, alteração do meio Mandels e Weber, assim como alteração na concentração de celulose e verificaram melhor síntese de celulasas em meio de cultura com elevada concentração de celulose e lactose.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a produção de enzimas do complexo celulolítico por fungos filamentosos através do processo de fermentação submersa.

Objetivos específicos:

- Seleção de fungos com maior potencial celulolítico;
- Avaliar a produção de celulasas por fungos filamentosos obtidos de variadas coleções de culturas e de espécies isolados de bioma manguezal;
- Avaliar a influência das condições nutricionais e ambientais de cultivo para a produção de celulasas;
- Avaliar a influência das condições de produção de pré-inóculo em fermentador de bancada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta a metodologia experimental adotada na presente investigação. Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bioprocessos e de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza –CE).

4.1. Micro-organismos e Técnicas de Manutenção

Foram utilizadas 317 linhagens fúngicas provenientes de diferentes coleções de cultura (Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA / Manuas-AM e Coleção de Culturas do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido – LCB- CPATSA/ Petrolina-PE), de coleções de trabalho (Coleção de Trabalho do Laboratório de Bioprocessos e Coleção de Trabalho do Laboratório de Fitopatologia, ambas pertencentes à Embrapa Agroindústria Tropical- CNPAT/Fortaleza-CE) e isoladas de bioma manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga (Fortaleza-CE). A manutenção das linhagens foi realizada em função do gênero, sendo utilizados água estéril (Método Castellani) e/ou óleo mineral, sob temperatura de armazenamento em torno de 4 °C (MENEZES; ASSIS, 2004).

4.2. Procedimentos e Meio de Ativação dos Micro-organismos

Com o auxílio de uma alça de platina, as linhagens estocadas foram transferidas assepticamente para o meio BDA inclinado (Ágar Dextrose Batata) e, incubadas em estufa microbiológica (BOD) a 30 °C durante 7 dias para assegurar a esporulação. O meio BDA foi preparado segundo recomendação do fabricante, ou seja, na proporção de 39 g para 1000 mL de água destilada, posteriormente a mistura sofreu aquecimento para total solubilização. Após o preparo, o meio foi distribuído em alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio rosqueáveis. Em seguida, o meio foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Terminada a autoclavagem, os tubos foram dispostos em posição inclinada para solidificação do ágar.

4.3. Etapa Inicial de Seleção das Linhagens

A etapa inicial do trabalho consistiu em selecionar micro-organismos que apresentassem o melhor potencial celulolítico. Para tanto, empregou-se a determinação do índice enzimático segundo Teather e Wood (1982). A capacidade de degradação de celulose foi analisada em meio ágar celulose, cuja única fonte de carbono foi a celulose, com a

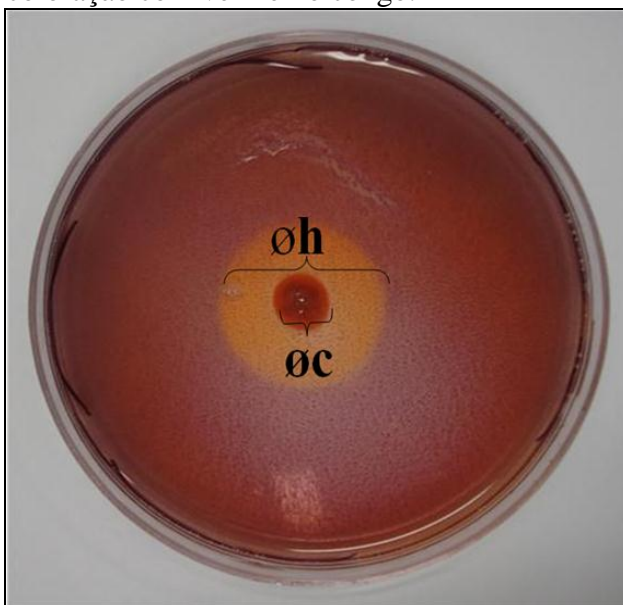
seguinte composição em g/L: 0,5 de MgSO₄; 0,5 de KCl; 3,0 de NaNO₃; 0,01 de FeSO₄.7H₂O; 1,0 de K₂HPO₄; 15,0 de ágar-ágar e 5,0 de celulose microcristalina, com pH inicial ajustado para 6,0. Os micro-organismos foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura acima citado. Os testes foram realizados em duplicata e, as placas incubadas por 96 horas em BOD a 30 °C. Os diâmetros de crescimento das colônias foram medidos diariamente, no mesmo horário, utilizando um paquímetro. As medições foram registradas em unidades de mm de crescimento. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da BOD e submetidas ao teste de degradação da celulose. Em cada placa foram vertidos 10 mL de corante vermelho congo (composição: 1 g de corante vermelho congo para 1000 mL de água destilada), que permaneceram em repouso durante 15 minutos. Finalizado o prazo de repouso, as placas contendo as culturas e o corante foram lavadas com solução de NaCl 2M e, deixadas novamente em repouso por um período de 15 minutos. A formação de zonas claras ao redor das culturas, denominada de halo de hidrólise, é o fator indicador de atividade celulolítica. O índice enzimático foi calculado pela razão entre valores dos diâmetros do halo de hidrólise e os diâmetros de crescimento das colônias, conforme equação 1 abaixo:

$$\text{Índice enzimático (i. e.)} = \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise (øh)}}{\text{Diâmetro de crescimento da colônia (øc)}} \quad (1)$$

Vale ressaltar, que além da determinação do índice enzimático, como critério inicial para a seleção das linhagens com potencial celulolítico, julgou-se necessário incluir nos testes subsequentes as linhagens que atingiram um diâmetro de crescimento de colônia de 150 mm, em placas de Petri, em menor tempo de incubação (48 horas). Tal critério foi considerado relevante, uma vez que três linhagens cresceram rapidamente no meio ágar celulose, não sendo possível a medição do halo de hidrólise e a determinação do índice enzimático. Destaca-se que o presente trabalho de investigação procurou, através dos critérios de escolha, incluir pelo menos um representante de cada coleção.

A Figura 5 apresenta uma placa submetida ao teste de índice enzimático, demonstrando a zona de crescimento da colônia e a formação do halo de hidrólise.

Figura 5 - Colônia de fungo em placa de Petri com halo de hidrólise evidenciado após coloração com vermelho congo.



$\varnothing c$ = diâmetro de crescimento da colônia; $\varnothing h$ = diâmetro do halo de hidrólise. Fonte: arquivo pessoal

4.4. Testes de Fermentação Submersa

4.4.1. Testes em erlenmyers não aletados

Esta etapa do trabalho foi realizada com as linhagens que apresentaram melhor desempenho nos testes de índice enzimático, bem como, as linhagens com os melhores índices de crescimento em placa (superior a 150 mm) como descrito anteriormente. Assim, foram submetidas aos testes de fermentação submersa as seguintes linhagens: *Trichoderma* sp. denominação INPA 666 (INPA), *Trichoderma* sp. denominação INPA 1014 (INPA), *Trichoderma* sp. denominação INPA 1218 (INPA), *Trichoderma* sp. denominação LCB 79 (LCB), *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 40 (CNPAT), *Fusarium* sp. SAP 09 (isolada de manguezal- Reserva Ecológica de Sapiranga).

Os testes de fermentação submersa foram realizados em meio para produção de celulases adaptado de Mandels e Weber (1969), conforme a composição descrita na Tabela 1. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5.

Tabela 1 - Composição do meio de fermentação segundo adaptação de Mandels e Weber (1969).

Componentes	Concentração (g/L)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0037
KH ₂ PO ₄	2,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014
Sacarose	10,00
Celulose Microcristalina (SIGMA)	10,00
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

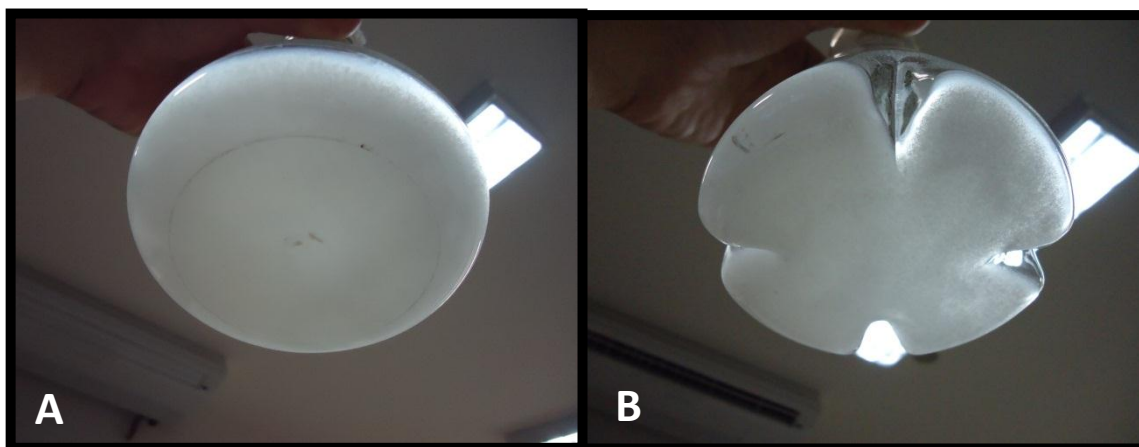
Os testes foram conduzidos em erlenmeyers não aletados com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL de meio reacional. Os ensaios ocorreram em *shaker* orbital, sob agitação de 150 rpm, a 37 °C. Em cada frasco inoculou-se 1 mL de suspensão de esporos, correspondente à uma concentração inicial de 10⁵ esporos/mL no meio de fermentação. Para os testes, os esporos foram produzidos em meio BDA. Inicialmente as linhagens foram ativadas em meio BDA inclinado e incubadas a 30 °C durante 7 dias em BOD. Após o período de incubação, os tubos contendo a cultura crescida, foram lavados com 10 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3%, v/v) para a obtenção da suspensão de esporos. A determinação da concentração de esporos na solução foi realizada através de contagem direta em câmara de Neubauer utilizando microscópio ótico com aumento de 400 x (BIER; SPLITTSTOESSER; TORTORELLO, 2001). A finalidade dessa etapa foi selecionar os fungos mais promissores quanto à síntese de celulases. 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).

