

**NATÁLIA PAGANINI MARQUES**

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DE MATERIAL  
VEGETAL EM FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins**

**ARARAQUARA  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

M357p Marques, Natália Paganini  
Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos / Natália Paganini Marques. – Araraquara : [s.n], 2013  
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Daniela Alonso Bocchini Martins

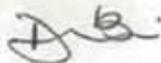
1. Biotecnologia. 2. Fungos endofíticos. 3. Celulases. 4. Xilanases. 5. Amilases. I. Título.

NATÁLIA PAGANINI MARQUES

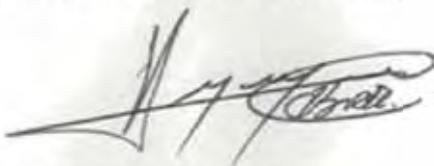
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de agosto de 2013.

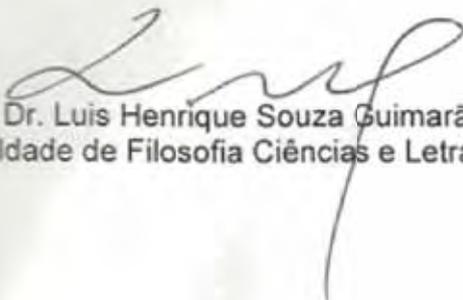
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Daniela Alonso Bocchini Martins (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Hamilton Cabral  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães  
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

## DADOS CURRICULARES

### NATÁLIA PAGANINI MARQUES

#### Formação Acadêmica (2002/2006)

Engenheira Agrônoma

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

#### 1. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

MARIANO, F. A. C., MARQUES, N. P., CARVALHO, F. L. B., CORREA, L. S., MOREIRA, E. R., BOLIANI, A. C. Efeitos do Ácido Indolbutírico e tempo de imersão no enraizamento de estacas semi-lenhosas e herbáceas de *Rubus* sp. **Cultura Agrônômica** (UNESP. Ilha Solteira), v. 19, p. 79 - 87, 2010.

CARVALHO, F. L. B., MARIANO, F. A. C., MARQUES, N. P., OLIVEIRA, L.L., CORREA, L. S., BOLIANI, A. C. Ácido Indolbutírico e tempo de imersão no enraizamento de estacas semi-lenhosas e herbáceas de Amoreira-preta. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** (Cd-Rom), v. 13, p. 1497 - 1497, 2007.

CARVALHO, F. L. B., MARIANO, F. A. C., MARQUES, N. P., OLIVEIRA, L. L., CORREA, L. S., BOLIANI, A. C. Doses de Ácido Indolbutírico, tamanhos de estacas e diferentes substratos no enraizamento de estacas de amoreira-preta sob nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** (Cd-Rom), v. 13, p. 1489 - 1489, 2007.

#### 2. Participação em eventos científicos:

##### - 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals

29 de abril a 02 de maio de 2013. Portland, OR – Estados Unidos.

“Evaluation of culture conditions for cellulases and xylanase production by an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*”

##### - III Congresso Latinoamericano Biorrefinerías - Ideas para un mundo sustentable

19 a 21 de novembro de 2012. Pucón - Chile.

“Production of plant material degradation hydrolytic enzymes by endophytic fungi using lignocellulosic materials as substrates”

##### - X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC

07 a 10 de outubro de 2012. Blumenau, SC – Brasil.

“Prospecção de enzimas celulolíticas entre fungos endofíticos”

**E-mail:** nataliapaganini@hotmail.com

*Dedico esta dissertação em especial a minha irmã pelo apoio e incentivo. Pessoa essencial em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrando-me os caminhos nas horas incertas.*

*Aos meus pais João Marques e Teresinha Marques por terem oferecido contínuo apoio todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Minha eterna gratidão.*

*À minha irmã Marina Marques que, junto a meus pais, é a pessoa mais importante em minha vida. Seu apoio foi essencial. Minha eterna admiração.*

*À Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins pela confiança, orientação, constante apoio e incentivo ao meu crescimento científico e intelectual. E, acima de tudo, pela amizade.*

*À Profa. Dra. Ângela Regina Araújo que muito gentilmente nos forneceu sua coleção de fungos endofíticos para o presente estudo e seu grupo de pesquisa pela parceria.*

*Aos amigos e companheiros de laboratório Daniele Pivetta, Josiani Pereira, Maira Prearo, Fátima Camacho, Franco Zavarizi que sempre estiveram dispostos a ajudar e tornar o ambiente de trabalho um lugar agradável.*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química pela condição de desenvolvimento do trabalho.*

*A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.*

*Aos colegas e funcionários da seção de pós-graduação, que sempre se demonstraram solícitos e compreensivos ante as necessidades burocráticas que demandamos cotidianamente.*

*A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho.*

## EPÍGRAFE

*"Seja fiel aos seus valores, faça com amor e seja o melhor naquilo que faz, lembre-se você é o único responsável pelo seu êxito, coloque-se sempre em primeiro plano, ame o próximo, na mesma proporção que se ama, somos todos capazes de ser e fazer, não deixe que façam por você, erre e erre de novo, e através do seu erro ganhe experiência, não seja tão duro com você mesmo."*

***J.Cole***

## RESUMO

Os fungos filamentosos são conhecidos por sua notável capacidade de produção de enzimas, particularmente as de degradação de material vegetal. O campo de aplicações industriais destas enzimas tem crescido consideravelmente, especialmente em relação às celulases, que tem sido extensivamente estudadas visando à sacarificação da celulose para a obtenção de etanol de segunda geração. Os fungos endofíticos estão entre os potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal, são pouco estudados neste sentido e, uma vez que colonizam os tecidos vegetais, suas enzimas devem apresentar características interessantes do ponto de vista do ataque aos componentes da parede celular. Dentro deste contexto, o presente estudo teve por finalidade a prospecção de celulases, xilanases, pectinases e amilases entre fungos endofíticos, bem como estudos da produção e das características das enzimas. Inicialmente, 14 fungos endofíticos foram cultivados por fermentação estado sólido (FES) em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 m/m), durante 7 dias, a 28 °C. Nesta etapa, 8 fungos se destacaram na produção de celulases e foram posteriormente cultivados, em FES, em outras misturas de substratos lignocelulósicos. Os isolados *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 foram os mais versáteis em relação à produção das enzimas em diferentes meios, sendo selecionados para dar continuidade ao trabalho. A partir desta etapa foram focadas as produções de celulases e xilanases, visando à aplicação destas enzimas em trabalhos futuros envolvendo a sacarificação de materiais lignocelulósicos. O substrato selecionado foi composto por farelo de algodão e farelo de trigo e a influência do tempo de cultivo, da concentração de inóculo e da umidade inicial do substrato foram avaliadas, pelo cultivo em FES. Para quase todas as enzimas produzidas pelos dois fungos, o pico de produção ocorreu em 192h ou próximo a este período. Quanto à concentração de inóculo, considerou-se adequada para uma produção satisfatória das enzimas a quantidade de 6 discos miceliais. As máximas produções foram alcançadas quando o teor de umidade inicial do substrato foi fixado em torno de 60-65%. Os extratos enzimáticos obtidos pelo cultivo em FES, nas condições selecionadas, foram utilizados para a caracterização das enzimas, cujos pH e temperatura ótimos de atividade estiveram entre 4,5 - 6 e entre 60 - 75°C, respectivamente. As enzimas foram estáveis em ampla faixa de pH e, em relação à influência da temperatura na estabilidade, destacaram-se a  $\beta$ -glicosidase do isolado EJC04 (cerca de 70% de atividade a 70 °C) e a  $\beta$ -xilosidase de AM01 (cerca de 90% a 75 °C). As  $\beta$ -glicosidases e  $\beta$ -xilosidases de ambos os isolados mantiveram cerca de 75-80% de sua atividade na presença de glicose ou xilose, respectivamente, a 6 mmol/L. A presença de etanol estimulou a atividade da  $\beta$ -glicosidase de AM01 (cerca de 60% superior na presença de etanol a 15%) e a enzima de EJC04 passa a ter sua atividade reduzida em concentrações de etanol acima de 15%. Em relação à  $\beta$ -xilosidases, a enzima de AM01 teve sua atividade reduzida, apresentando cerca de 60% de atividade na presença do álcool a 5%. Já a  $\beta$ -xilosidase produzida por EJC04 teve sua atividade favorecida na presença de 5 a 10% de etanol, mantendo cerca de 100% de atividade quando o álcool foi empregado na concentração de 20%. Devido ao ótimo desempenho apresentado individualmente pelos isolados AM01 e EJC04 na produção das celulases, foi realizado um cultivo misto dos fungos. As produções obtidas foram comparáveis aos cultivos individuais, resultados que estimulam estudos futuros sobre a otimização da produção das enzimas por cultivo misto.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Celulases. Xilanases. Amilases. Pectinases. Resíduos lignocelulósicos. Fermentação em estado sólido. Caracterização enzimática.

## ABSTRACT

Filamentous fungi are known for their remarkable ability for enzymes production, particularly those for plant material degradation. The field of industrial applications of these enzymes has increased considerably, particularly regarding to cellulases which have been extensively studied for cellulose saccharification aiming the production of second generation ethanol. Endophytic fungi are among the potential producers of enzymes for plant material degradation. They are underexplored in this sense and, once they colonize the plant tissues. Their enzymes should present interesting features from the point of view of the attack to the cell wall components. In this context, the present study had as purpose the prospecting of cellulases, xylanases, pectinases and amylases among endophytic fungi, as well as studies of the enzymes production and characteristics. As an initial evaluation of enzymes production, 14 endophytic fungi were cultivated under solid state fermentation (SSF) in sugar cane bagasse and wheat bran (1:1 w/w), for 7 days, at 28 °C. In this phase, 8 fungi stood out and were subsequently cultivated by SSF, in other mixtures of lignocellulosic substrates. The isolates *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04 were the most versatile in relation to enzymes production on different substrates and were selected to continue the work. From this stage on the productions of cellulases and xylanases were focused, aiming the application of these enzymes in future studies involving the saccharification of lignocellulosic materials. The selected substrate was composed by cotton bran and wheat bran and the influence of cultivation time, concentration of inoculum and substrate initial moisture were evaluated, by FES. For almost all the enzymes produced by the two fungi, the peak of production occurred in 192h or close to this period. As the concentration of inoculum, it was considered appropriate for a satisfactory enzymes production the quantity of 6 mycelial discs. The highest productions were achieved when the substrate initial moisture was fixed at around 60-65%. The enzyme extracts obtained by cultivation on SSF, under the selected conditions, were used to characterize the enzymes, which optima pH and temperature of activity were between 4.5 - 6 and between 60 - 75 °C, respectively. The enzymes were stable over a wide pH range and in relation to the influence of temperature on the stability, stood out the  $\beta$ -glucosidase from the isolate EJC04 (about 70% of activity at 70 °C) and the  $\beta$ -xylosidase from AM01 (about 90% at 75 °C). The  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase from both isolates retained about 75-80% of their activity in the presence of glucose or xylose, respectively, at 6 mM. The presence of ethanol stimulated the activity of the  $\beta$ -glucosidase from AM01 (about 60% higher in the presence of ethanol at 15%) and the enzyme of EYC 04 shows a reduction on its activity at concentrations of ethanol above 15%. Regarding the  $\beta$ -xylosidases, that fom AM01 had its activity reduced, showing about 60% of activity in the presence ethanol at 5%. On the other hand, the  $\beta$ -xylosidase produced by EJC04 had its activity increased in the presence of 5 to 10% of ethanol, retaining about 100% of activity when the alcohol was used at a concentration of 20%. Due to the excellent performance individually shown by the isolates AM01 and EJC04 in the production of cellulases, we performed a mixed culture of these fungi. The enzymes productions obtained were comparable to those of individual cultivations, results which stimulate further studies on the optimization of the enzymes production by mixed culture.

Keywords: Endophytic fungi. Cellulases. Xylanases. Pectinases. Amylases. Lignocellulosic residues. Solid State Fermentation. Enzymes characterization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura da lignocelulose.....	18
<b>Figura 2</b>	Estrutura representativa da celulose e das interações inter e intracadeias.....	19
<b>Figura 3</b>	Esquema representativo da fibra de celulose.....	19
<b>Figura 4</b>	Principais componentes da hemicelulose de madeiras macias: glucomananas e xilanas.....	20
<b>Figura 5</b>	Estrutura de arabino 4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana presente em madeiras macias.....	21
<b>Figura 6</b>	Estrutura da <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana.....	21
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do sistema celulolítico.....	23
<b>Figura 8</b>	Complexo hemicelulolítico.....	24
<b>Figura 9</b>	Estrutura recentemente proposta para pectina.....	26
<b>Figura 10</b>	Degradação do amido por enzimas amilolíticas.....	27
<b>Figura 11</b>	Produção de celulases por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): Fpase.....	44
<b>Figura 12</b>	Produção de xilanases por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	48
<b>Figura 13</b>	Produção de Exo-PG e amilase por diferentes isolados fúngicos em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): Exo-PG; (B): Amilase.....	50
<b>Figura 14</b>	Produção de celulases pelos isolados fúngicos, em FES, utilizando como substratos (misturas a 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BC) e aveia (AV). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): Fpase.....	52

<b>Figura 15</b>	Produção de xilanases pelos isolados fúngicos, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BC) e aveia (AV). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	54
<b>Figura 16</b>	Produção de celulasas pelos isolados EJC04, SF021 e AM01 utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de algodão (FA) e bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de soja (FS). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.....	55
<b>Figura 17</b>	Produção de xilanases pelos isolados EJC04, SF021 e AM01 utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de algodão (FA) e bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de soja (FS). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	56
<b>Figura 18</b>	Influência do tempo de cultivo na produção de celulasas pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.....	59
<b>Figura 19</b>	Influência do tempo de cultivo na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	60
<b>Figura 20</b>	Influência da concentração de inóculo na produção de celulasas pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.....	63
<b>Figura 21</b>	Influência da concentração de inóculo na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	64
<b>Figura 22</b>	Influência do teor de umidade na produção de celulasas pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.....	66

<b>Figura 23</b>	Influência do teor de umidade na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B): $\beta$ -xilosidase.....	63
<b>Figura 24</b>	Influência do pH sobre a atividade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B): $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D): $\beta$ -xilosidase.....	69
<b>Figura 25</b>	Influência da temperatura sobre a atividade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B): $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D): $\beta$ -xilosidase.....	70
<b>Figura 26</b>	Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B): $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D): $\beta$ -xilosidase.....	72
<b>Figura 27</b>	Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B): $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D): $\beta$ -xilosidase.....	74
<b>Figura 28</b>	Efeito da concentração de açúcares nas atividades de $\beta$ -glicosidase (A) e $\beta$ -xilosidase (B) produzidas pelos isolados AM01 e EJC04.....	76
<b>Figura 29</b>	Efeito da concentração de etanol nas atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): $\beta$ -glicosidase, (B): $\beta$ -xilosidase.....	77
<b>Figura 30</b>	Produção de celulases e xilanases pelo cultivo misto dos isolados AM01 e EJC04 na combinação de substratos farelo de algodão e farelo de trigo (misturas 1:1 m/m). Uso de 3 (3:3) e 6 (6:6) discos de inóculo de cada fungo. (A): endoglucanase; (B): $\beta$ -glicosidase; (C): Fpase (D): xilanase; (E): $\beta$ -xilosidase.....	80
<b>Figura 31</b>	Colônia do isolado AM01 cultivado em meio de cultura PDA (potato agar dextrose). (a) frente; (b) verso.....	82
<b>Figura 32</b>	Colônia do isolado EJC04 cultivado em meio de cultura PDA (potato agar dextrose). (a) frente; (b) verso.....	83
<b>Figura 33</b>	Sequência de pares de bases obtidas do isolado fúngico AM01 a partir da análise da região ITS do rDNA.....	84

<b>Figura 34</b>	Sequência de pares de bases obtidas do isolado fúngico EJC04 a partir da análise da região ITS do rDNA.....	84
<b>Figura 35</b>	Dendograma filogenético da sequência do fungo AM01 baseado na análise Neighbor-joining da região ITSrDNA com base em 1000 replicatas de “bootstrap”. Os isolados <i>Xylaria hypoxylon</i> e <i>Sordaria fimicola</i> foram utilizados como “outgroup” .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fungos endofíticos utilizados e plantas hospedeiras a partir das quais foram obtidos.....	33
<b>Tabela 2</b>	Sequências encontradas com a maior similaridade de nucleotídeos com as sequencias analisadas dos isolados AM01 e EJC04 e porcentagens de similaridades recuperadas a partir do GenBank.....	85
<b>Tabela 3</b>	Produção de amilase e Exo-PG por isolados endofíticos (U/g), em FES, (misturas 1:1 m/m) de farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaç de cana de açúcar (BC) e aveia (AV).....	87
<b>Tabela 4</b>	Produção de amilase e Exo-PG pelos isolados AM01 e EJC04 (U/g), em FES, em farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT), na avaliação da influência do tempo de cultivo (horas) na produção das enzimas.....	87