4.4.2. Comparação entre erlenmeyers aletados e não-aletados.

Com a finalidade de predizer o perfil de produção enzimática sob condições de alterações morfológicas devido à aplicação de uma força de cisalhamento nas células fúngicas, as linhagens que apresentaram melhor desempenho nos ensaios em frascos não aletados foram submetidas ao processo de fermentação submersa em erlenmeyers aletados. A Figura 6 apresenta o tipo de frasco empregado nesses testes, os frascos possuíam aletas, diferentemente dos frascos erlenmeyers não aletados (normais). Para a realização dos

experimentos, empregaram-se frascos aletados de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio fermentativo (MANDELS; WEBER, 1969) (Tabela 1). A ativação e a preparação do inóculo seguiram os mesmos procedimentos dos ensaios com frascos não aletados. As condições do processo fermentativo e os parâmetros analisados foram os mesmos adotados no item 4.4.1.

Figura 6 - Vista da base de um frasco erlenmeyer.



A. não aletado. B. aletado (presença de aletas). Fonte: imagem obtida a partir dos experimentos.

4.4.3. Estudo de diferentes açúcares solúveis nos meios fermentativos para produção de celulases

Esta etapa da investigação consistiu em testar diferentes fontes de açúcares empregadas nos meios de produção enzimática. Assim, a linhagem que obteve preliminarmente os melhores índices de produção enzimática nos ensaios em frascos não aletados e aletados (itens anteriores) foi selecionada para esses ensaios. Os testes contemplaram a análise de quatro diferentes tipos de açúcares solúveis no meio de fermentação, na concentração de 10 g/L: glicose, lactose, sacarose e xilose. Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers não aletados de 500 mL de capacidade, com 100 mL de meio reacional. O meio padrão dos ensaios foi o mesmo descrito na Tabela 1, diferindo apenas na composição de açúcares.

Os açúcares foram escolhidos, em função da consulta de estudos apresentados na literatura especializada, nos quais foram realizados experimentos em condições similares ao presente trabalho (DELABONA *et al.*, 2012; MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI,

2006). A Tabela 2 apresenta em detalhes a descrição dos testes com diferentes fontes de açúcares solúveis.

Tabela 2 - Composição dos testes para a produção de celulases sob diferentes fontes de açúcares solúveis

Componentes	Concentração (g/L)	T1	T2	T3	T4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40	X	X	X	X
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0037	X	X	X	X
KH ₂ PO ₄	2,00	X	X	X	X
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40	X	X	X	X
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005	X	X	X	X
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30	X	X	X	X
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0016	X	X	X	X
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014	X	X	X	X
Glicose	10,00	X			
Lactose	10,00		X		
Sacarose	10,00			X	
Xilose	10,00				X
Celulose Microcristalina (SIGMA)	10,00	X	X	X	X
Água destilada (q.s.p)	1000 mL	X	X	X	X

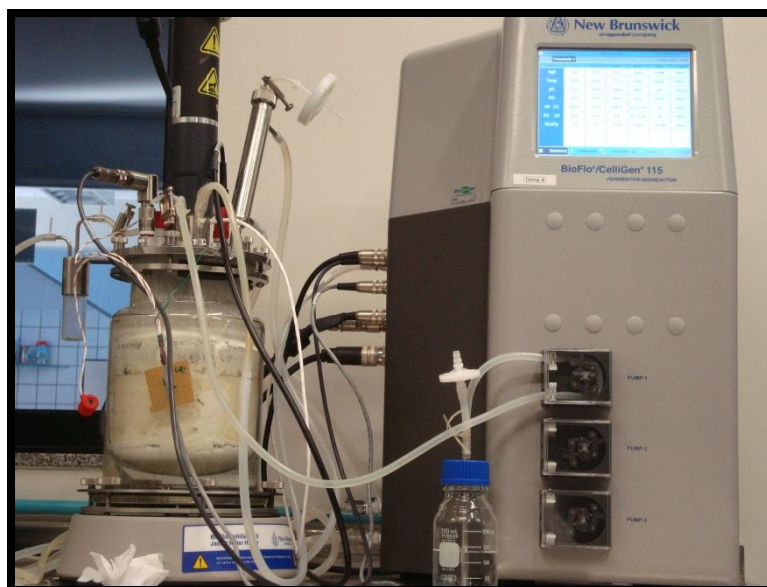
T1 – teste com glicose, T2 – teste com lactose, T3 – teste com sacarose, T4 – teste com xilose.

Os experimentos foram executados sob agitação de 150 rpm a incubação de 30 °C durante um período de 72 horas. Os procedimentos de ativação das linhagens e a produção do inóculo seguiram os mesmos procedimentos descritos anteriormente. O volume de inóculo correspondeu à concentração inicial de 10⁵ esporos/mL nos meios de fermentação. Ao final de 72 horas avaliaram-se a atividade enzimática sobre papel de filtro (FPase) e a atividade de endo -β-1,4 glucanase sobre o substrato carboximetilcelulose (CMC).

4.5. Testes em Biorreator

A linhagem que apresentou a melhor produção de celulases totais (FPase) nas etapas anteriores foi submetida aos testes em biorreator. O processo fermentativo foi conduzido em biorreatores New Brunswick, modelo Bioflo[®]/Celligen[®] 115 como apresenta a Figura 7.

Figura 7 - Bioreator marca New Brunswick, modelo Bioflo[®]/Celligen[®]115 em operação.



Fonte: imagem obtida a partir dos experimentos.

Os testes em biorreatores ocorreram em regime de batelada simples, com um volume operacional de 2 L. A composição do meio de cultura foi o mesmo utilizado no teste em frascos Erlenmeyer (item 4.4). Para homogeneização das culturas, utilizaram-se impelidores de fluxo radial, mais usuais em processos fermentativos, do tipo Rushton. Os biorreatores possuíam um sistema de monitoramento automático, que incluíam controle de pH, agitação, temperatura, aeração e ação antiespumante. A temperatura do processo foi mantida em 30 °C e agitação a 250 rpm. (AHAMED; VERMETTE, 2008). O pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,2$ e, posteriormente, foi controlado pela adição automática de NaOH 0,5M. O período total de fermentação foi de 7 dias.

Como os testes em biorreator tiveram a finalidade de promover a ampliação da escala do processo de produção de celulases, considerou-se necessário, no momento, investigar qual a melhor estratégia de produção de pré-inóculo. Assim, para os testes em biorreator, três formas de obtenção de esporos foram testadas. Os esporos fúngicos foram produzidos em meio BDA, em meio semi-sólido composto de farelo de trigo e em meio de pré-cultivo (MANDELS; WEBER, 1969). A seguir, é a apresentada da descrição dos procedimentos de obtenção de esporos para cada estratégia citada:

4.5.1. Obtenção de esporos em meio BDA

Para a produção de esporos em meio BDA, os fungos inicialmente foram ativados no próprio meio BDA inclinado e incubados a 30 °C durante 7 dias em uma BOD. Após o período de incubação, os tubos contendo a cultura crescida, foram lavados com 10 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3%, v/v) para a obtenção da suspensão de esporos. A determinação da concentração de esporos na solução foi realizada através de contagem direta em câmara de Neubauer utilizando microscópio ótico com aumento de 400 x. A suspensão de esporos foi diretamente injetada no biorreator.

4.5.2. Obtenção de esporos em meio farelo de trigo

Para a produção de esporos em meio farelo de trigo, a ativação seguiu os mesmos passos do item 4.2. Verificado o crescimento da cultura, uma solução estéril de Tween 80 (0,3%, v/v) foi usada para o desprendimento dos esporos que, posteriormente foram inoculados no meio de produção (meio farelo de trigo). Inoculou-se uma alíquota de 1 mL dessa suspensão de esporos em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, contendo 4,6 g de farelo de trigo acrescidos de 6 mL de solução peptonada (5,6% m/v). Antes da inoculação, os meios foram autoclavados a 121°C por 15 min. Os meios semeados foram então incubados em estufa BOD durante 7 dias a 30 °C. Os esporos formados no meio farelo de trigo foram extraídos pela homogeneização com 50 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3% v/v). Após a adição da solução de Tween 80, os frascos foram vigorosamente agitados para melhor desprendimento dos esporos e, em seguida, os esporos recuperados através de filtração da suspensão utilizando gazes e frascos coletores estéreis. A concentração de esporos na suspensão foi determinada pela contagem direta em câmara de Neubauer usando microscópio ótico com aumento de 400 x. A solução contendo os esporos extraídos do meio de farelo de trigo foi adicionada diretamente no biorreator.

4.5.3. Obtenção de esporos em meio de pré-cultivo (MANDELS; WEBER, 1969)

Ainda como estratégia de produção de inóculo, testou-se a esporulação em meio de fermentação submersa pré-determinado (MANDELS; WEBER, 1969). Os esporos foram produzidos em erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio de cultura. Como descrito no

item 4.2, as linhagens foram ativadas em meio BDA e, em seguida, inoculadas no meio de produção de esporos. O meio inoculado (pré-cultivo) foi incubado sob agitação de 150 rpm a 30 °C durante 72 horas. Posteriormente, o pré-cultivo foi utilizado diretamente para inocular o meio do biorreator. Uma alíquota de 100 mL do pré-cultivo correspondeu a 20% (v/v) do total do meio de fermentação.

4.6. Determinações Analíticas

4.6.1. 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 Miller (1959). 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 consistia 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.

Nos experimentos realizados com a sacarose como fonte de açúcar, previamente foi realizada uma hidrólise das amostras. As amostras do extrato bruto (1,0 mL) foram hidrolisadas inicialmente com 1,0 mL de ácido clorídrico (1N) e colocados sob fervura em banho-maria, durante 5 minutos. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com 3 mL de solução NaOH 2N, homogeneizada e, completada com água destilada em balão volumétrico até o volume final correspondente. Logo após, o balão foi submetido à agitação e retirada alíquota de 1,0 mL, a qual foi transferida para tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução de DNS e submetida ao mesmo procedimento experimental anteriormente descrito.

4.6.2. 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 nº 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 (MILLER, 1959), 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 2, 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).

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times f \times \text{dil} \times 3}{180 \times 60} \quad (2)$$

4.6.3. 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% p/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, através do método do DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose como padrão. 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 3, 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).

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

4.6.4. Determinação da biomassa e pH

A biomassa seca dos fungos foi determinada através da medida do peso seco do sólido. A determinação do peso seco foi realizada após centrifugação de 20 mL da cultura líquida a 9600 g por 20 minutos (Biofuge Stratos – Heraeus) e secagem em estufa Quimis a 90 °C por 48 horas. O pH do meio foi medido logo após o término do processo fermentativo em pHmetro (Hanna, modelo HI2221).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Etapa Inicial de Seleção das Linhagens com Potencial Celulolítico

A etapa inicial do trabalho consistiu em selecionar os micro-organismos que apresentassem considerável potencial celulolítico. Foram selecionadas as linhagens com maior índice enzimático (relacionado pela capacidade de degradação de celulose em meio ágar celulose) após 96 horas de incubação. Também foram selecionadas as linhagens com o mais rápido desenvolvimento do halo de crescimento da colônia em meio de cultura específico. Segundo Ten *et al.* (2004), o índice enzimático pode ser usado como uma ferramenta inicial, simples e rápida para auxiliar na seleção de micro-organismos com potencial de produção de enzimas extracelulares, mesmo que estes possam pertencer a uma mesma espécie. Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey a uma probabilidade de 5%.

A Tabela 3 apresenta de forma sintética os melhores resultados obtidos na etapa inicial de seleção das linhagens. Foram selecionadas as linhagens com maior índice enzimático (i.e.) e duas linhagens pertencentes ao gênero *Trichoderma*, que atingiram o diâmetro de 150 mm em placas em menor tempo de incubação. Tal opção deveu-se ao fato de que a maioria das linhagens de *Trichoderma* sp. analisadas, principalmente às que pertencem à coleção de culturas do INPA, cresceram rapidamente em placas de 150 mm de diâmetro contendo meio específico, não sendo possível a determinação do halo de hidrólise e consequente obtenção do i.e.

Tabela 3 - Valores do índice enzimático (i.e.), diâmetros dos halos de crescimento (ϕ_c) e hidrólise (ϕ_i) apresentados pelas linhagens analisadas.

Micro-organismos	Códigos	ϕ_c (mm)	ϕ_i (mm)	i.e.
<i>Fusarium</i> sp.	SAP 09	21	48	4,35 ^a
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CNPAT 038	40	75	1,88 ^b
<i>Trichoderma</i> sp.	LCB 79	65,3	71,6	1,09 ^c
<i>Trichoderma</i> sp.	INPA 666	> 150*	n.d.	n.d.
<i>Trichoderma</i> sp.	INPA 1014	> 150*	n.d.	n.d.
<i>Trichoderma</i> sp.	INPA 1218	>150*	n.d.	n.d.

(*) Tamanho do halo de crescimento após 48 horas de incubação, n.d. – não detectado. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

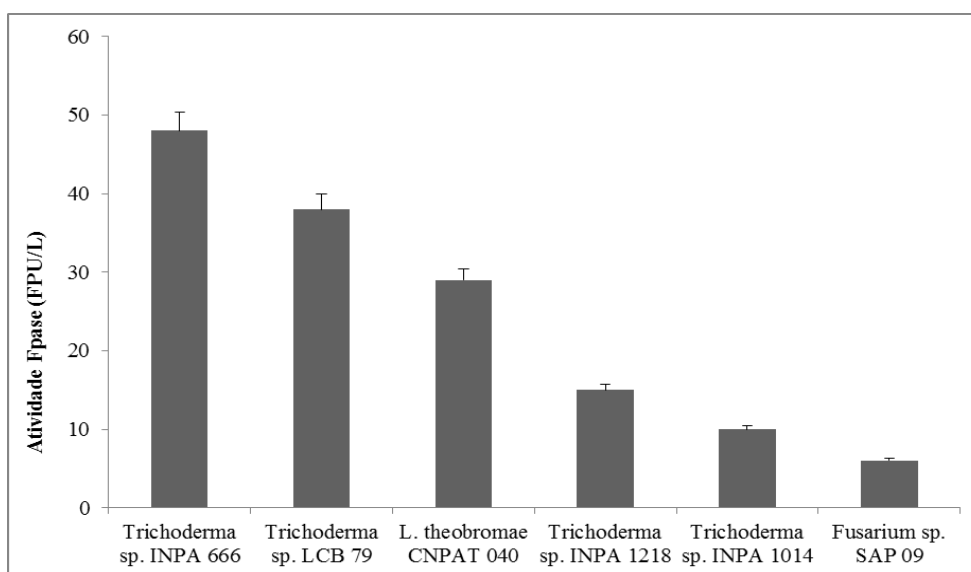
Observou-se que o maior i.e. (4,35) foi alcançado pela linhagem *Fusarium* sp. (SAP 09) isolada do bioma manguezal, seguida das linhagens *Lasiodiplodia theobromae* (CNPAT 038) e *Trichoderma* sp. (LCB 79) com i.e. de 1,88 e 1,097, respectivamente. Notou-se o predomínio de linhagens do gênero *Trichoderma* quando foi considerado o halo de crescimento como critério seletivo, essas linhagens apresentaram ϕ_c (diâmetros dos halos de

crescimento) superior a 150 mm após 48 horas de incubação. Apesar da produção de enzimas celulolíticas concentrarem-se nos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (YUE; JIAN-XIN; LI-WEI, 2009), a identificação de variadas fontes microbianas potenciais produtoras de celulases passa a ter um interesse estratégico para o mercado de celulases. Além disso, como destacam Maheshwari, Bharadwaj e Bhat (2000), as celulases produzidas por esses dois gêneros só funcionam eficientemente em uma estreita faixa de pH, reforçando a necessidade de pesquisas com novos micro-organismos produtores dessas enzimas. Investigações sobre possíveis fontes de enzimas celulolíticas são recorrentes e, voltando-se pertinentemente à busca por micro-organismos capazes de produzir uma mistura de celulases, necessária à solubilização completa e efetiva da celulose (DAS; ROYER; LEFF, 2007).