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Composição da biomassa lignocelulósica.....	18
2.2 Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico.....	22
2.3 Outras enzimas de degradação de material vegetal.....	25
2.4 Fermentação em Estado Sólido.....	27
2.5 Fungos endofíticos como potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal.....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 Micro-organismos.....	33
4.2 Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas.....	33
4.3 Avaliação da influência de diferentes fontes de carbono na produção das enzimas.....	34
4.4 Avaliação da influência do tempo de cultivo na produção das enzimas.....	35
4.5 Avaliação da influência da concentração do inóculo na produção das enzimas.....	35
4.6 Avaliação da influência da umidade na produção das enzimas.....	35
4.7 Determinação das atividades enzimáticas.....	35
4.7.1 Endoglucanase.....	35
4.7.2 $\beta$ -glicosidase.....	36
4.7.3 FPase.....	37
4.7.4 Xilanase.....	37
4.7.5 $\beta$ -xilosidase.....	38
4.7.6 Pectinase (Exo-PG) .....	38
4.7.7. Amilase.....	38
4.8 Caracterização físico-química das enzimas.....	39
4.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	39
4.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas.....	39
4.9 Caracterização bioquímica das enzimas.....	40
4.9.1 Efeito de glicose e xilose sobre as atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase.....	40
4.9.2 Efeito do etanol sobre a atividade de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase.....	40
4.10 Cultivo misto.....	40
4.11 Identificação molecular.....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1 Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas.....	43
5.2 Avaliação da influência de diferentes fontes de carbono na produção das enzimas.....	51
5.2.1 Combinações de FA:FT e BC:AV.....	51
5.2.2 Combinações de BC:FA e BC:FS.....	54

5.3 Avaliação da influência do tempo de cultivo na produção das enzimas.....	58
5.4 Avaliação da influência da concentração do inóculo na produção das enzimas.....	62
5.5 Avaliação da influência da umidade na produção das enzimas.....	65
5.6 Caracterização físico-química das enzimas.....	68
5.6.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	68
5.6.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas.....	71
5.7 Caracterização bioquímica das enzimas.....	75
5.7.1 Efeito de glicose e xilose sobre as atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase.....	75
5.7.2 Efeito do etanol sobre a atividade de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase.....	77
5.8 Avaliação do cultivo misto de AM01 e EJC04.....	79
5.9 Identificação molecular.....	82
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização mundial de combustíveis fósseis tem gerado inúmeros impactos ambientais negativos e o etanol tem sido um dos combustíveis renováveis mais importantes para contribuir na redução desses impactos (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Além de ser um combustível proveniente de fontes renováveis, as emissões de gases e a toxicidade do etanol são mais baixas quando comparadas àquelas dos combustíveis obtidos a partir do petróleo (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). Um estudo feito por pesquisadores da Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) concluiu que o etanol de cana é capaz de reduzir em 73% as emissões de dióxido de carbono, o principal gás causador do efeito estufa na atmosfera, se usado em substituição à gasolina (LABORATÓRIO NACIONAL..., 2009).

Com o aumento da demanda por esse combustível de origem vegetal, somado ao apelo ambiental, as pesquisas científicas buscam aperfeiçoar e aumentar as possibilidades de produção. É nesse ponto que surge o etanol celulósico (LIMA; CAMARGO, 2009), obtido a partir da fermentação da glicose liberada pela hidrólise da celulose presente nos materiais lignocelulósicos.

Devido ao grande número de obstáculos a serem superados para a produção desse tipo de biocombustível, bem como para sua inserção no mercado, diversas pesquisas biotecnológicas têm sido realizadas abrangendo os três principais pilares de sua produção: a viabilidade da produção de biomassa, sem competir com culturas destinadas à alimentação, a eficiente desestruturação da parede celular vegetal e a hidrólise da celulose a baixo custo, e a otimização da fermentação dos açúcares liberados (UNITED STATES..., 2006).

A eficiente degradação da celulose em glicose representa um dos principais gargalos a serem superados para a viabilização da produção de etanol celulósico. Neste sentido, diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando intensamente em prol da viabilidade técnica e econômica do processo baseado na hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares da biomassa vegetal susceptíveis à fermentação etanólica (SIMS et al., 2010).

A hidrólise enzimática da celulose mostra-se vantajosa, em comparação com a hidrólise química, porque é conduzida em condições suaves de pH e temperatura, não acarreta problemas de corrosão nos equipamentos e não leva à formação de produtos colaterais (DUFF; MURRAY, 1996). Sendo assim, esta nova área de aplicação das

celulases estimula a prospecção destas enzimas a partir de micro-organismos, os quais geralmente produzem *pools* enzimáticos que podem ser obtidos com facilidade e baixo custo (MUSSATTO et al., 2007). A produção de um *pool* enzimático, onde estejam presentes outras enzimas de degradação de material vegetal, além das celulases, é interessante tendo em vista que tais enzimas podem auxiliar na desestruturação da parede celular, facilitando o acesso e hidrólise da celulose.

Neste contexto, é importante a exploração do potencial de produção destas enzimas por fungos filamentosos endofíticos que, além de pouco estudados neste sentido, provavelmente produzem enzimas com características interessantes do ponto de vista do acesso e ataque aos componentes da parede celular vegetal.

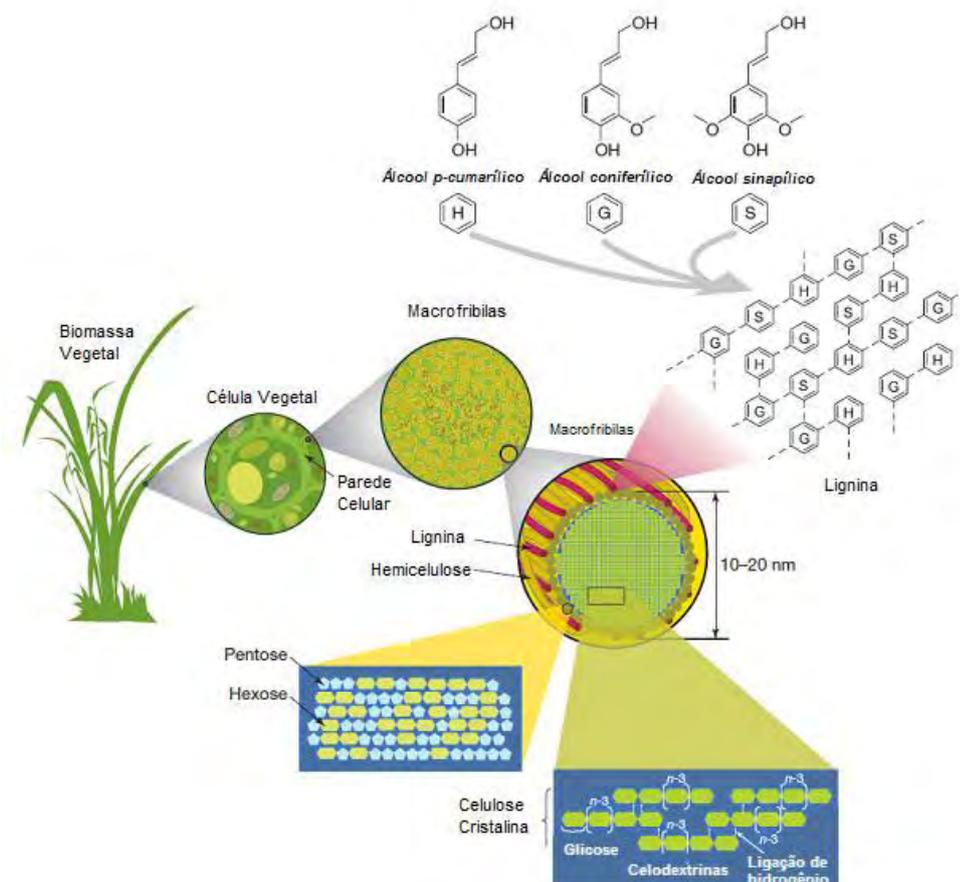
Considerando-se o exposto, o presente projeto teve por finalidade a prospecção de celulases, xilanases, pectinases e amilases entre gêneros de fungos endofíticos, bem como estudos da produção e das características das enzimas, visando à seleção dos melhores produtores para a utilização em projetos futuros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Composição da biomassa lignocelulósica

A lignocelulose (Figura 1) é o principal constituinte da parede celular vegetal, sendo composta por celulose (30-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-20%) (GIRIO et al., 2010), e representando mais de 90% do peso seco da célula vegetal.

**Figura 1** - Estrutura da lignocelulose.

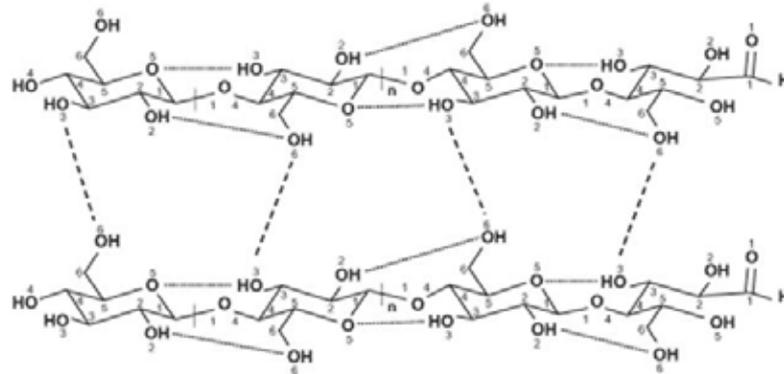


**Fonte:** Adaptado de Rubin, (2008).

A celulose (Figura 2), constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), apresentando um grau de polimerização de até 10.000 unidades. A estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação

das cadeias celulósicas em “microfibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (MATTHEWS et al. 2006).

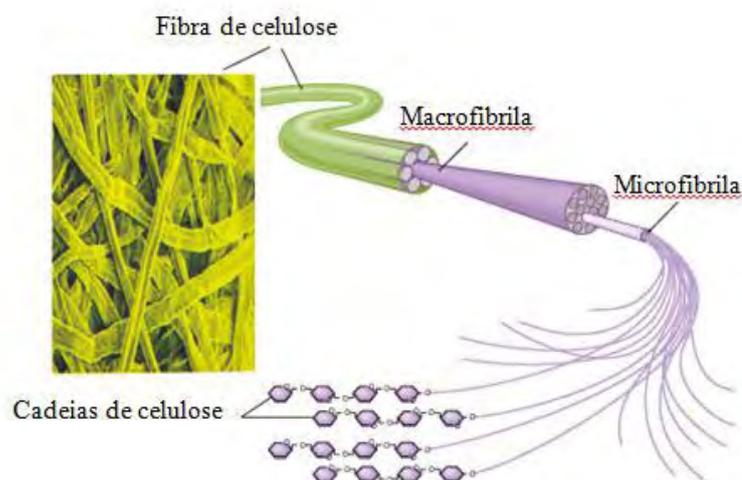
**Figura 2** - Estrutura representativa da celulose e das interações inter e intracadeias.



**Fonte:** Adaptado de Buselli; Otoni; Joshi, (2007).

Ao conjunto de microfibrilas denomina-se *macrofibrilas*, as quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal (Figura 3).

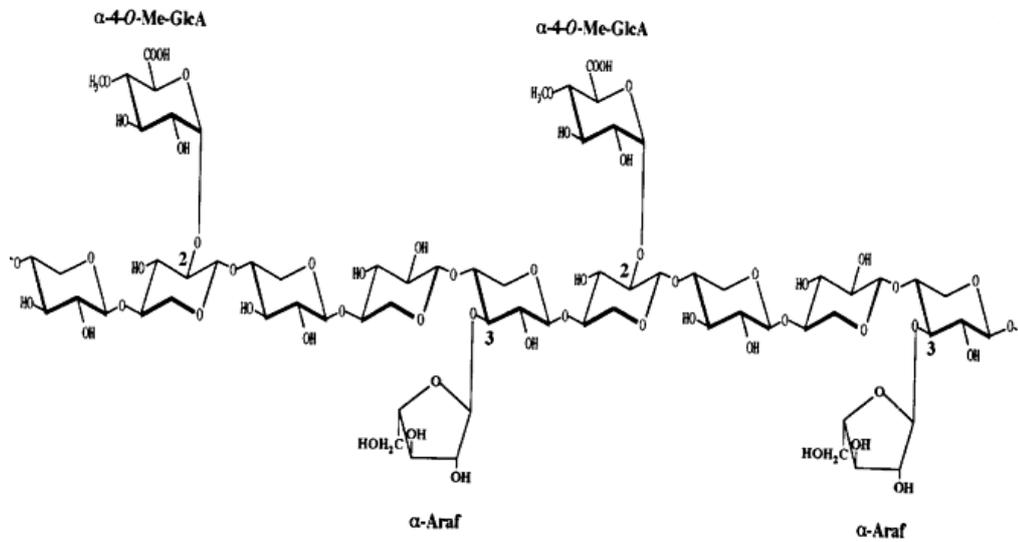
**Figura 3** - Esquema representativo da fibra de celulose.



**Fonte:** Adaptado de Jones e Bartlett, (2013).



**Figura 5** - Estrutura de arabino 4-*O*-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias.

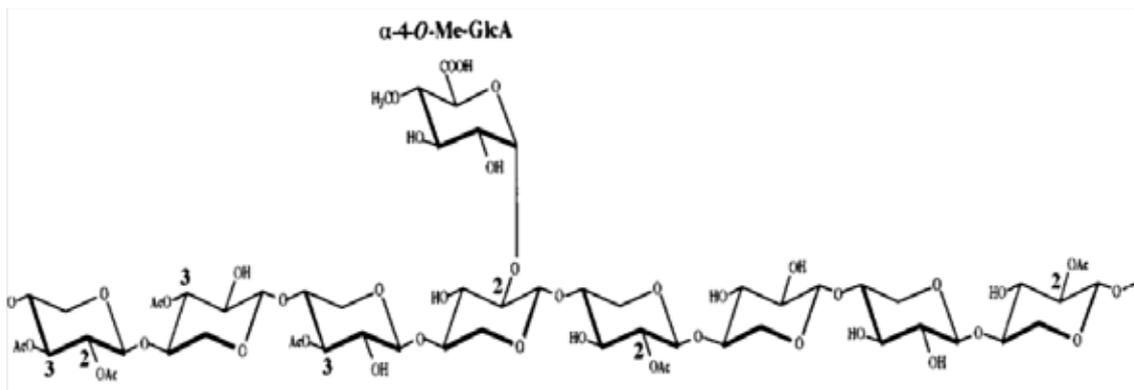


Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes.

α-araf: arabinofuranose; α-4-*O*-Me-GlcA: ácido α-4-*O*-metilglucurônico.

**Fonte:** Adaptado de Sunna; Antranikian, (1997).

**Figura 6** - Estrutura da *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana.



Os números representam os átomos de carbono em que existem grupos substituintes.

Ac: grupo acetil; α-4-*O*-Me-GlcA: ácido α-4-*O*-metilglucurônico.

**Fonte:** Adaptado de Sunna; Antranikian, (1997).

Por fim, a lignina (Figura 1), um polímero tridimensional formado por unidades fenilpropanóides, é encontrado entre as fibras de celulose e hemicelulose, como um material cimentante, proporcionando ao tecido da planta e as fibras individuais resistência à compressão e rigidez da parede celular, além de fornecer resistência a insetos e patógenos (DEL RIO et al., 2007). Outra função que merece destaque deste

polímero está na condição de ser hidrofóbica, pois com essa característica a lignina torna-se responsável por garantir transporte de água pelos tecidos celulares das plantas. A lignina é uma rede sintetizada através da copolimerização oxidativa de unidades de monômeros de álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico que são unidos através de ligações alquil-aril, alquil-alquil e aril-alquil, respectivamente. Devido ao excesso de anéis aromáticos e a predominância de ligações C-C e éter presentes na estrutura da lignina, esta se torna recalcitrante e, por ser uma camada protetora da hemicelulose e celulose, dificulta o acesso de enzimas a estas camadas mais internas (THEVENOT et al., 2010; JØRGENSEN et al., 2007).

## **2.2 Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico**

Nos últimos anos, as pesquisas científicas envolvendo celulasas tem focado principalmente a aplicação destas enzimas na sacarificação de materiais lignocelulósicos, visando à obtenção de glicose que possa ser convertida em etanol de segunda geração por micro-organismos fermentadores (TALEBNIA et al., 2010).

A sacarificação enzimática da celulose é geralmente descrita como um sistema de reação heterogêneo em que celulasas, em um ambiente aquoso, atuam sinergisticamente reagindo com a celulose insolúvel, macroscópica e estruturada, contendo regiões altamente organizadas (cristalinas) e regiões menos organizadas (amorfas). A fim de que as celulasas hidrolisem eficientemente os substratos celulósicos elas devem acessar as cadeias de celulose que estão organizadas sob a forma de microfibrilas insolúveis e envoltas em hemicelulose e lignina (MANSFIELD et al., 1999). Desta forma, vários pré-tratamentos físicos e/ou químicos têm sido propostos no intuito de desestruturar a lignocelulose e remover a lignina, facilitando o acesso das celulasas aos seus substratos (KRISHNA; CHOWDARY, 2005).

O complexo celulolítico microbiano é composto pelas enzimas (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988):

I. Endoglucanases ou carboximetilcelulasas (CMCases) (EG, endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, EC 3.2.1.4): atacam regiões de baixa cristalinidade (ou amorfas) das cadeias de celulose, liberando glicooligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização da celulose e fornecendo mais extremidades para a ação das exoglucanases;

II. Exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiodehidrolase, EC 3.2.1.91): hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras

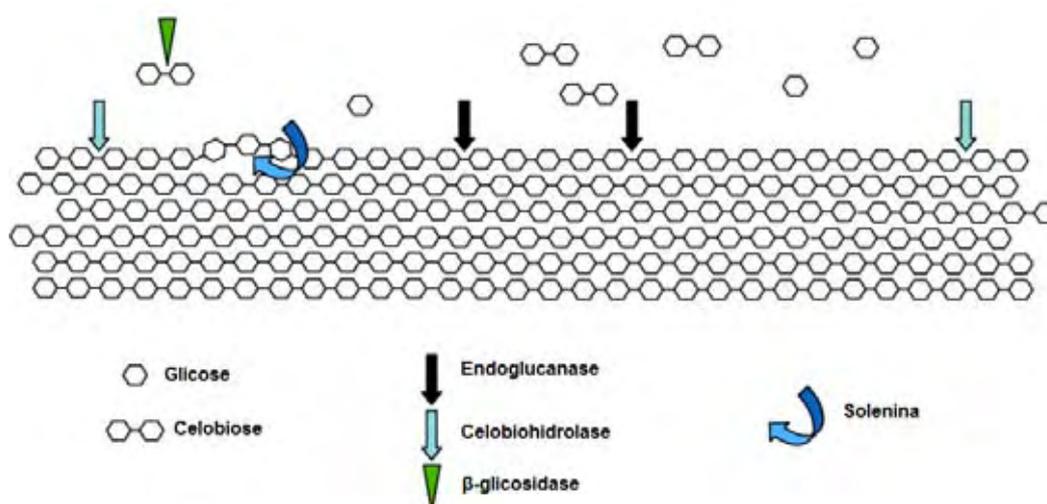
(CBH I) e não redutoras (CBH II) das cadeias de celulose, liberando unidades de celobiose;

III.  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21): hidrolisam celobiose, liberando glicose.

Por atuarem de forma sinérgica, a atividade das celulases sobre seus substratos é mais efetiva quando atuam coletivamente sobre o mesmo, em comparação com a ação das enzimas individuais. As endoglucanases quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; as celobiohidrolases são responsáveis pela ação nos terminais levando à formação de celobiose e  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose à glicose (OLSSON et al., 2005).

Além das celulases clássicas, ocorre também a ação de soleninas (Figura 7), proteínas semelhantes às expansinas de plantas, que regulam o inchaço da parede celular em células em crescimento. Expansinas foram primeiramente isoladas a partir de *Trichoderma reesei*, em 1992, e acredita-se que elas causem um afrouxamento nas ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose ou entre celulose e outros polissacarídeos da parede celular, sem que ocorra a hidrólise, causando um deslizamento das fibras de celulose ou expansão da parede celular (WHITNEY et al., 2000). Tem sido relatado que a ação de soleninas auxilia na degradação enzimática de celulose, uma vez que provoca um dano parcial, soltando a estrutura, semelhante ao causado por tratamento com ultra-sons, sem liberação de açúcares redutores (SALOHEIMO et al., 2002).

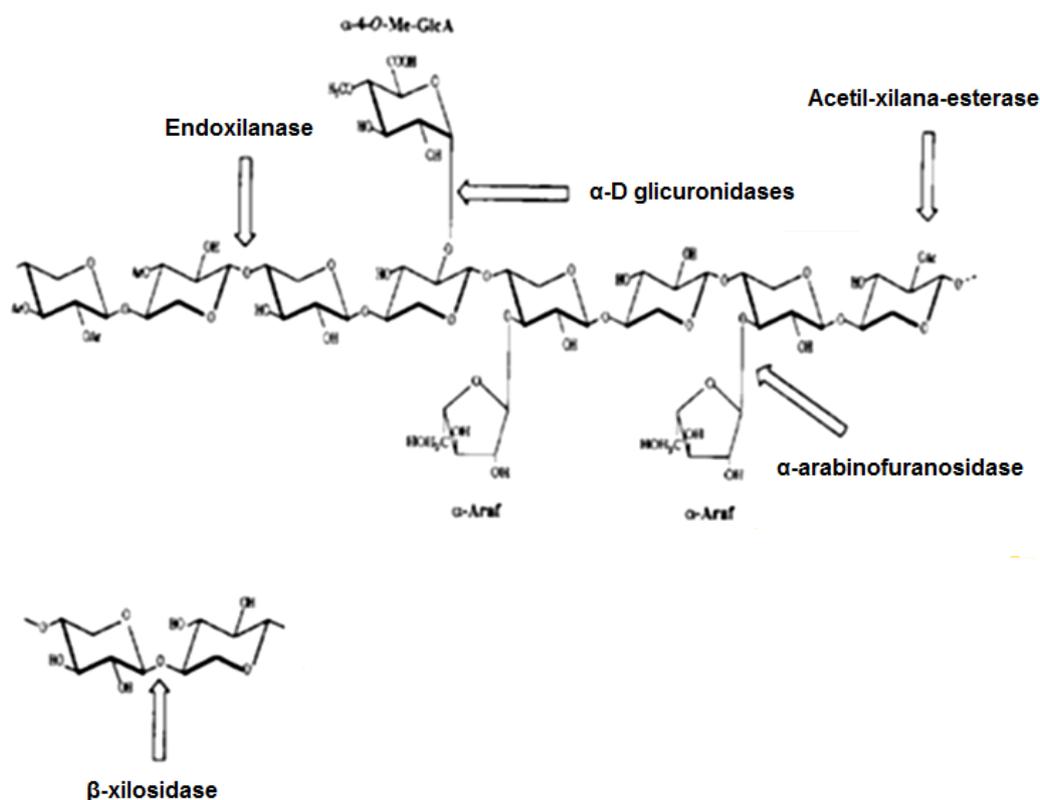
**Figura 7** - Representação esquemática do sistema celulolítico.



**Fonte:** Adaptado de Aro et al., (2005).

O sistema hemicelulolítico (Figura 8) requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea. Inclui, entre outras enzimas: 1) endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações glicosídicas internas aleatoriamente na cadeia de xilana; 2) 1,4- $\beta$ -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que “atacam” xilobiose e pequenos xilooligossacarídeos, a partir das extremidades não redutoras, liberando xilose; 3) endo-1,4- $\beta$ -D mananases (EC 3.2.1.78), que clivam ligações internas na cadeia de manana; 4) 1,4- $\beta$ -D-manosidases (EC 3.2.1.25), que clivam manooligossacarídeos em manose; 5) enzimas que removem os grupos substituintes laterais (ramificações), como  $\alpha$ -D-galactosidases (EC 3.2.1.22),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D glicuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (BEG et al., 2001).

**Figura 8** - Complexo hemicelulolítico.



**Fonte:** Adaptado de Sunna; Antranikian, (1997).

### 2.3 Outras enzimas de degradação de material vegetal

Como dito anteriormente, os micro-organismos com potencial para degradação de lignocelulose podem também ser capazes de produzir complexos enzimáticos contendo atividade de outras enzimas, tais como pectinase e amilase, quando cultivados sob condições adequadas. Tais enzimas despertam interesse, pois podem ser aplicadas em diversos processos industriais.

As pectinases (Figura 9) constituem um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO; PASTORE, 2007). A classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico (ALKORTA et al., 1998) pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (SILVA et al., 2005). Existem basicamente três tipos de pectinases: pectina esterases (desesterificante ou desmetoxilante), que removem os grupos metiléster; despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas, e protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (SAKAI et al., 1993).

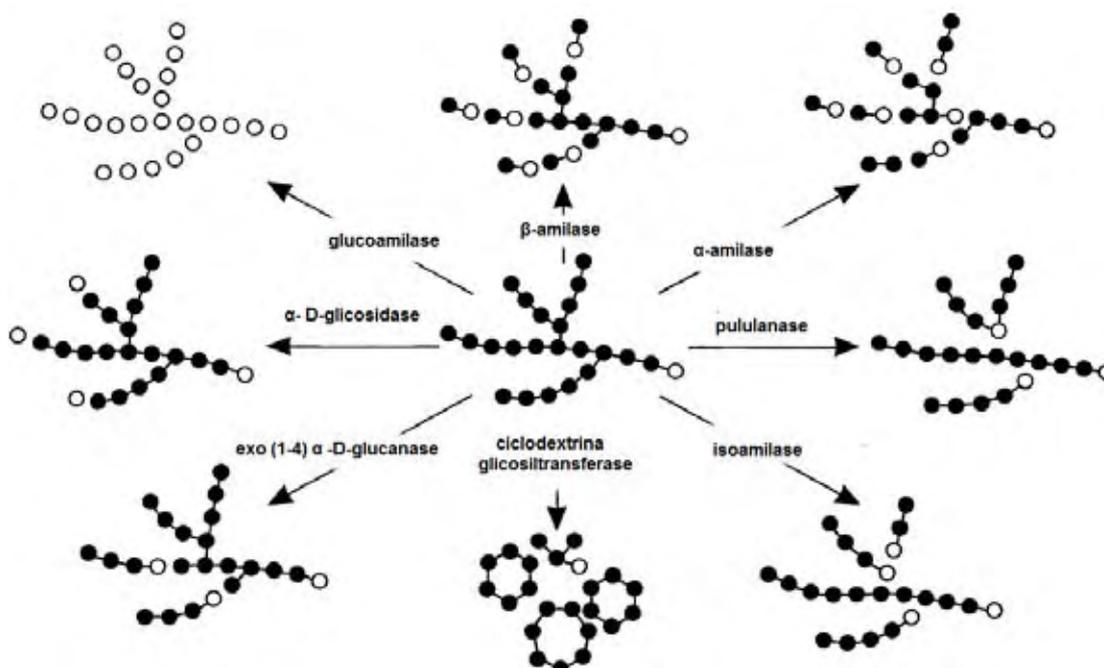


(EC 3.2.1.20) são enzimas deste grupo, sendo que a última pode quebrar as ligações  $\alpha$ -1,6, porém, mais lentamente;

III. Enzimas desramificantes: atuam exclusivamente nas ligações  $\alpha$ -1,6 e incluem isoamilase (EC 3.2.1.68), pululanase do tipo I (EC 3.2.1.41) e pululanase do tipo II ou amilopululanase (EC 3.2.1.42);

IV. Transferases: atuam nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e transferem parte da molécula a um aceptor glicosídico, com a formação de uma nova ligação glicosídica. As enzimas amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,4, enquanto que as enzimas de ramificação (EC 2.4.1.18) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,6. Essas enzimas realizam reações de transglicosilação inter ou intramolecular.

**Figura 10 - Degradação do amido por enzimas amilolíticas.**



Os círculos abertos representam os açúcares redutores e os pretos açúcares não redutores.

A clivagem ocorre nos açúcares redutores.

Fonte: Adaptado de Ismaya et al., (2012).

## 2.4 Fermentação em Estado Sólido

O alto custo de produção ainda é um dos principais obstáculos a serem superados para a viabilização da aplicação industrial de enzimas microbianas. No âmbito da

produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, por exemplo, as celulasas são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta de hidrólise enzimática (ZHUANG et al., 2007).

Uma das alternativas para a solução deste problema é o emprego da fermentação em estado sólido (FES), devido à possibilidade de uso de substratos lignocelulósicos de baixo custo e amplamente disponíveis, como resíduos agrícolas, agroindustriais, florestais e urbanos, que suportam o crescimento microbiano e estimulam a produção das enzimas (GAO et al., 2008; GRAMINHA et al., 2008; SUKUMARAN et al., 2009). No Brasil, estes resíduos e subprodutos agrícolas/agroindustriais são abundantes, o que possibilita a sua utilização em bioprocessos, especialmente no que se refere ao bagaço de cana-de-açúcar (LEITE et al., 2009), cuja produção anual é estimada em torno de 186 milhões de toneladas (SOCCOL et al., 2010). Parte do bagaço é utilizada pelas próprias usinas sucroalcooleiras, no aquecimento das caldeiras, restando ainda um excedente que representa importante fonte de lignocelulose para fins biotecnológicos.

A FES pode ser definida como o cultivo de micro-organismos em uma matriz insolúvel sólida, na presença de água suficiente para oferecer suporte ao crescimento microbiano. A matriz sólida pode ser utilizada pelo micro-organismo como substrato ou pode simplesmente servir como suporte inerte para o crescimento (neste último caso, ela deve ser embebida em uma solução nutriente) (PANDEY et al., 2000).

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da Biotecnologia. Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na tendência do uso da FES, para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de macromoléculas vegetais complexas (COUTO; SANROMÁN, 2005).

Segundo Doelle e colaboradores (1992), a FES apresenta diversas vantagens biotecnológicas tais como: os meios de cultivo são simples, geralmente subprodutos agrícolas que apresentam um alto teor dos nutrientes necessários; a baixa atividade da água impede as contaminações, especialmente bactérias e leveduras; a concentração natural do substrato permite utilizar reatores menores quando comparadas com as fermentações submersas; a aeração forçada é facilitada pela porosidade do suporte, o que permite uma alta transferência de ar e, por conseguinte de oxigênio; podem se empregar frequentemente esporos como inóculo nos processos de crescimentos de fungos, o que diminui os custos e as manipulações da propagação do inóculo; os processos de recuperação dos produtos são simplificados, sendo considerada uma tecnologia limpa.

O cultivo de fungos filamentosos por FES simula as condições do meio onde estes micro-organismos são naturalmente encontrados e, em geral, possibilita a obtenção de elevadas atividades de enzimas, incluindo as de degradação de material vegetal. (GERVAIS; MOLIN, 2003). Estes fungos são considerados os micro-organismos mais adaptados para cultivos por FES, pois suas hifas podem crescer na superfície das partículas e penetrar nos espaços intra-partículas, e assim, colonizar os substratos sólidos (SANTOS et al., 2004). De modo geral, a exigência de alta atividade de água para o desenvolvimento de bactérias faz com que as mesmas não se adaptem a processos de FES. Entretanto, relatos científicos mostram que algumas culturas bacterianas podem ser adaptadas a este tipo de processo (OROZCO, 2008).

A seleção de um substrato apropriado é um fator chave para o sucesso da FES. Além da composição adequada para a indução do produto desejado, o tamanho da partícula do substrato também deve ser levado em conta, pois é um fator com grande influência no processo. Partículas pequenas oferecem maior superfície de contato, possibilitando maior acesso do micro-organismo aos nutrientes, mas, dependendo do tipo de substrato e do teor de umidade, podem compactar-se, dificultando a aeração e a disponibilidade de oxigênio, bem como a dissipação de calor, limitando o crescimento microbiano. Já partículas grandes facilitam a aeração do meio, mas podem dificultar o acesso do microrganismo, limitando a superfície de contato do substrato e dificultando a transferência de massa. Outros parâmetros também devem ser avaliados e otimizados para a maior eficiência do processo, tais como umidade e pH iniciais, temperatura de incubação, aeração, quantidade de inóculo, suplementação com nutrientes, extração e purificação do produto (PANDEY et al., 1999).