5.2. Testes de fermentação submersa: testes em erlenmyers não aletados

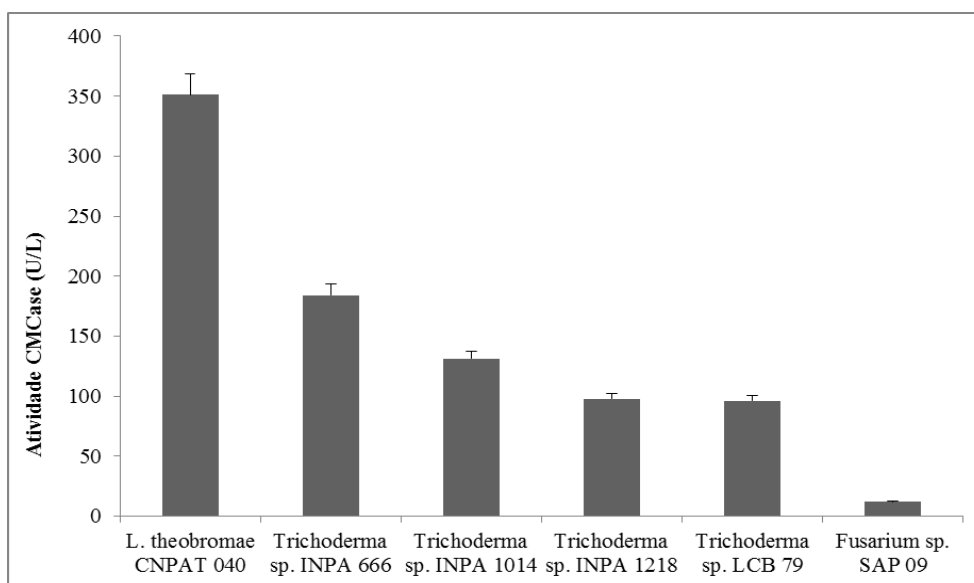
Os fungos selecionados na etapa inicial foram submetidos ao processo de fermentação submersa em erlenmyers não aletados com a finalidade de selecionar o micro-organismo com maior potencial celulolítico em meio líquido (Figura 8). Para essa etapa de seleção utilizou-se como parâmetro a produção de celulases totais utilizando papel de filtro como substrato (FPase). A linhagem *Trichoderma* sp. INPA 666, apresentou maior atividade enzimática após 72 horas de fermentação (48,0 FPU/L). Apesar do isolado *Fusarium* sp. SAP 09 ter obtido maior potencial enzimático na etapa inicial de seleção, apresentou-se como a linhagem menos promissora, com atividade enzimática de 6,0 FPU/L.

Figura 8 - Perfil enzimático para FPase das linhagens nos testes de fermentação submersa em erlenmyers não aletados.



Os valores de atividade enzimática de endoglucanases, através da análise de CMCase (Figura 9), mostram um perfil diferente. Nas condições estabelecidas, a linhagem *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040 destacou-se das demais, com atividade de CMCase de 351,3 U/L. O isolado de *Fusarium* sp. SAP 09 novamente apresentou-se como o fungo com menor potencial de produção enzimática (12,1 U/L).

Figura 9 - Perfil enzimático CMCase das linhagens nos testes de fermentação submersa em erlenmyers não aletados.



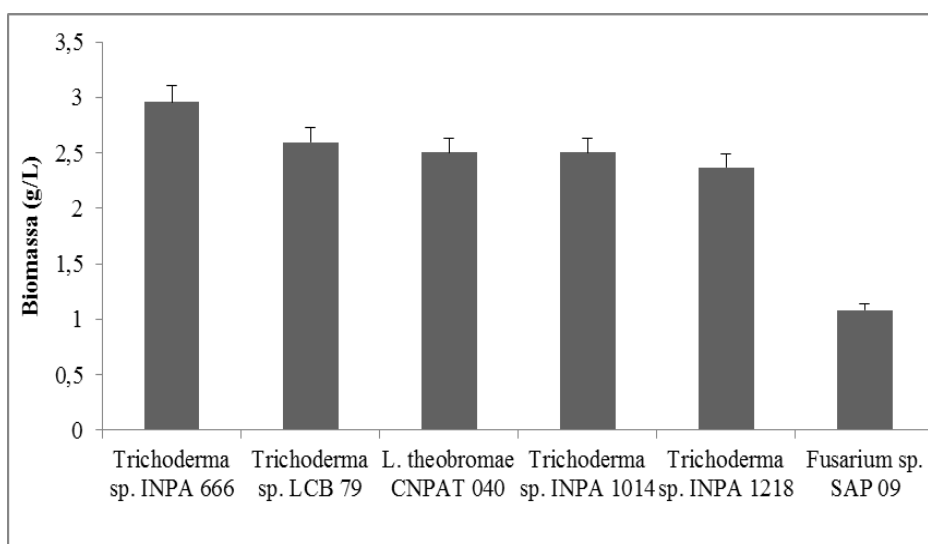
Apesar do parâmetro utilizado para a escolha do micro-organismo ter sido a análise de FPase, que fornece dados do perfil de produção de celulases totais, é válido ressaltar a importância de se analisar o potencial de produção de endoglucanases (CMCase), tal é o sinergismo necessário das enzimas na completa degradação da celulose a açúcares fermentescíveis. Assim como, fungos de gêneros distintos produzem diferentes quantidades das enzimas do complexo celulolítico, somente aqueles que produzem níveis apropriados de endoglucanase, exoglucanase e glucosidase são capazes de degradar com eficácia a celulose natural (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Enquanto vários fungos possuem a capacidade de metabolizar a celulose como fonte de energia, só algumas linhagens são capazes de secretar todas as enzimas do complexo celulolítico. O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*, por exemplo, é composto de até 80% de exoglucanases, 20 a 36% de endoglucanases e é deficiente em β -glucosidases, com produção de apenas 1%. Enquanto o fungo *T. reesei* sintetiza níveis baixos de β -glucosidases,

fungos do gênero *Aspergillus* possuem níveis limitados de endoglucanase (MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI, 2006; ZALDIVAR *et al.*, 2001).

A Figura 10, demonstra a produção de biomassa, expressa em g/L, pelos fungos analisados. A máxima produção foi registrada por *Trichoderma* sp. INPA 666 (2,95 g/L) e a menor para *Fusarium* sp. SAP 09 (1,08 g/L), linhagens com maiores e menores atividades de FPase, respectivamente. No entanto, as demais linhagens apresentaram produção de biomassa muito semelhante e distintas atividades de FPase. Assim, tais constatações não permitiram estabelecer uma relação entre a produção de FPase e a produção de biomassa pelo fungo.

Figura 10 - Crescimento do fungo denotado através do peso seco da biomassa, em g/L.



Observando o perfil de pH dos experimentos (Tabela 4), percebeu-se, para as linhagens do gênero *Trichoderma*, queda nos valores após 72 horas de fermentação, ressaltando que o valor inicial estabelecido nos ensaios foi de 5,5.

Tabela 4 - Perfil de pH final das linhagens analisadas

Fungos	pH
<i>Fusarium</i> sp. SAP 09	5,23
<i>Trichoderma</i> sp. INPA 666	3,23
<i>Trichoderma</i> sp. LCB 79	3,20
<i>Trichoderma</i> sp. INPA 1014	2,88
<i>Trichoderma</i> sp. INPA 1218	2,77
<i>L. theobromae</i> CNPAT 040	4,26

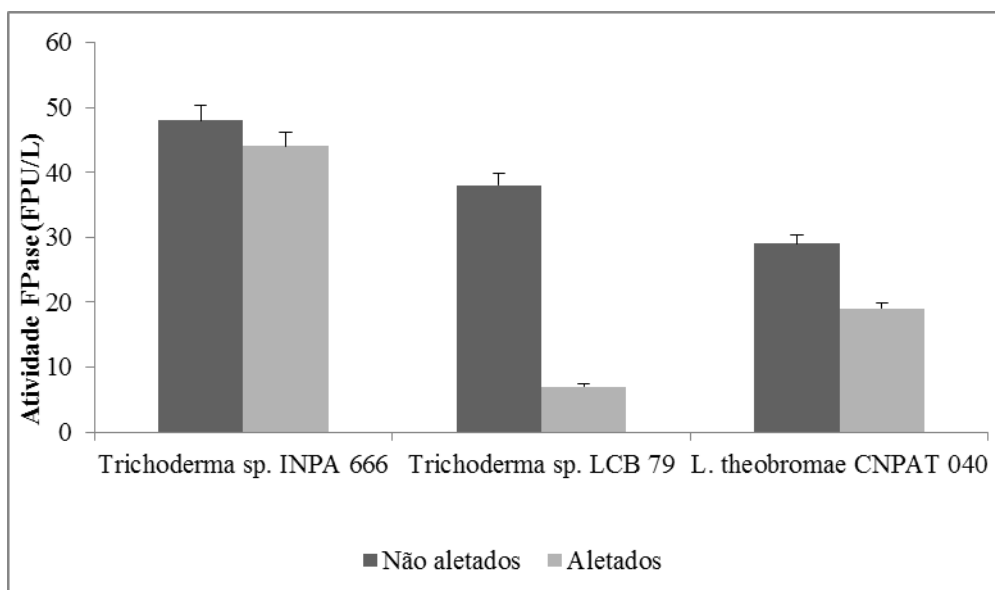
Dentre as cepas de *Trichoderma* sp., a linhagem INPA 666 apresentou maior atividade de FPase e maior pH (3,23). Provavelmente a acidez acentuada nos meios de fermentação, relacionou-se ao não controle do pH durante o processo, sendo essa condição possivelmente deletéria para produção enzimática. De acordo com Sternberg *et al.* (1976), em estudo de estabilidade de produção de celulases por *T. viride*, a faixa de pH entre 5,0 e 6,0 para produção de celulases parece ser a melhor para produção da enzima. Os autores observaram que as celulases são parcialmente inativadas em determinados níveis de pH, no qual a faixa entre 3,0 e 3,4 é deletéria para a atividade de β -glicosidases e as atividades de FPase e CMCase desestabilizam-se em pH inferior a 3,0. Tangnu, Blanch e Wilke (1981), analisando a produção de celulases por *T. reesei* RUT-C30, sob diferentes condições de pH e controle desse parâmetro, verificaram que em meio de cultura com controle de pH acima de 5,0 houve a produção máxima de FPase, detectando uma atividade acima de 2000 FPU/L. Verificou-se também que fermentações mantida em pH em 3,3, desencadearam menor produção de FPase.