É crescente a necessidade de criar um destino útil a resíduos agrícolas, agroindustriais e urbanos, evitando que estes simplesmente se acumulem no ambiente. Tais materiais apresentam como características importantes o baixo custo e a facilidade de obtenção em regiões próximas aos locais de processamento (THOMSEN, 2005). Com as inovações biotecnológicas em expansão, principalmente na área de tecnologia de enzimas e de fermentações, novos caminhos são constantemente descobertos para o aproveitamento destes resíduos em bioprocessos, destacando-se a produção de enzimas por FES e, nos últimos anos, a produção de biocombustíveis, especialmente o etanol (GRAMINHA et al., 2008; VIIKARI; VEHEMAANPERA, KOIVULA, 2012).

De acordo com o Himmel et al., (2009) existem diversos grupos de matérias-primas renováveis que são diferenciados pela sua origem, composição e estrutura. Dentre os

resíduos agrícolas e agroindustriais os mais comumente utilizados como substratos para produção de enzimas microbianas por FES estão à palha de milho, arroz e trigo, farelos de algodão, trigo e soja bem como bagaço de cana de açúcar entre outros.

Segundo Demirbas (2005), resíduos vegetais provenientes de culturas agrícolas contêm uma alta proporção de celulose e hemicelulose em seu conteúdo, o que justifica o uso deste material na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, ou ainda na bioconversão em metabólitos de alto valor agregado, como etanol.

## **2.5 Fungos endofíticos como potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal**

Os fungos destacam-se na biotecnologia pela capacidade de biodegradar resíduos naturais, o que se deve ao fato de um grande número deles produzirem enzimas como hemicelulases, celulases e/ou ligninases, amilases e/ou pectinases que desempenham um papel fundamental no ciclo do carbono, pela decomposição de resíduos vegetais. Além disso, a aplicação dessas enzimas em diversos processos do setor produtivo tem merecido destaque nas últimas décadas por atuarem como agentes que melhoram os processos industriais quanto à qualidade e eficiência do produto final, bem como por aspectos de ordem econômica e ambiental (BON et al., 2008).

A literatura científica dispõe de vários relatos sobre o uso de resíduos agroindustriais para a obtenção de enzimas fúngicas. Vários co-produtos agrícolas e agroindustriais são utilizados em processos de FES para a produção de celulases, xilanases, amilases e pectinases, entre outras enzimas.

O co-cultivo de fungos que apresentem semelhantes condições de cultivo e necessidades nutricionais proporciona vantagens econômicas devido à redução no custo geral de produção e pode ser empregado quando se trabalha com fungos que diferem na capacidade de produção de diferentes enzimas. As vantagens do cultivo misto podem ser ainda mais evidentes quando em FES, devido à colonização do substrato ser realizada de uma maneira mais eficaz por associações simbióticas (DWIVEDI et al., 2011).

Os fungos endofíticos representam um grupo de organismos muito diversificado e estão presentes na maioria (se não em todas) das plantas de ecossistemas naturais, sem provocar sintomas externos (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). São considerados uma excelente fonte de novos compostos naturais bioativos

(GUO et al., 2008) e, recentemente, tem despertado interesse por serem potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal (BORGES et al., 2009). Produzem hidrolases extracelulares como parte do seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro e/ou para obter nutrientes do solo (TAN; ZOU, 2001). Estas enzimas incluem, além das celulases, pectinases, esterases, lipases, proteases e xilanases (PETRINI et al., 1992), cujo campo de aplicações biotecnológicas/industriais vem se expandindo, o que estimula a prospecção a partir destes micro-organismos (MUSSATTO et al., 2007). Além disso, estudos envolvendo prospecção enzimática pelo cultivo dos fungos endofíticos por fermentação em estado sólido são pouco frequentes na literatura e abordam apenas a produção por alguns gêneros mais estudados (KAPOOR et al., 2010). Cabe ressaltar ainda que, uma vez que fungos endofíticos colonizam os tecidos vegetais, suas enzimas devem apresentar características interessantes quanto ao ataque aos componentes da parede celular vegetal, um aspecto importante do ponto de vista da aplicação na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

A maioria dos estudos sobre a prospecção de enzimas de degradação de material vegetal entre fungos endofíticos envolve a análise qualitativa, pelo cultivo em meios sólidos em placas e avaliação dos halos de hidrólise dos substratos (RAVIRAJA, 2006) ou análise quantitativa pelo cultivo em fermentação submersa (OKUNOWO et al., 2010). Estudos envolvendo prospecção pelo cultivo dos fungos por fermentação em estado sólido (FES) são menos frequentes e abordam a produção por alguns gêneros endofíticos mais estudados (KAPOOR et al., 2010).

### 3. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos gerais a prospecção de celulases, xilanases, amilases e pectinases entre 14 gêneros de fungos endofíticos pertencentes à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) deste Instituto, o estudo da influência de condições de cultivo na produção das enzimas e a caracterização físico-química/bioquímica das mesmas.

Como objetivos específicos do projeto destacam-se:

- ❖ cultivar os fungos por fermentação em estado sólido (FES) em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) como substratos, avaliar quantitativamente a produção de celulases (endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e Fpase), xilanase (endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase), pectinase (exo-PG) e amilase (dextrinizante) e selecionar os melhores produtores das enzimas;
- ❖ avaliar a influência de diferentes substratos, tempo de cultivo, concentração de inóculo e umidade inicial do substrato na produção das enzimas pelos fungos selecionados;
- ❖ caracterizar físico-quimicamente e bioquimicamente as enzimas produzidas pelo(s) fungo(s) selecionados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Foi utilizado uma linhagem de cada um dos gêneros de fungos endofíticos citados na Tabela 1, pertencentes à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ/UNESP.

**Tabela 1.** Fungos endofíticos utilizados e plantas hospedeiras a partir das quais foram obtidos.

Isolado	Gênero	Planta hospedeira
CSF 17	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Cassia spectabilis</i> (Cássia)
CSF 23	<i>Myrothecium gramineum</i>	<i>Cassia spectabilis</i> (Cássia)
CSY 02	<i>Colletotrichum crassipes</i>	<i>Casearia sylvestris</i> (Carvalinho)
CV 03	<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Cupania vernalis</i> (Camboatá-vermelho)
CV 04	<i>Ustilaginoidea sp.</i>	<i>Cupania vernalis</i> (Camboatá-vermelho)
PAJ 01	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Ocotea corymbosa</i> (Canela-do-cerrado)
PAJ 03	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Ocotea corymbosa</i> (Canela-do-cerrado)
SC 04	<i>Phomopsis stipata</i>	<i>Styrax camporum</i> (Benjoeiro)
SF 021	<i>Paecilomyces sp.</i>	<i>Styrax ferrugineus</i> (Limoeiro-do-mato)
TCF 01	<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Tocoyena formosa</i> (Jenipapo-bravo)
PM 02	<i>Coniella petrakii</i>	<i>Palicourea marcgravii</i> (Erva de rato)
AM01	<i>Botryosphaeria sp.</i>	<i>Alibertia macrophylla</i> (Marmelo)
XYA 04	<i>Ustilaginoidea sp.</i>	<i>Xylopiá aromática</i> (Pimenta-de-macaco)
EJC04	<i>Saccharicola sp.</i>	<i>Eugenia jambolana</i> (Jambolão)

**Fonte:** elaborado pelo autor.

### 4.2 Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas

Como avaliação inicial do potencial de produção das enzimas, os fungos foram cultivados por FES em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) previamente lavados e secos a 65 °C. O bagaço foi triturado em triturador e peneirado em peneira de 0,59 mm de malha para a remoção do excesso de pó. Segundo metodologia adaptada de Lotong e Suwanarit (1985) e Merheb-Dini et al., (2007) a FES foi realizada em sacos de polipropileno autoclaváveis de 16 x 22 cm. Cada saco continha em seu interior um espiral de fio de cobre encapado, para evitar a compactação do saco com o meio de cultivo, o que poderia prejudicar a aeração. Um pedaço de cano de PVC (poli cloreto de

vinila) (5 cm de altura x 2,2 cm de diâmetro) foi usado como gargalo, vedado com tampão de algodão. Cada saco de fermentação continha 5g de substrato e a umidade inicial foi padronizada em 70% (m/v), de acordo com o peso seco do substrato, utilizando-se solução nutriente composta por (g/L):  $(\text{NH})_4\text{SO}_4$  (3,5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5);  $\text{CaCl}_2$  (0,5) e Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0. O material foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Para cada cultivo em FES, os fungos foram pré-cultivados, a 28 °C, em placas de Petri contendo meio PDA (potato dextrose agar), por 4 a 7 dias até completo desenvolvimento micelial. Após este período, 5 discos de micélio de 8,0 mm de diâmetro foram utilizados como inóculo para cada saco de fermentação. Nesta triagem inicial, os fungos foram cultivados por FES durante 7 dias a 28 °C, quando então 50 mL de água destilada foram adicionados a cada saco de fermentação para a extração das enzimas. A mistura foi homogeneizada manualmente, transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL e mantida sob agitação de 150 rpm, por 1 hora, sob temperatura ambiente. Após este período, a mistura foi filtrada em tecido de nylon, o filtrado foi centrifugado a 10.000 x g, a 5 °C, por 15 minutos e as atividades enzimáticas foram quantificadas no sobrenadante. Os fungos que mais se destacaram na produção de celulases e xilanases foram selecionados para as etapas subsequentes do projeto. Todos os cultivos foram feitos em duplicata.

#### **4.3 Avaliação da influência de diferentes fontes de carbono na produção das enzimas**

Buscando-se potencializar a produção das enzimas, 8 fungos foram pré-selecionados e cultivados por FES em mais duas combinações de resíduos agroindustriais: farelo de algodão e farelo de trigo 1:1 (m/m) e bagaço de cana-de-açúcar e aveia 1:1 (m/m) cujas composições diversas podem induzir as enzimas de interesse. As FES foram conduzidas como descrito no item 4.2. Nesta etapa foram selecionados os 3 fungos que mais se destacaram na produção das enzimas e novamente foram cultivados em mais duas combinações de substratos: bagaço de cana-de-açúcar e farelo de algodão 1:1 (m/m) e bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja 1:1 (m/m), sendo as FES conduzidas também como descrito no item 4.2. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

#### **4.4 Avaliação da influência do tempo de cultivo na produção das enzimas**

Dois fungos foram selecionados na etapa anterior (item 4.3) e foram cultivados em FES como descrito no item 4.2, no substrato mais apropriado, durante 14 dias, a fim de se determinar o pico de produção das enzimas. A cada 48h, um saco de fermentação foi tomado para a extração das enzimas e avaliação quantitativa das atividades enzimáticas, como descrito no item 4.7.

#### **4.5 Avaliação da influência da concentração do inóculo na produção das enzimas**

Após a determinação do pico de produção das enzimas, os fungos selecionados foram cultivados em FES, como descrito no item 4.2, utilizando-se como inóculo 3, 6, 9 e 12 discos de micélio e a produção das enzimas foi avaliada.

#### **4.6 Avaliação da influência da umidade na produção das enzimas**

Após a escolha do tempo de cultivo e da concentração de inóculo mais favoráveis, a produção das enzimas pelos fungos selecionados foi avaliada utilizando-se substrato nas umidades iniciais de 60, 65, 70, 75 e 80%.

#### **4.7 Determinação das atividades enzimáticas**

##### **4.7.1 Endoglucanase**

A atividade de endoglucanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático e 0,9 mL de solução de substrato carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0). A reação foi incubada a 45 °C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose. O controle da reação foi feito adicionando-se 1,0 mL do reagente DNS a 0,9 mL de solução de substrato carboximetilcelulose e, por fim, adicionando-se 0,1 mL do extrato enzimático. As misturas (reação e controle) foram então submetidas a banho de ebulição, a 100 °C, por

10 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Adicionou-se 8,0 mL de água destilada, homogeneizou-se e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Como branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi utilizada a mistura de 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de DNS, sendo submetida à fervura e adição de água como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

Buscando a economia no processo, os volumes de reação foram posteriormente reduzidos para  $\frac{1}{4}$  dos citados acima, bem como os volumes utilizados para a curva analítica. Neste caso, a quantidade de água destilada adicionada para a realização da leitura da absorbância a 540 nm foi de 2,5 mL.

#### **4.7.2 $\beta$ -glicosidase**

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase, 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250  $\mu\text{L}$  de solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0) e 250  $\mu\text{L}$  de 4-nitrofenol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L) - PNPG, Sigma). A reação foi mantida a 45°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mol/L). O nitrofenol liberado foi quantificado a partir da curva analítica de p- nitrofenol (Sigma) por espectrofotometria a comprimento de onda de 410 nm. O tubo controle continha as mesmas quantidades de reagentes do tubo de reação, porém com a adição da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  antes do extrato enzimático, inativando a enzima não permitindo que houvesse reação com o substrato. O tubo branco utilizado para zerar o espectrofotômetro continha 250  $\mu\text{L}$  de solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0), 250  $\mu\text{L}$  de 4-nitrofenol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L) – PNPG, Sigma), 50  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,0 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 mol/L). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de nitrofenol por minuto de reação (FERNANDEZ; GOMES; SILVA, 2002).

### 4.7.3 FPase

A atividade de FPase foi determinada segundo Ghose (1987) com pequenas modificações, utilizando como substrato uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm) em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol/L, pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi mantida a 45°C, por 1 hora e paralisada pela adição de 1,5 mL do reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose. O tubo foi então submetido a banho de ebulição a 100 °C, por 5 minutos, e em seguida resfriado em banho de gelo. Foram adicionados 15 mL de água destilada e a absorbância foi lida a 540 nm. O tubo controle continha 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol/L, pH 5,0, 1,5 mL do reagente DNS e 0,5 mL de extrato enzimático, não sendo adicionado à tira de papel de filtro (substrato), conseqüentemente não ocorrendo reação. O tubo foi então submetido a banho de ebulição, adição de água e leitura da absorbância como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

A partir do experimento para avaliação da influência do tempo de cultivo na produção das enzimas, passou-se a determinar a atividade de FPase exatamente como descrito no protocolo de Ghose (1987).

### 4.7.4 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de endoglucanase (item 4.7.1), porém utilizando xilana Beechwood (Sigma X4252) (10,0 g/L, em solução tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0) como substrato e curva analítica de xilose. Uma unidade de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

#### 4.7.5 $\beta$ -xilosidase

A atividade de  $\beta$ -xilosidase foi avaliada por procedimento idêntico ao descrito para  $\beta$ -glicosidase (item 4.7.2), exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma).

#### 4.7.6 Pectinase (Exo-PG)

A atividade de pectinase foi avaliada em relação à exopoligalacturonase (Exo-PG), sendo determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de endoglucanase (item 4.7.1), porém utilizando pectina de citrus (10,0 g/L em solução tampão acetato pH 5,5, 0,2 mol/L) como substrato e curva analítica de ácido galacturônico. Uma unidade de exo-PG foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de ácido D-galacturônico por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

#### 4.7.7. Amilase

A atividade para amilase foi analisada pelo método dextrinizante, como descrito por Fuwa (1954) e por Ponsawasdi e Yagisawa (1987), com pequenas modificações. Foi utilizado 0,3 mL de solução de substrato (amido 5,0 g/L em solução tampão acetato, pH 5,0, 0,1 mol/L) e 0,1mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 45 °C, por 10 minutos, e paralisada com 4,0 mL de HCl 0,2 mol/L. Foi adicionado 0,5 mL de solução de iodo (KI 3,0 g/L e I<sub>2</sub> 0,3 g/L) e 10mL de água, e a leitura da absorbância foi feita a 700 nm. O tubo controle continha 0,3 mL de solução de substrato, 4,0 mL de HCl 0,2 mol/L, 0,5 mL da solução de iodo, 0,1mL de extrato enzimático e 10mL de água, não ocorrendo assim reação com o substrato visto que a enzima foi inativada pela adição do ácido clorídrico. O tubo branco utilizado para zerar o espectrofotômetro continha todo o conteúdo do tubo reacional sendo que o substrato, a solução de iodo e o extrato enzimático foram substituídos por quantidades equivalentes de água destilada. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

## **4.8 Caracterização físico-química das enzimas**

### **4.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas**

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram avaliadas utilizando-se soluções de substrato em uma ampla faixa de pH de (3,5 – 10,5).

Os tampões utilizados foram (VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1973): tampão McIlvaine (fosfato de sódio 0,2 mol/L; ácido cítrico 0,1 mol/L) para faixa de pH 3,5 – 8,0 e tampão glicina-hidróxido de sódio (glicina 0,2 mol/L; NaOH 0,2 mol/L) para faixa de pH 8,5 – 10,5 para determinação das atividades enzimáticas de celulasas. Para as atividades de xilanases utilizou-se tampão acetato (ácido acético 0,2 mol/L; acetato de sódio 0,2 mol/L) para faixa de pH 3,5 – 5,5, tampão tris (hidroximetil) aminometano (tris-maleato) (solução de tris ácido maléico (0,2 mol/L; NaOH 0,2 mol/L) para faixa de pH de 5,5 – 8,5 e tampão glicina-hidróxido de sódio (glicina 0,2 mol/L; NaOH 0,2 mol/L) para faixa de pH 9,0 – 10,5.

A temperatura ótima de atividade foi avaliada mantendo-se a mistura de reação em diferentes temperaturas (30 – 80 °C), no pH ótimo de atividade.

### **4.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas**

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, por 24 h, a temperatura ambiente, em soluções tampão como descritos no item 4.7.1, de diferentes valores de pH, e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por 1 h, a temperaturas de 30 a 80 °C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas.

## **4.9 Caracterização bioquímica das enzimas**

### **4.9.1 Efeito de glicose e xilose sobre as atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase**

As atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram quantificadas, como descrito nos itens 4.7.2 e 4.7.5, sob condições ótimas, na presença de glicose ou xilose, respectivamente, em concentrações de 2 a 12 mmol/L, a fim de se avaliar o efeito dos açúcares na atividade das enzimas.

### **4.9.2 Efeito do etanol sobre a atividade de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase**

A atividade das enzimas foi quantificada, como descrito nos item 4.7.2 e 4.7.5, na presença de etanol (0 a 25,0%).

## **4.10 Cultivo misto**

Os isolados AM01 e EJC04 foram cultivados em FES na combinação dos substratos lignocelulósicos farelo de algodão e farelo de trigo (FA:FT) 1:1 (m/m), no tempo de cultivo de 8 dias e a umidade inicial do substrato em 65%. Como se trata de um cultivo misto, foi avaliada a influência da quantidade de discos de inóculo de cada fungo (3 ou 6) e a quantidade de substrato em cada co-cultivo (5 ou 10g).

## **4.11 Identificação molecular**

A identificação dos isolados AM01 e EJC04 ocorreu por análise de sequências de DNA. Para o procedimento de extração do DNA foi utilizada a metodologia CTAB (acetrimetil brometo de amônio), modificada de Gerard et al., (2004). Inicialmente, os fungos foram cultivados em meio ágar-malte (7 dias de crescimento a 28 °C), com o objetivo de obter biomassa celular. Uma pequena quantidade do micélio fresco do

fungo foi coletada e adicionou-se o tampão de extração. O material foi incubado por 1,5h, em banho-maria a 65 °C. A seguir, uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada, na proporção 24:1 e o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, descartando-se a parte aquosa. Dando continuidade, o precipitado foi transferido para um novo microtubo, ao qual adicionou-se 300 µL de álcool isopropanol (gelado) e 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2, centrifugando-se a 10.000 rpm, por 10 min. Em seguida, todo o álcool foi removido cuidadosamente, para a adição da solução 70% de etanol gelado (-4 °C), centrifugando-se novamente a 10.000 rpm, por 10 minutos. O etanol foi então retirado por inversão única e o material foi mantido em repouso overnight. Para finalizar foram adicionados 30 µL de tampão TE (Tris 10Mm; EDTA 1 Mm) e o material foi estocado a -20 °C.

Após obter o DNA, a região ITS foi selecionada para ser amplificada utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990).

O protocolo de amplificação consiste em uma desnaturação inicial a 94 °C, por 3 min, seguida por 35 ciclos a 91 °C por 1min, 55 °C por 1min, 72 °C por 2min, finalizando com a fase de extensão final a 72 °C por 2 min. Em seguida, o material foi resfriado a uma temperatura de 10°C.

Para as reações de PCR foi utilizado um volume final de 25uL, contendo 1,5 uL de cada primer (10 uM), 4 uL de dNTPs (1,25 mM), 2 uL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,2 uL Taq polymerase (5 U/uL), e 2 uL de DNA diluído. Uma eletroforese em gel de agarose foi realizada para se confirmar que a reação ocorreu.

Para a purificação dos produtos de amplificação foi utilizado o Kit Promega: Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System. Após a purificação também foi realizada uma eletroforese em gel agarose, para confirmar a reação. O DNA obtido foi quantificado no Nanodrop e submetido a uma reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 10 uL utilizando BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) e então as amostras foram analisadas pelo sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram editadas pelo programa BIOEDIT v.7.0.9 (HALL, 1999) oferecido gratuitamente por Ibis BioSciences ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html)). A seqüência consenso foi comparada no banco de dados do NCBI, através do software integrado à página ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

As sequências encontradas apresentando maior similaridade de nucleotídeos com a sequência analisada foram recuperadas a partir da GenBank e alinhadas no programa Muscle v 3.8 (EDGAR, 2004).

As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se as sequências concatenadas da região ITS, em MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Para a construção da árvore filogenética utilizou-se o algoritmo Neighbor-joining e o parâmetro Kimura-2 para correção da distância gênica. Os “gaps” foram excluídos da análise e a robustez da árvore foi calculada através da análise de bootstrap, realizada com 1000 replicatas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas

Os substratos escolhidos para a avaliação inicial da produção das enzimas foram bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, uma vez que são conhecidos como bons indutores de várias enzimas de degradação de material vegetal.

Nesta triagem inicial, foi fixado um tempo de cultivo para a avaliação da produção das enzimas em FES, levando-se em conta o grande número de fungos avaliados (avaliar o perfil de produção de cada fungo ao longo de um período maior, retirando-se amostras em intervalos regulares, seria muito dispendioso). O tempo foi fixado em 7 dias, considerado um período médio adequado para o completo crescimento micelial e esporulação nas condições de cultivo empregadas (avaliação visual do crescimento dos fungos sobre os substratos). Além disso, objetivou-se selecionar um fungo que, além de bom produtor, propicie bons rendimentos enzimáticos em um menor período de tempo.

Todos os isolados utilizados no presente estudo foram capazes de crescer nos substratos citados. Isto é uma indicação que enzimas hidrolíticas foram secretadas para despolimerizar as fontes de carbono, liberando açúcares simples prontamente assimiláveis para o seu crescimento, uma vez que nenhuma fonte de carbono adicional foi utilizada.

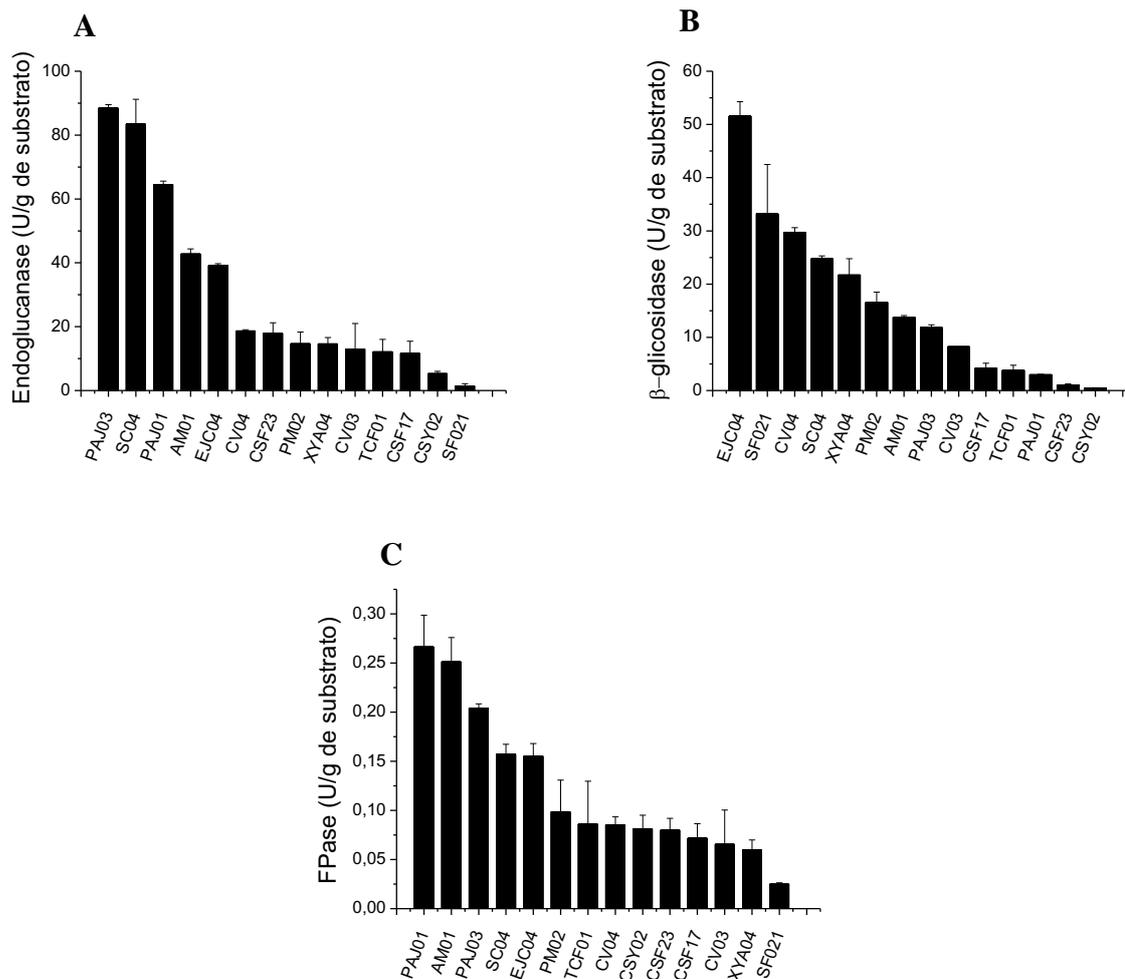
As produções enzimáticas obtidas nesta triagem inicial são apresentadas na Figura 11. Em todo o texto, o termo U/g refere-se à unidade de atividade enzimática/g de substrato seco.

Em relação à produção da enzima endoglucanase nesta etapa inicial (Figura 11A), as linhagens fúngicas que mais se destacaram foram PAJ 03 (88,51 U/g; 8,85 U/mL), SC 04 (83,44 U/g; 8,34 U/mL) e PAJ 01 (64,56 U/g; 6,54 U/mL), seguidos de AM01 (42,79 U/g; 4,27 U/mL) e EJC04 (39,22 U/g; 3,92 U/mL).

Bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono pode induzir uma atividade mais elevada de endoglucanases devido à presença de celulose amorfa (WHITAKER, 1994). Culturas de espécies de *Trichoderma* são fontes comumente usadas para produção de celulasas de uso industrial (OKUNOWO et al., 2010), porém, nestas condições de cultivo, a espécie utilizada não apresentou elevada produção dessas enzimas.

Foram obtidos bons níveis de atividade da enzima  $\beta$ - glicosidase (Figura 11B), com destaque para o isolado EJC04 (51,56 U/g), seguido de SF 021, CV 04 e SC 04 (33,19; 29,74; e 24,76 U/g, respectivamente).

**Figura 11-** Produção de celulases por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

O uso de farelo de trigo em combinação com outros substratos lignocelulósicos tem se mostrado muito eficiente na indução da produção de celulases por fungos, em FES. A presença de sais minerais e aminoácidos neste material possivelmente influem na produção de tais enzimas (BRIJWANI et al., 2010). Além disso, o farelo de trigo é um substrato mais acessível quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar (menos recalcitrante), dado o baixo teor de lignina (3,63%) (RIBEIRO et al., 2008), o que

favorece o crescimento do fungo. Outros nutrientes como proteínas (1,32%), carboidratos (69%), gorduras (1,9%), cálcio (0,05%), manganês (0,17%), potássio (0,45%), enxofre (0,12%) também proporcionam suporte para o crescimento inicial do fungo. Além disso, a porosidade deste resíduo possibilita a transferência de oxigênio (BAKRI et al.,2003), bem como proporciona uma grande área de superfície para o crescimento microbiano (BABU; SATYANARAYANA, 1995).

Já o bagaço de cana-de-açúcar, embora bem mais recalcitrante, pode também servir como fonte de nutrientes e como indutor das enzimas, além de contribuir para a aeração do meio. Sua composição química parcial está em torno de 47% de celulose, 27,5% de hemicelulose e 20,3 - 26,3% de lignina segundo Rabelo (2007).

No presente estudo foi escolhida a proporção de 1:1 (m/m) para a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo com base em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa.

El-Bondkly e El-Gendyo (2012) verificaram o efeito de diferentes proporções de bagaço de cana e sabugo de milho na produção de celulasas e concluíram que nas proporções de 1:1 e 2:1 (bagaço de cana e sabugo de milho) as produções de celulasas foram semelhantes, porém, com o aumento dessa proporção houve diminuição na produção do complexo de celulasas. Isto pode acontecer possivelmente devido a um aumento na proporção de substratos diminuir a aeração e a porosidade do meio afetando as taxas de crescimento e produção do micro-organismo (BIGELOW; WYMAN 2004).

Almeida e colaboradores (2011), com o objetivo de realizar uma triagem das atividades de celulasas e hemicelulasas em duas espécies do endofítico *Acremonium* sp. (*Acremonium zeae* EA0802 e *Acremonium* sp. EA0810) tanto por cultura submersa quanto por fermentação em estado sólido, obtiveram produções de endoglucanases abaixo das encontradas no presente trabalho. As maiores atividades de endoglucanase foram alcançadas com o fungo *Acremonium* sp. EA0810, (0,15 e 0,18 U/mL) em cultura submersa, utilizando palha de milho e bagaço de cana como fontes de carbono, respectivamente. Quando em fermentação estado sólido utilizando os mesmos substratos não foi detectada atividade de endoglucanases. Quanto à atividade de FPase, a maior atividade em fermentação estado sólido foi 0,14 U/mL pelo fungo *A. zeae* EA0802 com bagaço de cana como fonte de carbono. Maiores atividades de FPase são esperadas em fontes de carbono como bagaço de cana ou palha de milho devido à alta concentração de celulose nesses materiais. A maior produção de

$\beta$ -glicosidase pelo fungo *A. zeae* EA0802, por fermentação estado sólido utilizando-se bagaço de cana de açúcar (2,88 U/g), após 36 dias de cultivo, está abaixo das produções obtidas nos experimentos iniciais do presente trabalho, inclusive em relação a um exemplar do gênero *Acremonium* (isolado CSF 17), que apresentou uma produção enzimática de 4,22 U/g. Quando bagaço de cana é utilizado como única fonte de carbono geralmente menores produções são obtidas devido ao fato deste substrato ser muito recalcitrante. Os autores também reportaram a produção de xilanases, porém em quantidades inferiores a esta triagem inicial. O máximo alcançado foi 29,4 U/g por *A. zeae* EA0802 por fermentação estado sólido em bagaço de cana de açúcar.

Lee e colaboradores (2011) realizaram triagem de fungos que colonizavam palha de arroz em diferentes locais na Coreia. Os fungos inicialmente foram cultivados em FES em palha de arroz moída e as atividades de celulasas (FPase e endoglucanases) e xilanases foram avaliadas. Posteriormente, os dois melhores produtores enzimáticos foram selecionados para cultivo submerso e seleção do melhor meio de cultura. As maiores atividades de endoglucanase pelo cultivo em estado sólido foram obtidas com os fungos *Aspergillus ochraceus* KUC5204 (0,225 U/mL ou 1,125 U/g) e *Mucor circinelloides* KUC6014 (0,203 U/mL ou 1,015 U/g), sendo inferiores as obtidas no presente trabalho. Em relação à produção de FPase, valores pouco superiores foram obtidos em relação aos obtidos no presente trabalho (Figura 11C), pelos fungos *Trichoderma harzianum* 1 KUC5182 (0,222U/mL ou 1,11 U/g ) e *Aspergillus niger* KUC5183 (0,211 U/mL ou 1,055 U/g).

Três espécies endofíticas isoladas de aguapé (*Fusarium solani*, *Curvularia pallescens* e *Myrothecium roridum*) foram investigadas por Okunowo e colaboradores (2010) quanto à capacidade de produzir enzimas celulolíticas. *C. pallescens*, *Fusarium solani* e *M. roridum* produziram 0,84, 0,48 e 0,39 U/mL de endoglucanase respectivamente, em cultura submersa contendo serragem como fonte de carbono. Essas produções estão muito abaixo das produções dos fungos endofíticos do presente trabalho.