5.3. Comparação entre erlenmeyers aletados e não-aletados.

Com a finalidade de conhecer o perfil de produção enzimática sob condições de alterações morfológicas, devido à aplicação de uma força de cisalhamento nas células fúngicas, as três linhagens que apresentaram melhor desempenho nos ensaios em erlenmeyers não aletados foram submetidas ao processo de fermentação submersa em erlenmeyers aletados: *Trichoderma* sp. INPA 666, *Trichoderma* sp. LCB 79 e *L. theobromae* CNPAT 040.

Os resultados da produção de FPase estão apresentados na Figura 11 e demonstram que a produção enzimática foi maior em erlenmeyer não aletados. Os resultados apresentados pela linhagem *Trichoderma* sp. INPA 666 foram submetidos ao teste estatístico de Tukey a 5% de probabilidade, no qual demonstrou haver diferença significativa, com atividades 48,7 FPU/L e 44,0 FPU/L, respectivamente para frasco não aletado e aletado (queda de 9,7 % na atividade).

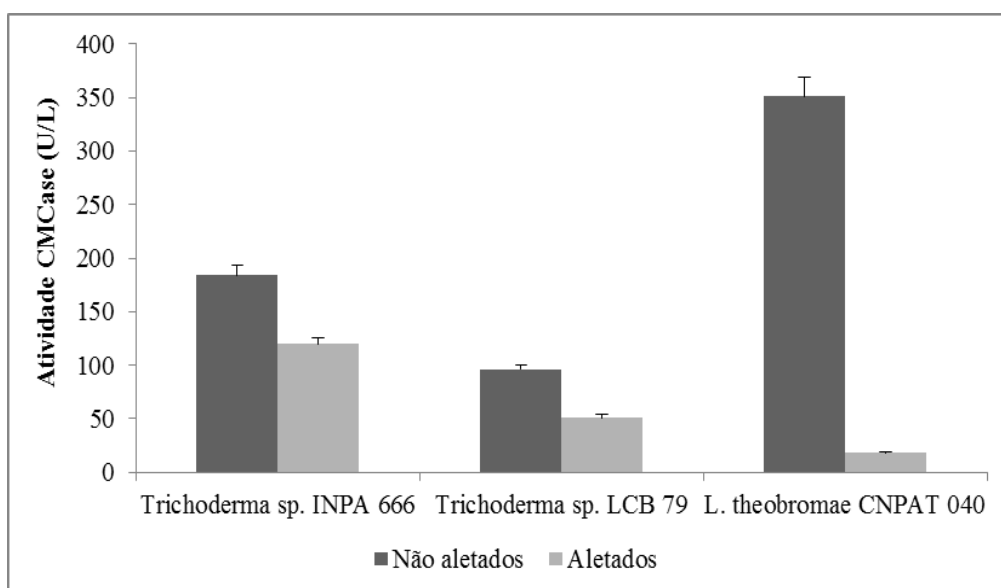
Figura 11 - Comparação da atividade de FPase (FPU/L) em testes realizados com erlenmeyers não aletados e aletados.



A produção de FPase da linhagem *Trichoderma* sp. LCB 79 alcançou 38,0 FPU/L nos testes com erlenmeyers não aletados e não ultrapassou 7,0 FPU/L nos aletados (queda de 81,6% de atividade). Similarmente *L. theobromae* CNPAT 040 apresentou o mesmo comportamento, a atividade de FPase caiu em 34,5%.

A produção de CMCCase (Figura 12) apresenta um perfil parecido com a atividade de FPase, com maior produção enzimática em frascos não aletados.

Figura 12 - Comparação da atividade de CMCCase (U/L) em testes realizados com erlenmeyers não aletados e aletados.



Considerável atividade para CMCase de *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 040 foi registrada nos experimentos com frascos não aletados (351,3 U/L), ao passo que nos testes com frascos aletados a atividade de CMCase dessa linhagem foi a menor determinada (18,0 U/L). *Trichoderma* sp. INPA 666 teve o segundo melhor desempenho para a produção de CMCase, apresentando 184,0 U/L em frascos não aletados e, apresentou ainda a maior atividade de CMCase (119,7 U/L) para os ensaios em frascos aletados. *Trichoderma* sp. LCB 79 apresentou uma atividade de CMCase de 95,9 U/L em frascos não aletados e caiu para 51,0 U/L nos frascos aletados.

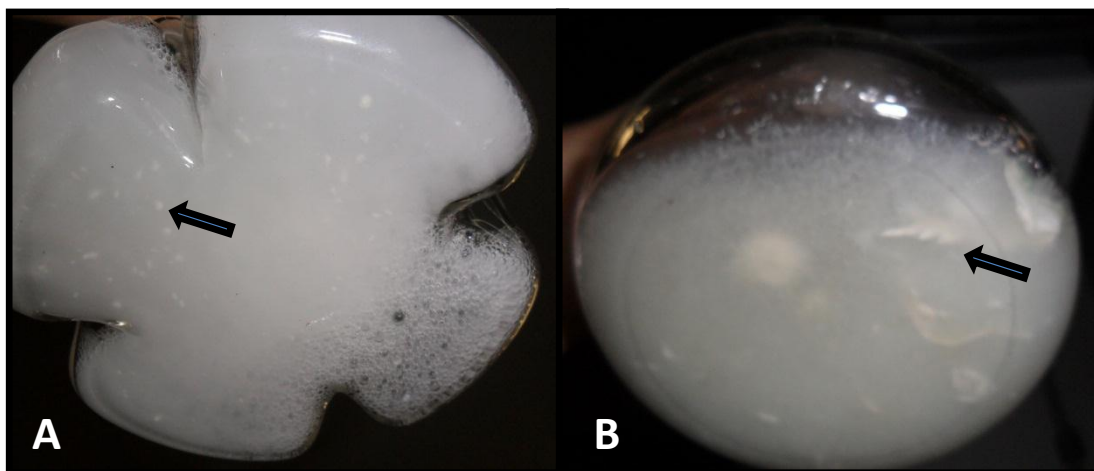
Notou-se que, diante das condições de fermentação adotadas, as forças de resistência propiciadas pelas aletas nos frascos possivelmente foram deletérias na produção enzimática de FPase e de endoglucanases. Em contrapartida, observou-se que o efeito de cisalhamento das células provocado pelo emprego de erlenmeyers aletados, não interferiu plenamente no desempenho da produção enzimática de linhagem INPA 666, apesar da diferença estatística na comparação das médias dos resultados.

Para a maioria das fermentações que utilizam fungos, a produtividade é dependente de uma morfologia ótima. O controle dessa morfologia e sua relação com as condições operacionais do processo fermentativo devem ser bem estudados (CUI *et al.*, 1998). É interessante destacar que em culturas submersas, a morfologia de micro-organismos filamentosos geralmente varia entre a forma de *pellets* e a forma dispersa (concentrado de hifas e agregados), dependendo das condições de cultivo e do genótipo da linhagem utilizada no processo. A estrutura trivial dos *pellets* constitui de um emaranhado de massa densa de hifas crescendo radialmente. A formação de micélios livres proporciona um meio fermentativo viscoso e pseudoplástico que reduzem a transferência de massa gás-líquido e a homogeneidade do meio (COX; PAUL; THOMAS, 1998). Sabe-se pouco sobre o mecanismo de alongamento, ramificação e fragmentação das hifas, porém a forma de crescimento e número de células viáveis no meio de cultura estão relacionados com os metabólitos primários e secundários produzidos pelos micro-organismos. A morfologia influencia diretamente a reologia do meio de cultura, por outro lado, as características do meio também interferem na fisiologia dos micro-organismos, constituindo-se em uma relação complexa, o que torna o controle das variáveis morfológicas uma tarefa difícil (PINTO *et al.*, 2004).

As culturas nos frascos não aletados caracterizaram-se pela presença de filamentos de hifas dos fungos e pouca formação de *pellets* com 72 horas de fermentação. O caldo fermentativo nos frascos aletados caracterizou-se por menor crescimento na cultura líquida,

maior formação de *pellets* e crescimento disperso do micro-organismo aderido à vidraria (Figura 13).

Figura 13 - Aspecto cultural de *Trichoderma* sp. INPA 666 cultivada em frascos Erlenmeyer.



A. Presença de *pellets* em frascos aletados. B. formação de filamentos de hifas do fungo em frascos não aletados. Fonte: arquivo pessoal.