Ravindran e colaboradores (2010) buscaram a otimização da produção de exoglucanase, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase por *Chaetomium* sp. por fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos (caroço de algodão, farelo de arroz e bagaço de cana), em diferentes condições. Quando utilizado bagaço de cana de açúcar como substrato, foram observadas produções máximas de aproximadamente 2,5, 1,8 e 2,0 U/mL de endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e exoglucanase (estimada em termos de

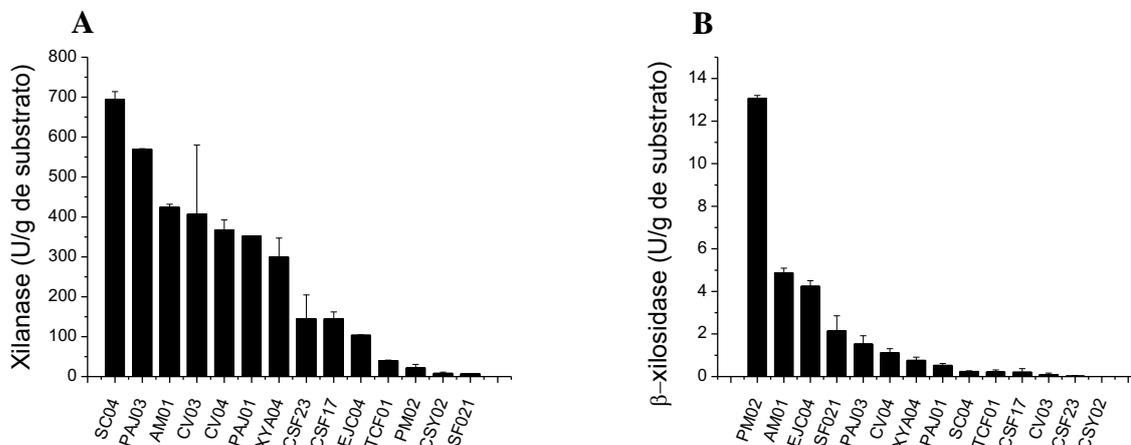
atividade de papel de filtro), respectivamente. Os fungos endofíticos avaliados no presente trabalho apresentaram produções enzimáticas superiores ao estudo realizado por Ravindran e colaboradores, exceto exoglucanase, cuja produção não foi observada para nenhum dos fungos.

A produção de enzimas extracelulares pelo fungo endofítico *Penicillium verruculosum* COKE4E, em FES utilizando-se fibra de palmeira submetida à pré-tratamento alcalino como única fonte de carbono, foi estudada por (KIM; KIM 2012). Os resultados mostraram que o fungo pode produzir 6,8 U/g de avicelase, 6,5 U/g de endoglucanase e 8,8 U/g de xilanase. Verifica-se que, mesmo a fibra recebendo pré-tratamento, as produções de endoglucanase e xilanase obtidas foram inferiores as máximas obtidas no presente estudo com os isolados PAJ 03 (88,51 U/g) e SC 04 (83,44 U/g), levando-se em consideração que o pré tratamento de substrato além de gerar custos produz resíduos.

Bons níveis de xilanase foram observados nos cultivos iniciais do presente trabalho (Figura 12A), alcançando-se produções de 694,33; 569,48; 424,62 e 407,23 U/g pelos isolados SC 04, PAJ 03, AM01 e CV 03. As xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, que é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses. A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal. Esse grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, dificultando a ação das celulasas durante o processo de sacarificação (FARINAS et al.,2008).

Foi detectada atividade da enzima  $\beta$ - xilosidase (Figura 12B), porém apenas três fungos se destacaram com produções de 13,07; 4,87 e 4,23 U/g sendo eles PM 02, AM01 e EJC04, respectivamente.

**Figura 12** - Produção de xilanases por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: elaborado pelo autor.

Soliman e colaboradores (2012) verificaram a produção de xilanase pelos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* por fermentação estado sólido em diversos substratos lignocelulósicos. As maiores produções foram obtidas em farelo de cevada, pelos fungos *A. niger* e *T. viride* (12,5 e 11,0 U/g de substrato, respectivamente). Quando cultivados em bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo as produções foram inferiores quando comparadas aos fungos endofíticos objetos da pesquisa, com valores de 2,0 U/g para *A. niger* em bagaço de cana ou farelo de trigo e 0,07 U/g e 5.8 U/g por *T. reesei*, em bagaço de cana ou farelo de trigo, respectivamente. Novamente observa-se que as produções no presente trabalho foram mais expressivas às obtidas pelos autores acima citados.

A produção de xilanase extracelular por *Aspergillus tubingensis* JP-1 em cultivo por fermentação em estado sólido foi estudada por Pandya e Gupte (2012). Avaliou-se a influência de diversos substratos lignocelulósicos (palha de trigo, farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana) e a maior produção obtida foi de 364 U/g, com o cultivo do fungo em farelo de trigo. Em bagaço de cana a produção foi inferior, apenas 17 U/g.

Mamma e colaboradores (2008) estudaram a produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas pelo fungos mesófilos *Aspergillus niger* BTL, *Fusarium oxysporum* F3, *Neurospora crassa* DSM 1129 e *Penicillium decumbens* em FES em cascas de laranja secas como única fonte de carbono. Nenhuma atividade de  $\beta$ -xilosidase foi detectada em extratos de culturas de *N. crassa* DSM 1129 e *P. decumbens*, enquanto *A. niger* BTL produziu aproximadamente 1,04 U/g,

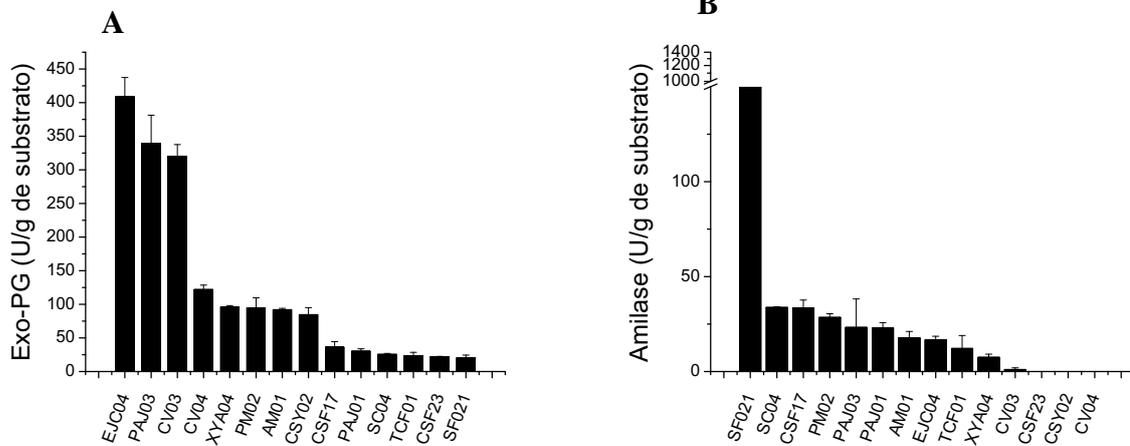
representando 10 vezes mais  $\beta$ -xilosidase que *F. oxysporum* F3 que produziu apenas 0,092 U/g. As produções de  $\beta$ -xilosidase encontradas pelo autor estão abaixo das produções encontradas para alguns fungos do presente trabalho.

Biswas e colaboradores (1987) estudaram a produção de xilanase e  $\beta$ -xilosidase por *Aspergillus ochraceus* durante o crescimento em materiais lignocelulósicos (palha de trigo, farelo de trigo e bagaço de cana) em FES. As melhores produções de  $\beta$ -xilosidase foram 8,1 U/mL e 5,1 U/mL obtidas em farelo de trigo e palha de trigo ou bagaço de cana respectivamente. Estes valores representam produções superiores às encontradas para os isolados endofíticos neste estudo.

Estudando a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, causador da podridão branca, cultivado por fermentação submersa em meio contendo bagaço de cana, Khalil (2002) obteve produções muito inferiores quando comparadas às obtidas pelos fungos endofíticos do presente trabalho. Para endoglucanase, o valor máximo de produção alcançado foi 0,576 U/mL e para  $\beta$ -glicosidase 0,046 U/mL, após 6 dias de cultivo. A produção de xilanase foi de 0,5153 U/mL após 3 dias e a de  $\beta$ -xilosidase 0,0047 U/mL após 9 dias de cultivo.

Foram também avaliadas, no presente trabalho, as produções de amilase e pectinase (exopoligalacturonase – Exo-PG). Quanto à Exo-PG (Figura 13A), as maiores produções foram dos isolados EJC04 (436,45 U/g), PAJ 03 (362,74 U/g) e CV 03 (342,17 U/g). O isolado SF 021 demonstrou uma significativa produção de amilase (Figura 13B) atingindo um valor de 997,65 U/g, seguido por produções de 33,78; 33,51 e 28,51U/g referentes aos isolados SC 04, CSF 17 e PM 02 respectivamente.

**Figura 13** - Produção de Exo-PG e amilase por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m). (A): Exo-PG; (B): Amilase



**Fonte:** elaborado pelo autor.

A produção de pectinase por fermentação em estado sólido, em uma mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1), por *Penicillium viridicatum* RFC3 foi estudada por Silva e colaboradores (2005). Os resultados para exo-PG mostraram uma produção máxima de 71,2 U/g, com umidade de 80% para o substrato, após 14 dias de cultivo. No presente trabalho, o fungo endofítico AM01, produziu 98,19 U/g na metade do tempo de cultivo.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente para uma utilização mais eficiente dos diferentes resíduos agroindustriais, incluindo bagaço de cana, farelo de trigo, palha de trigo, palha de centeio e folha de sabugo de milho, para a produção de amilases (BALKAN; ERTAN 2007).

Rosés e Guerra (2009) otimizaram a produção de amilase total por *Aspergillus niger*, em FES, utilizando bagaço de cana como material de suporte sólido. A produção máxima obtida na condição otimizada foi de 457,82 U/g de substrato.

Guimarães e colaboradores (2006) realizaram uma triagem de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. Quarenta isolados foram examinados quanto à sua capacidade para produzir xilanase, glicose oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase. Os cultivos foram realizados por cultura submersa e para produção de amilases foi utilizado o meio de CP (Carvalho Peixoto) contendo 1% de amido. Os fungos foram cultivados durante 120 h. Entre os isolados, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis* e *Aspergillus phoenicis* foram os melhores produtores de amilase com produções de 130, 110,8,

118,8 U/mL. O fungo SF 021 do presente estudo pertencente ao mesmo gênero (*Paecilomyces*) de um dos fungos objeto de estudo Guimarães e colaboradores (2006) apresentou produção de amilase semelhante (96,91 U/mL).

Não foi detectada produção da enzima avicelase para os fungos analisados nesta triagem inicial.

## **5.2 Avaliação da influência de diferentes fontes de carbono na produção das enzimas**

Após a triagem inicial, os 8 isolados melhores produtores de celulasas (PAJ 01, SC 04, SF 021, PAJ 03, CV 04, XYA 04, AM01, EJC04) foram selecionados para dar continuidade ao trabalho. A seleção foi feita com base na produção destas enzimas, pois elas são as que mais têm se destacado nos últimos anos entre as hidrolases de degradação de material vegetal, especialmente por seu potencial de aplicação na sacarificação de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, um tema que pretende-se abordar em trabalhos futuros.

Os isolados selecionados foram cultivados em diferentes misturas de resíduos lignocelulósicos a fim de se obter maiores rendimentos na produção das celulasas. Entretanto, nesta etapa, a produção das demais enzimas também foi avaliada.

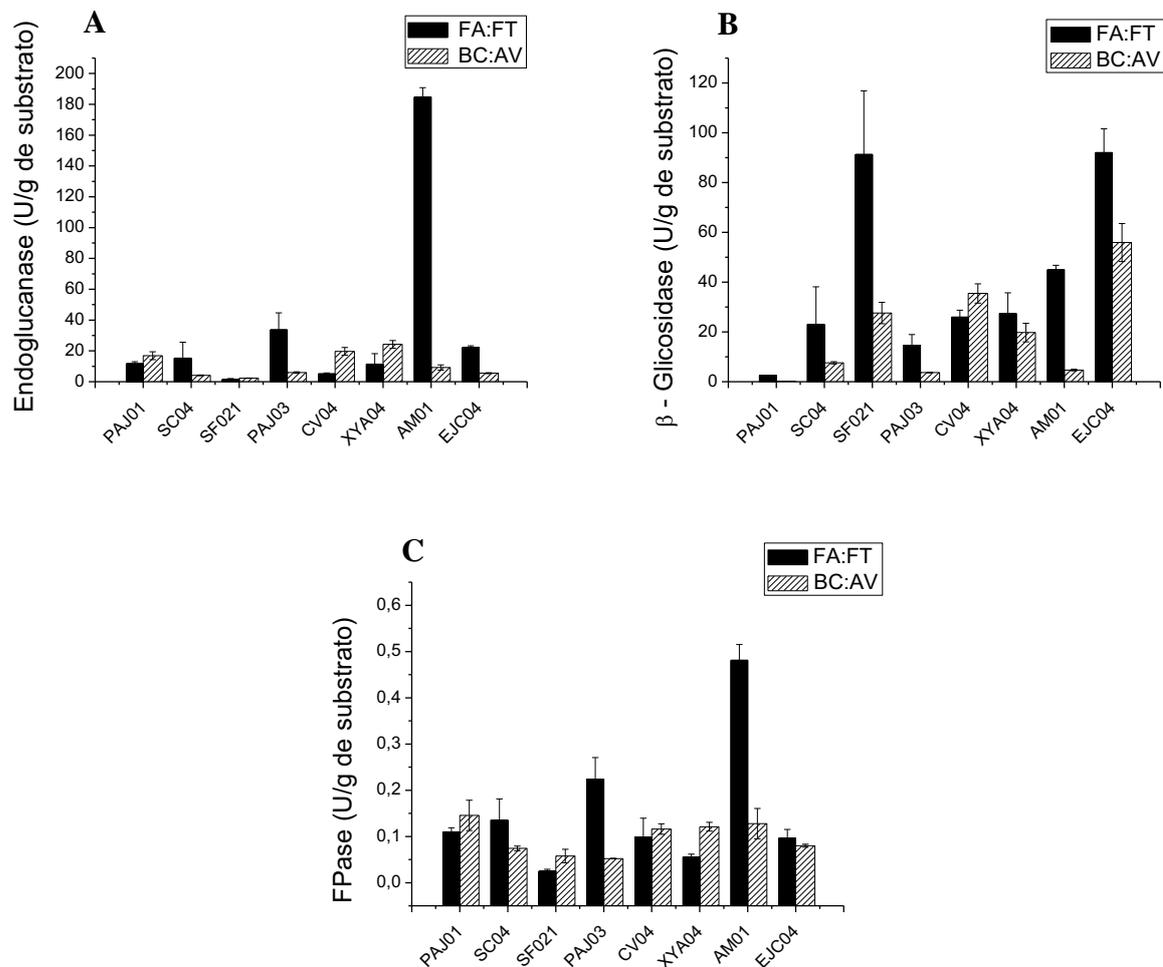
### **5.2.1 Combinações de FA:FT e BC:AV**

Foram realizados cultivos em duas combinações de substratos, na proporção 1:1 (m/m): farelo algodão e farelo de trigo (FA:FT); bagaço de cana-de-açúcar e aveia (BC:AV). As condições iniciais de cultivo foram mantidas. São apresentados abaixo os resultados referentes às produções de celulasas e xilanasas, enzimas que mais se destacam na sacarificação de materiais lignocelulósicos, entre as estudadas no presente trabalho. As produções de amilases e Exo-PG encontram-se no Apêndice (Tabela 3).

O cultivo contendo a mistura FA e FT melhorou a produção de endoglucanase apenas para o fungo AM01, que passou a produzir 184,74 U/g, o que representa um aumento de mais de 4 vezes na produção da enzima, em relação ao cultivo inicial na

mistura BC e FT (Figura 14A). Segundo Prado e Martins (1999), o farelo de algodão é composto em média por 25,27% de celulose, 25,40% de hemicelulose e 6,37 % de lignina. Porém a presença de bagaço de cana ao invés de farelo de algodão propiciou maiores produções de endoglucanases para todos os fungos, exceto AM01. A produção de endoglucanase pelos isolados foi bem menor quando estes foram cultivados em BC e AV, exceto para SF 021. Porém, a produção por este isolado continuou em nível baixo (2,31 U/g). Pode-se inferir, a partir destes resultados, que a aveia não foi um bom indutor destas enzimas para estes isolados em comparação com os farelos.

**Figura 14** - Produção de celulases pelos isolados fúngicos, em FES, utilizando como substratos (misturas a 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BC) e aveia (AV). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.



Fonte: elaborado pelo autor.

De modo geral, a mistura FA:FT demonstrou ser uma excelente indutora da produção de  $\beta$ -glicosidases (Figura 14B). Neste meio destacaram-se os isolados

AM01, SF 021 e EJC04, cujas respectivas produções 45,95, 91,29 e 92,04 U/g foram cerca de 3, 2,7 e 1,8 vezes maiores que as observadas nos primeiros cultivos em BC e FT, respectivamente. A principal função das  $\beta$ -glicosidasases, comumente chamada de celobiase, é a hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases (NADALINI, 1997). Por prevenir o acúmulo do dissacarídeo, a  $\beta$ -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise da celulose, desempenhando assim um efeito crucial na degradação enzimática deste polímero (SENGUPTA et al., 1991). Sendo assim, elevadas produções de  $\beta$ -glicosidasases fracamente inibidas pelos seus produtos são essenciais na hidrólise do material lignocelulósico.

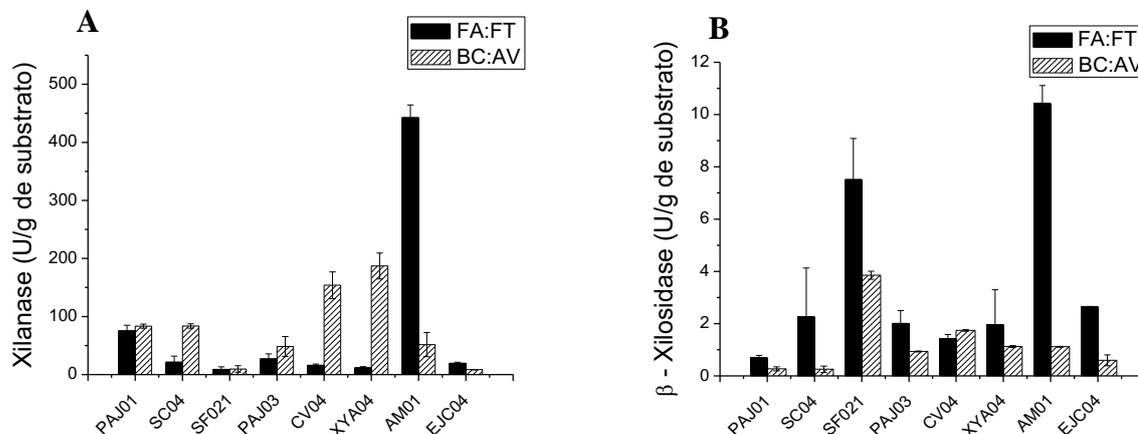
O cultivos em FA:FT e BC:AV não aumentaram as produções de Fpase em relação ao cultivo inicial com BC:FT (Figura 14C). Apenas o isolado AM01 teve sua produção 2 vezes maior quando cultivado em FA:FT (0,481 U/g) em relação ao cultivo inicial (0,251 U/g). Este fato é coerente, uma vez que as produções de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foram favorecidas neste meio de cultivo. Houve uma dificuldade de padronização da atividade de FPase em relação à proposta na literatura por Ghose (1987), pois as enzimas avaliadas no presente trabalho não levaram à liberação dos 2mg de glicose preconizados pelo método.

Novamente não foi detectada produção da enzima avicelase para os fungos estudados nestas condições de cultivos.

Em relação à produção de xilanase, o cultivo em FA:FT proporcionou produções muito menores quanto comparado com o cultivo em BC:FT, exceto para os isolados SF 021 e AM01, cujas produções mantiveram-se no mesmo nível. O mesmo pode ser observado para o cultivo em BC:AV, substratos que não favoreceram a produção da enzima (Figura 15A).

A combinação de substratos FA:FT foi melhor indutora de  $\beta$ -xilosidase quando comparada com BC:AV, para todos os fungos avaliados no presente estudo. As maiores produções foram de 10,42, 7,50 e 2,64 U/g de substrato pelos fungos AM01, SF 021 e EJC04, respectivamente. Entretanto estas produções, assim como as produções de celulasas e xilanases, não foram superiores aquelas obtidas no cultivo inicial em BC:FT.

**Figura 15** - Produção de xilanases pelos isolados fúngicos, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BC) e aveia (AV). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



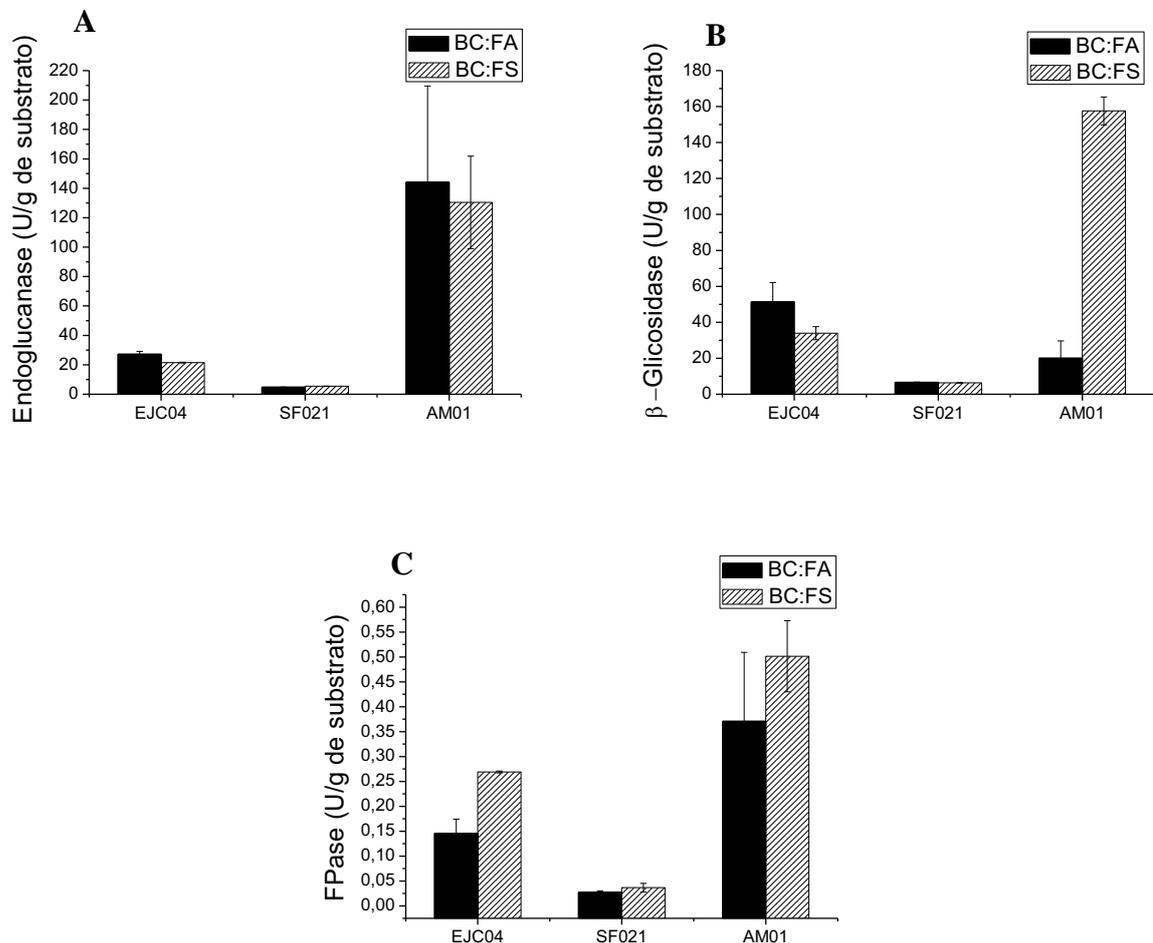
Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.2.2 Combinações de BC:FA e BC:FS

Foram selecionados 3 fungos que mais se destacaram na produção de celulasas nos cultivos anteriores (item 5.2.1): EJC04, SF 021 e AM01. Estes fungos foram então cultivados em duas combinações de substratos: bagaço de cana de açúcar e farelo de algodão (BC:FA) e bagaço de cana de açúcar e farelo de soja (BC:FS) (1:1 m/m). As condições de cultivo permaneceram as mesmas dos cultivos anteriores e as produções enzimáticas são apresentadas nas Figuras 16 e 17.

Houve um aumento na produção de endoglucanase pelo isolado SF 021, em relação aos cultivos anteriores, porém a produção da enzima por este fungo ainda é muito baixa (Figura 16A). Em relação ao isolado EJC04, a produção da enzima nestes meios foi comparável à obtida pelos cultivos em BC:FT e FA:FT. Destaca-se a produção de endoglucanase pelo isolado AM01, no cultivo em BC:FA (144,07U/g), porém não superando sua produção em FA:FT (184,74 U/g).

**Figura 16** - Produção de celulases pelos isolados EJC04, SF021 e AM01 utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de algodão (FA) e bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de soja (FS). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

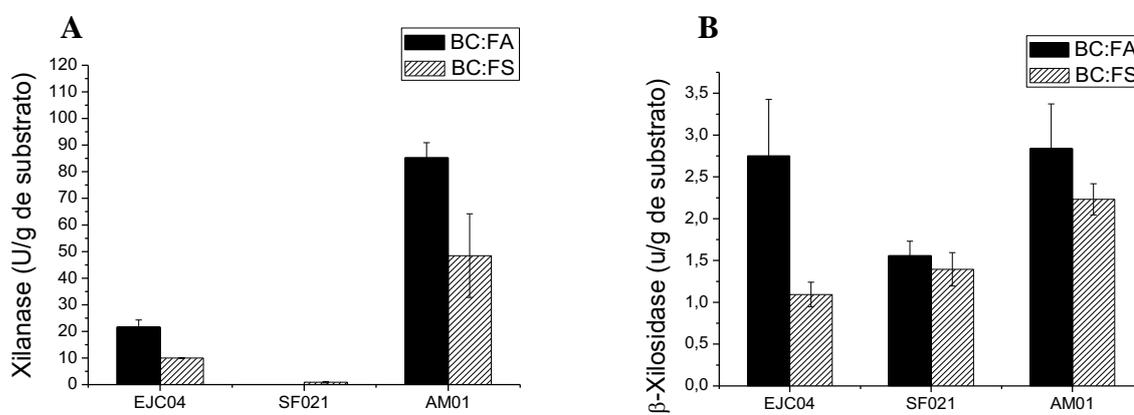
Eles tinham pedido pra rever alguma coisa em relação aos desvios grandes da figura A

Quanto à  $\beta$ -glicosidase, os novos meios avaliados não levaram a aumento na produção da enzima pelo SF 021 (Figura 16B). A produção da enzima pelo isolado EJC04 também foi inferior em relação às obtidas nos outros meios avaliados. Novamente destaca-se o isolado AM01, com produção de 157,57 U/g em BC:FS, sendo esta a maior produção da enzima em todos os cultivos.

Foi observada uma maior produção de FPase no cultivo em BC:FS em comparação aos cultivos em BC:FA (Figura 16C). Entretanto, esse aumento não foi significativo quando comparado aos cultivos anteriores. A maior produção foi observada para o cultivo do fungo AM01 com 0,501 U/g em BC:FS.

Em relação às produções de xilanase e  $\beta$ -xilosidase, ambas foram mais elevadas no cultivo de BC:FA em relação a BC:FS, exceto para o isolado SF 021 (Figura 17A). As maiores produções destas enzimas foram observadas para o fungo AM01 (85,25 U/g e 2,83 U/g, respectivamente). Ressaltando que, assim como para celulases, essas produções não superaram as produções alcançadas em cultivos anteriores.

**Figura 17** - Produção de xilanases pelos isolados EJC04, SF021 e AM01 utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de algodão (FA) e bagaço de cana de açúcar (BC) e farelo de soja (FS). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

O farelo de soja possui aproximadamente em sua constituição 34,59% de celulose, 18,13% de hemicelulose e 9,78% de lignina (RODRIGUEZ et al., 2011). Tanto o farelo de soja quanto o farelo de trigo são largamente utilizados como substratos na fermentação em estado sólido, por seu alto teor nutricional e suas propriedades texturais (HU et al., 2011) e são conhecidos como bons indutores de  $\beta$ -glicosidases (LEITE et al., 2008).

Karmakar e Ray (2010) verificaram a produção de endoglucanase por *Rhizopus oryzae* PR7 a partir de fermentações submersa e em estado sólido em vários resíduos agrícolas como substratos. As produções enzimáticas em FES em bagaço de cana de açúcar e semente de algodão foram respectivamente 1,8 e 0,3 U/mL, valores inferiores aos observados no presente trabalho.

Leite e colaboradores (2008) cultivaram o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 e o mesofílico *Aureobasidium pullulans* ER-16 por fermentação em estado sólido para produção de  $\beta$ -glucosidase em diferentes materiais lignocelulósicos. Dentre

os substratos avaliados, o farelo de trigo foi o mais adequado para produção de  $\beta$ -glucosidase para ambos os micro-organismos. *T. aurantiacus* exibiu máxima produção enzimática (7,0 U/mL ou 70,0 U/g) entre 48 e 72 horas de cultivo e *A. pullulans* (1,3 U/mL ou 13,0 U/g) em 120 horas. Estas produções estão abaixo das produções máximas encontradas para os gêneros endofíticos estudados no presente trabalho.

A produção de celulasas varia entre os micro-organismos e é influenciada pelo substrato (fonte de carbono) utilizado no cultivo, entre outros fatores, o que dificulta a comparação de dados (LAKSHMIKANT; MATHUR, 1990). Vários estudos sobre produção de enzimas celulolíticas utilizando diferentes substratos e micro-organismos são encontrados na literatura e apresentam rendimentos diferentes.

Rodriguez e colaboradores (2011) avaliaram a produção de celulasas (endoglucanase e celulase total) pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido em diferentes substratos. Foram avaliados bagaço de cana de açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e misturas entre estes. Observou-se expressivo aumento nas atividades enzimáticas das duas enzimas à medida que se aumentou a proporção de farelos no substrato, em comparação à fermentação com bagaço de cana apenas. Podemos inferir que isso se deve à maior recalcitrância do bagaço em comparação aos farelos. Provavelmente, quando o micro-organismo é cultivado apenas em bagaço, é mais difícil acessá-lo como substrato para crescimento e indução das enzimas. A presença do farelo provavelmente representa um substrato que inicialmente suporta e favorece o crescimento, além de induzir a produção das enzimas.

O valor máximo de atividade de celulase total obtido por Rodriguez e colaboradores (2011) (0,4 U/g) foi verificado no substrato composto por 60% de farelo de soja e 40% de bagaço de cana de açúcar. A produção máxima de endoglucanase (8,0 U/g) foi obtida pelo cultivo em bagaço de cana de açúcar (40%) e farelo de trigo (60%). As produções de celulase total (Fpase) e endoglucanase pelos fungos endofíticos no presente estudo foram superiores ao reportado pelos autores, utilizando-se as mesmas combinações de substratos, porém em diferentes proporções.

Maciel e colaboradores (2008) buscaram a otimização da produção de xilanase por *Aspergillus niger* LPB 326 cultivado em FES na mistura de bagaço de cana e farelo de soja. Quando o fungo foi cultivado em mistura destes substratos na proporção 1:1, foi obtida uma produção de 1.200 U/g de substrato. Os fungos endofíticos cultivados nas mesmas condições não alcançaram produções significativas como esta.

Buscando avaliar a influência de substratos distintos na indução da produção de  $\beta$ -xilosidase, Knob e Carmona (2009) cultivaram o fungo *Penicillium sclerotiorum* em cultura submersa. Entre os resíduos agrícolas, farelo de trigo mostrou ser o melhor indutor para a produção da enzima (produção de 1,47 U/mL). Em farelo de aveia, a produção foi de 0,24 U/mL e, quando cultivado em farelo de soja, não foi detectada produção. O endofítico AM01 quando cultivado na combinação de bagaço de cana e aveia produziu 0,112U/mL, porém quando cultivado em bagaço de cana e farelo de soja foi observada uma produção semelhante (0,223 U/mL).