Domingues *et al.* (2001), em estudo avaliando a influência das condições nutricionais na morfologia de *Trichoderma* sp. RUT C-30 na produção de celulases, averiguaram que em meio fermentativo, sem a formação de *pellets*, houve uma maior produção de FPase em 72 horas. Utilizou-se lactose como indutor para produção de celulases, sob condições similares aos estabelecidos nos experimentos do presente estudo. Os autores enfatizam que o crescimento na forma de hifas em meio líquido, facilita a adesão dos fungos no material celulósico, auxiliando na obtenção de uma maior produtividade de enzimas celulolíticas. Tal fenômeno possivelmente está relacionado à limitação da transferência de oxigênio dentro dos *pellets*.

Os resultados dessa etapa sugerem que, na ampliação de escala para biorreatores, o equipamento seja configurado de forma que minimize os possíveis danos causados na morfologia do micro-organismo devido às forças cisalhantes. Dentre as possibilidades estão o uso de reatores do tipo *Air-lift*, coluna de bolhas ou mesmo o uso de reator do tipo *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR), com impelidores que promovam menor cisalhamento às células, como os tipos pás marinhas ou *pitched blade*.

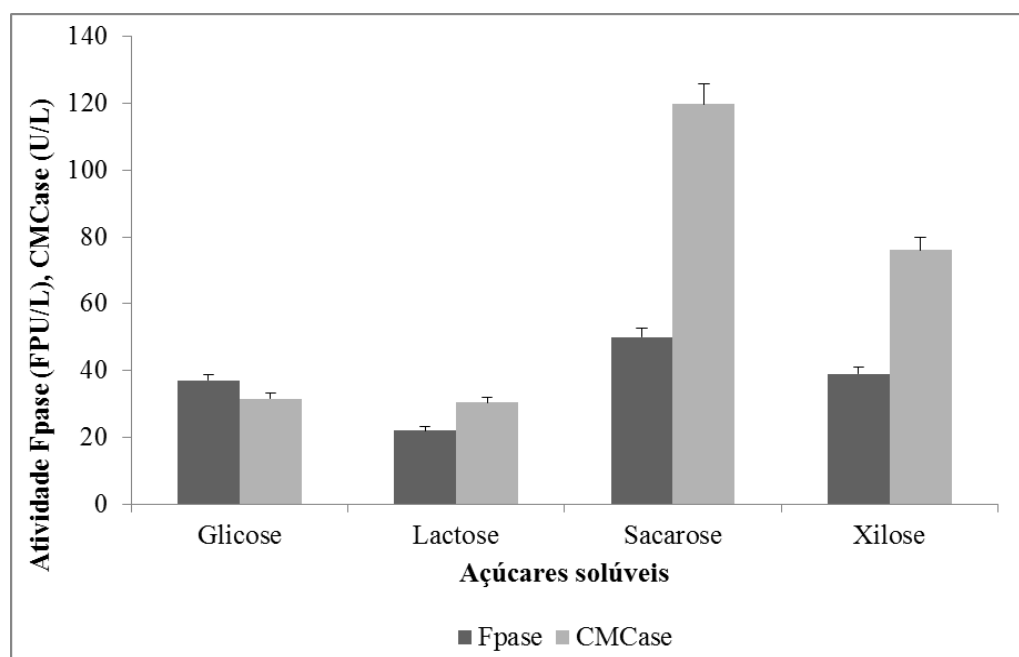
Como demonstraram Ganesh, Josh e Sawant (2000), a atividade de celulases diminuiu com o aumento da velocidade de agitação em um biorreator de tanque agitado (CSTR)

utilizando homogeneizadores do tipo Rushton, apontando que um aumento na velocidade rotacional aumentaram as forças cisalhantes. Os autores concluíram que há um impacto negativo sobre o crescimento celular e na produção de celulases à medida que é aumentada a força de cisalhamento sobre o caldo fermentativo. Segundo Ahamed e Vermette (2010), dentre os possíveis problemas que aparecem no processo fermentativo para obtenção de celulases, está a força de cisalhamento aplicada nos micro-organismos em biorreatores do tipo CSTR. Essa classe de reatores, por utilizarem a maior parte das vezes impelidores do tipo Rushton para homogeneização do meio fermentativo, geralmente são usados para produção de celulases. No entanto, há a dificuldade de prever a distribuição das forças de cisalhamento dentro do tanque, que ocasionam danos aos micro-organismos filamentosos, reduzindo a produtividade das enzimas (AHAMED; VERMETTE, 2010). Alguns projetos de biorreatores sugerem aumento na taxa de transferência de oxigênio, enquanto limitam o efeito danoso das injúrias mecânicas sofridas por fungos filamentosos. Reatores do tipo *Air-lift* podem cumprir esse papel, uma vez que são pneumaticamente agitados (GOUVEIA; HOKKA; BADINO-JR., 2003).

5.4. Estudo de diferentes açúcares solúveis nos meios fermentativos para produção de celulases

A Figura 14 apresenta os valores das atividades de FPase e CMCase, respectivamente em FPU/L e U/L, das fermentações com quatro tipos de açúcares solúveis: glicose, lactose, sacarose e xilose. Observou-se que a sacarose, como componente do meio de cultura, promoveu a maior produção de FPase, apresentando atividade de 50,0 FPU/L.

Figura 14 - Perfil de produção de celulases por *Trichoderma* sp. INPA 666 com diferentes fontes de açúcares solúveis.



Celulases são enzimas que precisam ser induzidas e dentre os aspectos que mais geram custos na produção industrial da enzima repousa na escolha criteriosa do indutor. Embora a produção da maioria das celulases de origem microbiana seja induzida na presença de celulose, a exclusividade dessa fonte de carbono pode não ser suficiente para desencadear reposta enzimática, por se tratar de uma molécula de caráter insolúvel. Consideráveis estudos reportam que um nível basal de celulases são produzidas na presença de um indutor de menor peso molecular. Assim, sacarídeos solúveis podem ser utilizados como indutores tais como celobiose, glicose, lactose e sacarose (BON *et al.*, 2008; CARLE-URIOSTE *et al.*, 1997).

Em estudo analisando a influência de várias fontes de carbono como glicose, lactose e xilose em fermentação submersa utilizando três isolados de *Trichoderma reesei*, Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006) verificaram que a combinação de celulose com xilose apresentou a melhor produção de FPase com atividades de 7,02, 24,86 e 23,48 FPU/L, respectivamente para as linhagens *T. reesei* 94.144, *T. reesei* 97.177 e *T. reesei* Tm3, em 10 dias de fermentação. O mesmo comportamento também foi verificado na produção de CMCase. Os autores observaram que a atividade de celulases foi baixa quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, possivelmente pelo seu efeito inibidor. Delabona *et al.* (2012), em estudo utilizando a linhagem *Trichoderma harzianum*, cultivada em erlenmeyers

com meio líquido a 29 °C, relataram que o uso de sacarose apresentou maior atividade de FPase (420 FPU/L), frente ao uso de lactose na mesma concentração. Domingues *et al.* (2001), em análise utilizando *T. reesei* RUT-C30, verificaram que houve aumento na produção de celulases ao empregar lactose como única fonte de carbono (1500,0 FPU/L), se comparada ao emprego de glicose (900,0 FPU/L). No entanto, os autores enfatizam que na associação dos dois açúcares houve uma maior produção enzimática (2800,0 FPU/L), sugerindo que a sinergia de lactose e glicose no meio fermentativo favorecem benefícios econômicos ao processo.

A lactose é considerada um excelente indutor de celulases para emprego em escala comercial, principalmente pelo baixo custo do material (KARAFFA *et al.*, 2006). Apesar de ser reconhecida como um bom indutor da síntese de celulases, nas condições estabelecidas neste estudo, percebeu-se que o desempenho desse indutor não foi relevante, já que o uso desse dissacarídeo relacionou-se aos menores valores para atividades de FPase (22 FPU/L) e CMCCase (30,4 U/L).

Mesmo sendo uma eficiente fonte para o crescimento celular em meio líquido, o emprego da glicose na produção de várias enzimas e sua regulação, tem sido estudado principalmente pelo seu conhecido efeito repressor (LAMBERT; MEERS; BEST, 1983). Cabe salientar, que essa característica relatada como repressora, não foi observada nos valores obtidos no presente estudo. A atividade de FPase e CMCCase utilizando glicose foram, respectivamente, 37,0 e 31,5 U/L, sendo o terceiro melhor perfil de produção de celulases.

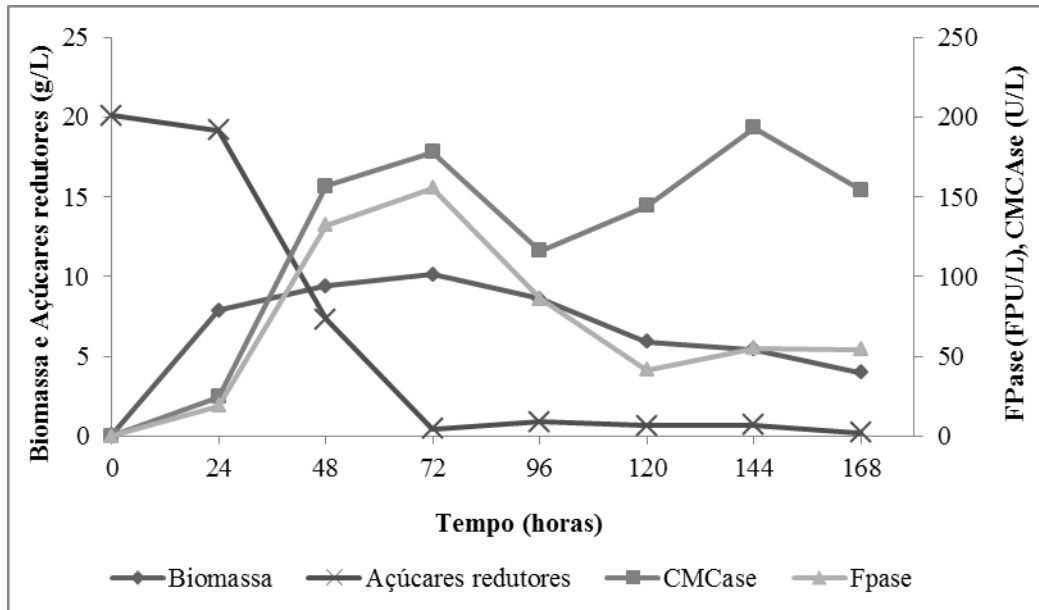
5.5. Testes em Biorreator

A linhagem *Trichoderma* sp. INPA 666, selecionada como a melhor produtora de FPase nos testes anteriores, foi submetida ao processo de fermentação submersa em biorreator. É válido ressaltar que, apesar dos resultados em erlenmeyers aletados sugerirem uma configuração do reator que cause menos injúrias físicas, o uso de reatores CSTR com impelidores do tipo Rushton nessa etapa de fermentação em reatores deveu-se à disponibilidade dessa configuração durante o desenvolvimento dos experimentos.

Em um primeiro instante foi investigada a melhor estratégia de obtenção do pré-inóculo, assim como a produção de celulases frente o controle de pH. Os gráficos das figuras 15, 16 e 17 mostram o perfil de produção enzimática (FPase e CMCCase), teor de açúcares redutores totais e biomassa nos três testes. Em todas as estratégias, a produção máxima de

FPase foi atingida em 72 horas de fermentação. Como mostra o gráfico da Figura 15, a partir do tempo 96 horas a produção de CMCase é crescente até atingir a produção máxima em 144 horas (193,0 U/L).

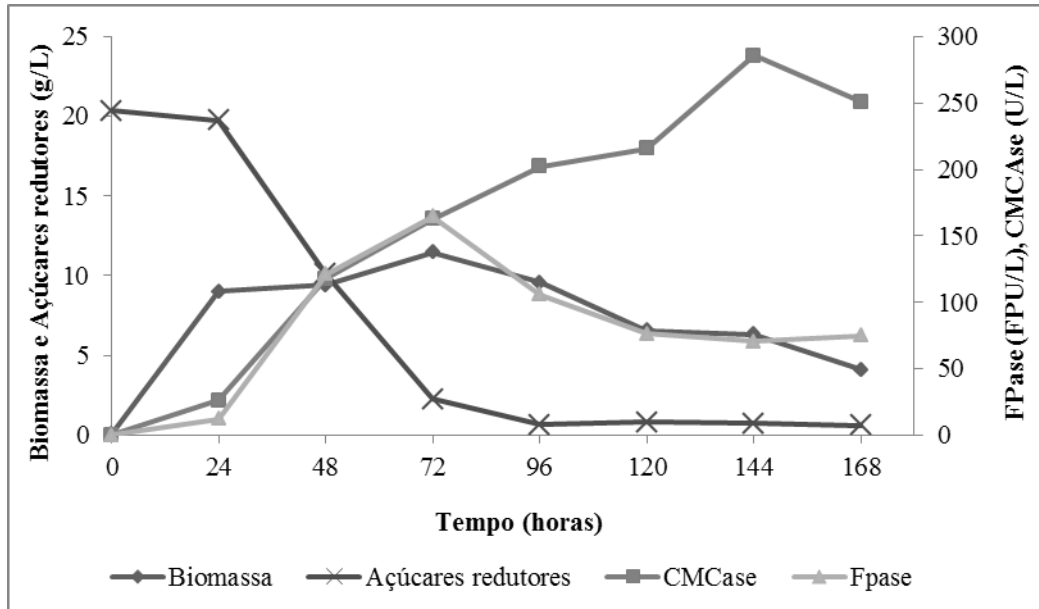
Figura 15 - Produção de FPase, CMCCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em BDA.



Observou-se que no perfil do teste com esporos crescidos em BDA houve maior produção de FPase em 72 horas de fermentação, com atividade 155,5 FPU/L. No mesmo intervalo de tempo houve o maior crescimento microbiano, denotado pelo peso seco da biomassa (10,13 g/L) e decréscimo acentuado no teor de açúcar presente no meio fermentativo.

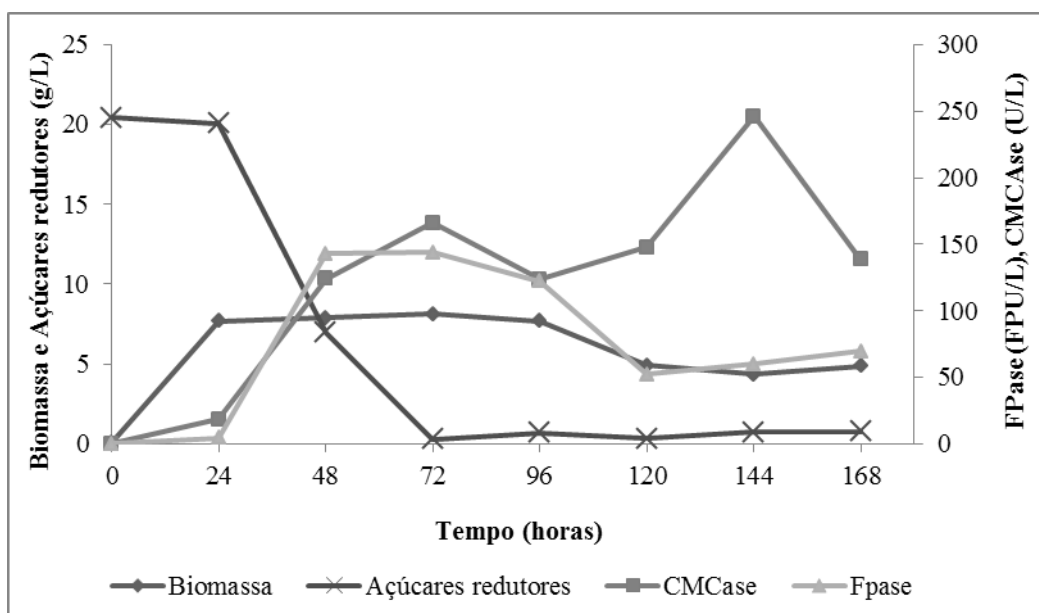
A Figura 16 mostra o perfil do processo fermentativo em que os esporos foram produzidos em meio semi-sólido de farelo de trigo e água peptonada. No tempo 72 horas, no qual a produção de FPase é máxima (164,0 FPU/L), assim como a biomassa (11,4 g/L), uma pequena quantidade de açúcar ainda permaneceu no meio de fermentação (2,25 g/L). A partir desse tempo a produção de CMCCase distinguiu-se do perfil de produção de FPase, que tornou-se decrescente e, a produção máxima de CMCCase ocorreu no tempo de 144 horas, com atividade 285,0 U/L.

Figura 16 - Produção de FPase, CMCCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em meio farelo de trigo.



No teste em que foi utilizado sub-cultivo do fungo em meio líquido (Figura 17), o perfil da produção de CMCCase apresentou-se similar ao teste com inóculo a partir de esporos desenvolvidos em BDA e máxima produção em 144 horas (246,0 U/L).

Figura 17 - Produção de FPase, CMCCase, biomassa e consumo de açúcares durante 168 horas de fermentação do teste com esporos crescidos em meio líquido.



Nos três testes, a máxima produção de FPase foi observada em 72 horas de fermentação. Com a finalidade de classificar, dentre as estratégias de inoculação, aquela que apresentou maior produção enzimática, as médias dos resultados de FPase no tempo de 72 horas foram comparados estatisticamente utilizando o teste de Tukey a 5% de significância. Como mostra a tabela 5, o teste com inóculo produzido em meio de farelo de trigo destacou-se estatisticamente dos demais.

Tabela 5 - Valores de FPase das diferentes estratégias de inoculação em 72 horas de fermentação.

Estratégia	Atividade FPase (FPU/L)
Meio farelo de trigo	164,6 ± 0,30 ^a
Meio BDA	155,5 ± 0,44 ^b
Sub-cultivo em meio líquido	143,9 ± 0,92 ^c

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Segundo Morin (1992), o tipo de inóculo usado é possivelmente um dos parâmetros mais importantes para o processo fermentativo. O uso de fragmentos de micélios, como os obtidos em culturas líquidas, evita a fase de germinação dos fungos e diminui o tempo até a fase de propagação celular. Por outro lado, a opção o uso de esporos como pré-inóculo proporcionaria um crescimento celular maior em um período de tempo mais longo por ter que passar obrigatoriamente pela fase de germinação.

Após análise destes resultados, fica demonstrado que a opção pelo inóculo de esporos produzidos em meio de cultura semi-sólido de farelo de trigo poderá ser a melhor opção para futuras fermentações afim de avaliar outros parâmetros na produção de celulases.

6. CONCLUSÕES

Seis linhagens fúngicas destacaram-se das demais na etapa inicial de seleção.

Trichoderma sp. INPA 666 foi a que apresentou melhor perfil de produção de celulases em ensaio de fermentação submersa em erlenmeyers.

A maior produção de enzimas celulolíticas deu-se em erlenmeyer sem a presença de aletas.

O meio de cultura contendo sacarose apresentou os melhores resultados para a atividade enzimática.

A melhor estratégia de inoculação para o biorreator foi uma suspensão de esporos obtidos a partir de uma fermentação semi-sólida de farelo de trigo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

Determinação da concentração ideal de indutores solúveis e insolúveis nos ensaios em biorreator.

Estudo comparativo com a linhagem padrão *Trichoderma viride* QM 9414.

Estudos de configuração do reator CSRT: utilização de diferentes tipos de impelidores e chicanas de diferentes conformações.

Comparação do processo fermentativo em reator CSTR com reatores do tipo *Air-lift*.

Comparação entre os regimes batelada simples e alimentada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 67 - 72, 2004.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515 – 1524, 2008.
- 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, p. 379–387, 2010.
- AHAMED, A., VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 41 – 46, 2008.
- ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel coproduct stream. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 8, n. 9, p. 625–630, 2005.
- BADGER, P. C. **Ethanol From Cellulose: A General Review**, 2002. Disponível em: <<http://large.stanford.edu/publications/coal/references/docs/badger.pdf>>. Acesso em: 10 novembro 2011.
- BANERJE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Resource**, v. 3, n. 1, p. 82 – 92, 2010.
- BENNET, J. W. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.66, p. 101-107, 1998.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, n. 18, p. 355–383, 2000.
- BIER, J. W.; SPLITTSTOESSER, D. F.; TORTORELLO, M. L. Microscopic methods. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA - American Public Health Association, 2001, p. 40.
- BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. In: FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 242 – 245.
- BON, E.P.S.; PEREIRA JR., N. GOTTSCHALK, L.M.F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.C.; Bioprocessos para produção de enzimas. In: In: FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 103.
- CARLE-URIOSTE, J.C.; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; TORIGOI, E.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; EL-DORRY, H. Cellulase

induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.10169 – 10174, 1997.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; GAURAV, S. S. DAROKAR, M. P.; SANGWAN, R. S.; GAURAV, S. S.; DAROKAR, M. P.; SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1659 – 1662, 2009.

CHANG, M. C. Y. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 677 – 684, 2007.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3 – 23, 2005.

CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957582011000796>>. Acesso em: 01 dez. 2011.

COX, P.W.; PAUL, G.C.; THOMAS, C.R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, v.144, p.817 – 827, 1998.

CUI, Y. Q.; OKKERSE, W. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. CH. A. M. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 2, p. 216 – 229, 1998.

DAS, M.; ROYER, T. V.; LEFF, L.G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied Environ Microbiol**, v. 73, n.3, p.756 – 767, 2007.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R. AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, não paginado, 2012.

DEMAIN, A. L. Biosolutions to the energy problem. **Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 319 – 332, 2009.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CARBAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**, v.23, n.10, p. 771 – 775, 2001.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGPUTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 275 – 282, 2008.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. b-glucosidase production and characterization of some *Aspergillus strains*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Zagreb, v. 18, n. 3, p. 303-307, 2004.

FUKUOKA, A.; DEPHE, P.L. Catalytic conversion of cellulose into sugar alcohols. **Angewandte Chemie International Edition**, v.45, n. 31, p.5161 – 5163, 2006.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GUERRA-RODRIGUEZ, E.; PORTILLA-RIVERA, O.M.; JARQUÍN-ENRÍQUEZ, L.; RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Acid hydrolysis of wheat straw: A kinetic study. **Biomass and Bioenergy**, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411005769>> Acesso em: 22 nov. 2011.

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

GOUVEIA, E. R.; HOKKA, C. O.; BADINO-JR, A. C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 263 – 274, 2003.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P.; SALANOVICH, T. N.; BUKHTOJAROV, F. E.; MARKOV, A. V.; USTINOV, B. B. Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 57 – 69, 2005.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenergy**, v. 28, n.4, p.384 – 410, 2005.

HILDÉN, L.; JOHANSSON, G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 22, p. 1683–1693, 2004.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 9, p. 4044 – 4098, 2006.

KARAFFA, L.; FEKETE, E.; GAMAUF, C.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C. P.; SEIBOTH, B. D-Galactose induces cellulose gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. **Microbiology**, v. 152, p. 1507 – 1514, 2006.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R.. Current Trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, p. 41-53, 2011.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345 - 51, 2002.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-international edition**, v. 44, n.22, p. 3358 – 3393, 2005.

KLINKE, H.B.; AHRING, B.K.; SCHIMIDT, A.S.; THOMSEN, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 15 – 26, 2002.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377 – 391, 2008.

LAMBERT, P.W.; MEERS, J.L.; BEST, D.J. The production of industrial enzymes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 26, n. 300, p. 263 – 282, 1983.

LEUNGA, M. Y. K.; LIUB, C.; KOONB, J. C. M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, n. 2, p. 101 – 114, 2006.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-Industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p., 272–277, 2005.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627 – 642, 2006.

LYND, L. R.; LASER, M.S.; BRANSBY, D.; DALE, B.E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J.D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C.E. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169 – 172, 2008.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W.H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577 – 83, 2005.

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

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461 – 488, 2000.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 5, p. 500 – 516, 2009.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 269 – 278, 1957.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, p. 391 – 413, 1969.

MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553 – 560, 2008.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2 ed. Editora: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2004. 187 p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagents for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 – 438, 1959.

MOHAN, D.; PITTMAN, J. R. C.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A Review. **Energy & Fuels**, Missisipi, v. 20, p. 848 – 889, 2006.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 777 – 782, 1977.

MORIN, L. Mass-production of fungi for bioherbicides. **Plant Protection Quartely**, v.7, n.4, p.143-148, 1992.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p. 28 – 23, 2007.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p.1 – 10, 2004.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817 – 830, 2010.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugar cane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.20, p. 1873–1881, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3a ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

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

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 452 – 481, 2006.

PINTO, L.S.; VIEIRA, L.M.; PONS, L.N.; FONSECA, M.M.R.; MENEZES, J.C. Monitorização de processos biológicos: análise digital de imagens. **Boletim de Biotecnologia**, p. 15-21, 2004. Disponível em: <http://deqb.ist.utl.pt/bbio/70/pdf/Analise_Digital_de_Imagem.pdf> Acesso em: 28 nov. 2011.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2007.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p 577 – 591, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2001. p.906.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Advances**, v. 27, n. 2, p. 185 – 194, 2009.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 5270 – 5295, 2008.

SAXENA, R.C.; ADHIKARI, D.K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 13, p. 167 – 178, 2009.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219 – 228, 2003.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. 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.

SQUINA, F. M.; MORT, A. J.; DECKER, S. R.; PRADE R. A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n.1, p. 65 – 71, 2009.

STERNBERG, D. β -glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 648 – 654, 1976.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science Mag**, v. 315, n. 5813, p.801 – 804, 2007.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, n. 11, p. 832 – 844, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p.1 – 11, 2002.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315 – 330, 2004.

TANGNU, S. K., BLANCH, H. W., WILKE, C. R.. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and b-glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 8, p. 1837 – 1849, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-Polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780. 1982.

TEN, L.N.; IMA, W-T; KANGA, M-K.M.S., LEEA, S-T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 375 – 382, 2004.

VARGA, E.; THOMSEN, M. H.; THOMSEN, A. B. Bioethanol production from wet oxidized corn stover using pretreatment manure as a nutrient source, 2004. Disponível em: <http://130.226.56.153/rispubl/BIO/biopdf/bio_2_2006.pdf>. Acesso em: 10 outubro 2011.

YUE, F.; JIAN-XIN, J.; LI-WEI, Z. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. **Forestry Studies in China**, v. 11, n. 3, p. 202 – 207, 2009.

WANG, W.; KANG, L.; LEE, Y.Y. Production of Cellulase from Kraft Paper Mill Sludge by *Trichoderma Reesei* Rut C-30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 382 – 394, 2010.

WOOD, T.M.; MCCARE, S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Advances in Chemistry**, v. 181, p. 181 - 209, 1979.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, n.1, p. 289 – 297, 2008.

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295 – 299, 2009.

ZALDIVAR, M.; VELASQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I.; PEREZ, L.M. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 1–7, 2001.