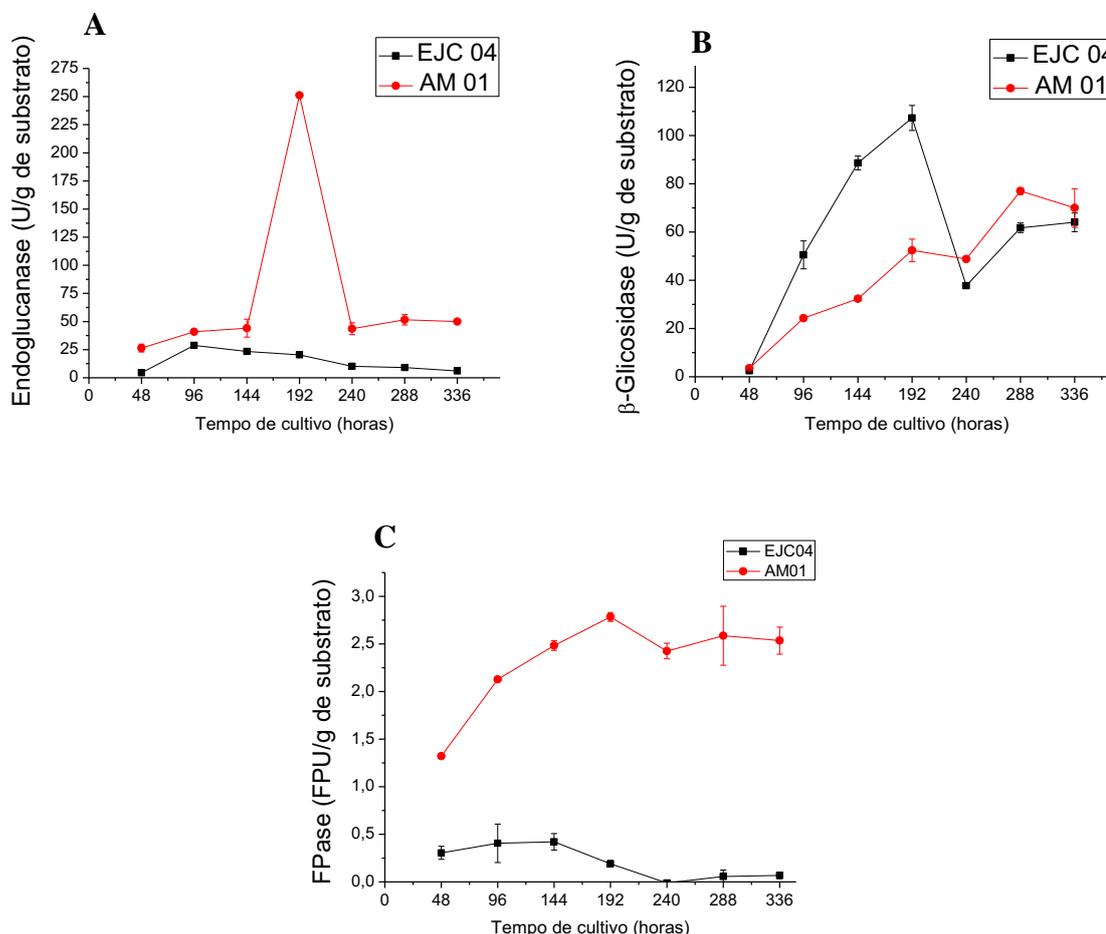
### 5.3 Avaliação da influência do tempo de cultivo na produção das enzimas

Nesta etapa, os fungos EJC04 e AM01 foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, por terem se destacado de forma geral na produção das celulases em todos os cultivos. Estes então foram cultivados em FES em mistura de farelo de algodão e farelo de trigo (FA:FT) (1:1 m/m), substratos que mais favoreceram a produção das enzimas, e cultivo foi mantido por 14 dias, a fim de se determinar o pico de produção das mesmas. A cada 48h, um saco de fermentação foi tomado para a avaliação quantitativa das atividades enzimáticas. Foram focadas as produções de celulases e xilanases e as produções de amilase e Exo-PG encontram-se em no Apêndice (Tabela 4). As produções de celulases e xilanases obtidas ao longo do tempo são apresentadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

A máxima produção de endoglucanase pelo isolado AM01 de 251,12 U/g foi alcançada em 192h e o fungo EJC04 teve seu pico de produção de 28,84 U/g em 96h (Figura 18A). Estas produções (especialmente a produção do isolado AM01) foram superiores às obtidas no cultivo anterior na mesma combinação de substratos, o qual foi mantido por 168h. Ambos os fungos se destacaram pelo aumento da produção e, no caso do isolado EJC04, houve uma redução significativa no tempo de produção desta enzima.

Quanto à enzima  $\beta$ -glicosidase, os picos de produção de ambos os fungos foram obtidos em 192h (Figura 18B). EJC04 se destacou com uma produção de 107,28 U/g e AM01 com 52,38 U/g.

**Figura 18** - Influência do tempo de cultivo na produção de celulases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.



Fonte: elaborado pelo autor.

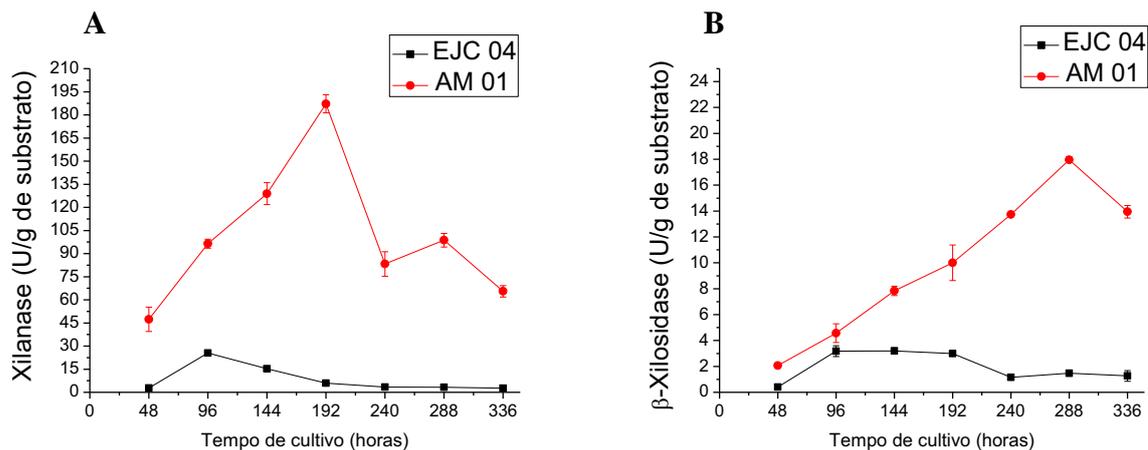
A partir deste cultivo, passou-se a determinar a atividade de FPase exatamente como descrito no protocolo de Ghose (1987) e a atividade em papel de filtro representada por FPU/g de substrato (Filter Paper Units), sendo calculada como descrito pelo autor para os casos de liberação de menos de 2mg de glicose.

As maiores produções foram alcançadas em 192 e 144h pelos fungos AM01 (2,78 FPU/g) e EJC04 (0,42 FPU/g), respectivamente (Figura 18C).

Em relação à produção de xilanase, assim como na produção de celulases, a máxima produção foi observada em 192h pelo isolado AM01 (187,17 U/g). Já o fungo EJC04 teve seu pico de produção em 96h (25,47 U/g) (Figura 19A). Diferentemente das outras enzimas, o pico produção de  $\beta$ -xilosidase pelo isolado AM01 se deu em 288h (17,96 U/g), sendo esta a maior produção desta enzima entre todos os isolados e todos

os cultivos até o momento no presente trabalho (Fig. 19B). Já o isolado EJC04, teve seu pico de produção em 96h (3,19 U/g).

**Figura 19** - Influência do tempo de cultivo na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: elaborado pelo autor.

Delabona e colaboradores (2011) avaliando a produção de enzimas em resíduos agrícolas (bagaço de cana, bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 1:1 e apenas farelo de trigo) por duas espécies de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* LCB50 e *Trichoderma polysporum* LCB47) obteve a maior produção de endoglucanase pelo fungo *T. polysporum* (75 U/g) utilizando a mistura de bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, em 192h. A produção de xilanase por *T. harzianum* foi superior (358,9 U/g) também na mistura de bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, em 144 h de cultivo. A produção de endoglucanase citada é inferior à alcançada pelo isolado AM01 (251,12 U/g) no presente estudo no mesmo período de tempo, porém a produção de xilanase encontra-se superior.

A maior produção de celulasas totais obtida por Silva e colaboradores (2008) em diferentes meios de cultivo submerso pelo fungo *Aspergillus phoenicis* foi de aproximadamente 0,05 FPU/mL na mistura de substratos bagaço de cana-de-açúcar (1%) e proteína de soja (0,5%). A produção máxima da enzima pelo isolado AM01 (0,28 FPU/mL de substrato) foi 5 vezes maior do que a obtida por Silva e colaboradores.

Deswal e colaboradores (2011) buscando otimizar a produção de celulase pelo fungo *Fomitopsis* sp., pelo cultivo em FES em farelo de trigo, relatam uma produção

máxima de endoglucanase (71,69 U/g) no 11<sup>o</sup> dia de cultivo (264h), enquanto que as máximas produções de  $\beta$ -glicosidase (53,67U/g) e FPase (3,49 U/g) foram observadas no 15<sup>o</sup> (360h) e 16<sup>o</sup> (384h) dias, respectivamente. Estas produções estão abaixo das produções máximas obtidas pelos fungos do presente estudo para as enzimas endoglucanase (251,12 U/g pelo isolado AM01) e  $\beta$ -glicosidase (107,28 U/g pelo isolado EJC04) e necessitaram de um período de tempo maior para serem obtidas, o que pode tornar mais onerosa a produção dessas enzimas em ampla escala.

Muthezhilan e colaboradores (2007), otimizando a produção de xilanase pelo fungo *Penicillium oxalicum* por fermentação estado sólido em farelo de trigo, observaram a máxima produção (3,89 U/mL ou 19,45 U/g de substrato) após 6 dias de cultivo (144h). Esta produção apresentada pelos autores é inferior às produções observadas pelos dois isolados no presente estudo.

Sharma e colaboradores (2012), utilizando um pré tratamento com irradiação de micro-ondas na serragem de *Cedrus deodara* para produção de xilanase por *Geotrichum* sp. F3 em FES, obtiveram produção máxima de 112,89 U/g de substrato, em um período de 10 dias de cultivo sob condições otimizadas de pH, concentração de inóculo e temperatura. Esta produção está abaixo da produção máxima obtida pelo isolado AM01 no presente trabalho. Cabe ressaltar que no presente trabalho não foram feitos estudos de otimização e que, portanto, a produção das enzimas pode ainda ser melhorada em trabalhos futuros. Deve-se levar em conta que, neste trabalho, não houve nenhum tipo de pré tratamento do substrato e que o período de produção também foi menor, o que confere uma vantagem em relação ao estudo de Sharma e colaboradores.

Zhang e Sang (2012) otimizaram a produção de celulases por *Penicillium chrysogenum* QML-2 em fermentação estado sólido na mistura de substratos pó de palha de milho e farelo de trigo (1:1). Em condições otimizadas, as produções máximas de endoglucanase, atividade papel de filtro (FPase) e  $\beta$ -glicosidase foram 370,15, 101,76 e 321,56 U/g, respectivamente em 168h de cultivo. Já em condições não otimizadas foram 85,21, 16,62 e 67,68 U/g, de endoglucanase, atividade papel de filtro (FPase) e  $\beta$ -glicosidase respectivamente nas mesmas 168h de cultivo. Os resultados não otimizados obtidos pelos autores se mostram semelhantes ou até abaixo das produções obtidas no presente trabalho, fato este que demonstra a importância da otimização das condições de cultivo para que ocorra um aumento na produção das enzimas.

Para investigar a produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus niger* KK2 em FES, Kang e colaboradores (2004) realizaram cultivos nos substratos palha de arroz e farelo de trigo e suas misturas. As máximas produções enzimáticas foram obtidas quando *A. niger* KK2 foi cultivado em palha de arroz como única fonte de carbono: FPase (19,5 U/g) em 4 dias, endoglucanase (129 U/g),  $\beta$ -glicosidase (100 U/g), xilanase (5.070 U/g) e  $\beta$ -xilosidase (193 U/g) após 5-6 dias de fermentação. O fungo utilizado sofreu mutação por meio de mutagênese com raio ultravioleta e sucessivos tratamentos com raio gama o que provavelmente explica essas produções elevadas.

Levando-se em conta que para quase todas as celulases o pico de produção ocorreu em 192h ou próximo a este período de tempo, ficou determinado este tempo de cultivo para seguir com os demais experimentos.

#### **5.4 Avaliação da influência da concentração do inóculo na produção das enzimas**

Após o tempo de cultivo para os selecionados ter sido fixado em 192h, a influência da concentração do inóculo na produção das enzimas foi avaliada. Estes isolados foram cultivados em FES, utilizando-se 3, 6, 9 ou 12 discos de inóculo e a produção das enzimas são apresentadas nas Figuras 20 e 21. A opção por utilizar discos de inóculo com células vegetativas ao invés de esporos partiu da observação de que os isolados do presente trabalho não produzem esporos, ao menos nas condições utilizadas. De acordo com Lima (2011), a produção de celulases a partir de meios inoculados com esporos ou com células vegetativas pode ser considerada a mesma.

Para o isolado AM01, as produções máximas de endoglucanase foram observadas com o uso de 6 a 12 discos de inóculo (249,02, 266,73 e 252,34 U/g de substrato, respectivamente). Em relação à  $\beta$ -glicosidase, a variação na quantidade de discos de inóculo parece não ter influenciado a produção da enzima, exceto pelo uso de 6 discos, onde a produção obtida foi mais baixa, indicando um provável ponto fora da curva (Figuras 20 A e B). Considerando-se estes resultados, pode-se selecionar 6 discos como a quantidade de inóculo adequada para uma produção satisfatória das enzimas pelo isolado AM01.

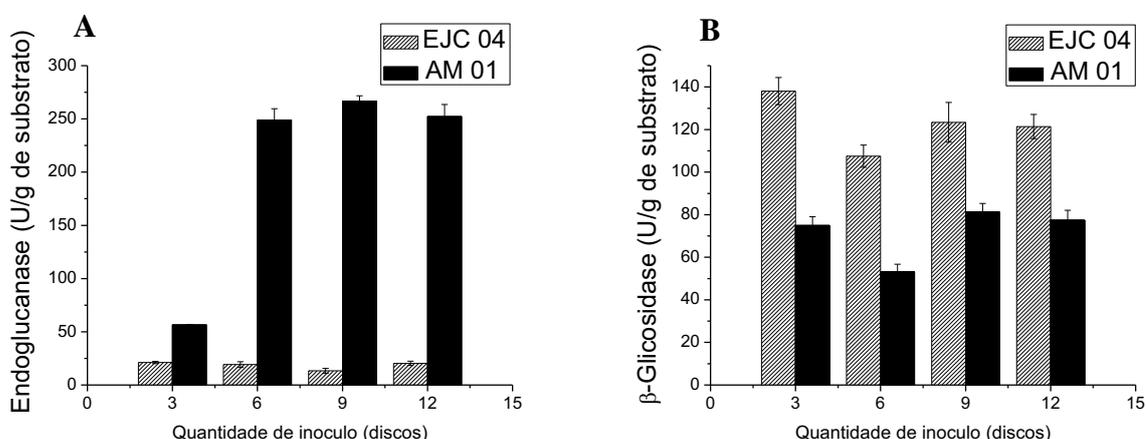
A produção das enzimas pelo isolado EJC04 foram bem próximas em todas as quantidades de inóculo avaliadas, sendo possível escolher a quantidade intermediária

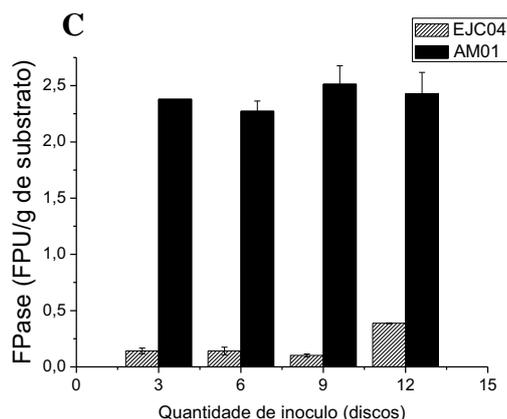
de 6 discos como a adequada para a produção satisfatória das enzimas (Figura 20A e B).

As produções de celulasas e hemicelulasas quando foram utilizados 6 discos de inóculo se assemelham muito com as obtidas quando foram utilizados 5 discos de inóculo. Podemos assim inferir uma boa reprodutibilidade dos resultados, considerando-se que estes experimentos não foram realizados simultaneamente.

A produção de Fpase pelo isolado AM01 se manteve semelhante mesmo com a variação na quantidade de discos de inóculo. As produções foram de 2,38; 2,27; 2,51 e 2,42 FPU/g nas concentrações de 3; 6; 9 e 12 discos. Já o isolado EJC04 teve sua melhor produção 0,39 FPU/g na concentração de 12 discos. Uma vez que a metodologia para a avaliação de FPAse parece não ser totalmente adequada para os extratos enzimáticos obtidos a partir dos fungos do presente estudo, a seleção da melhor condição de inóculo fica baseada na produção das enzimas endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase.

**Figura 20** - Influência da concentração de inóculo na produção de celulasas pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.

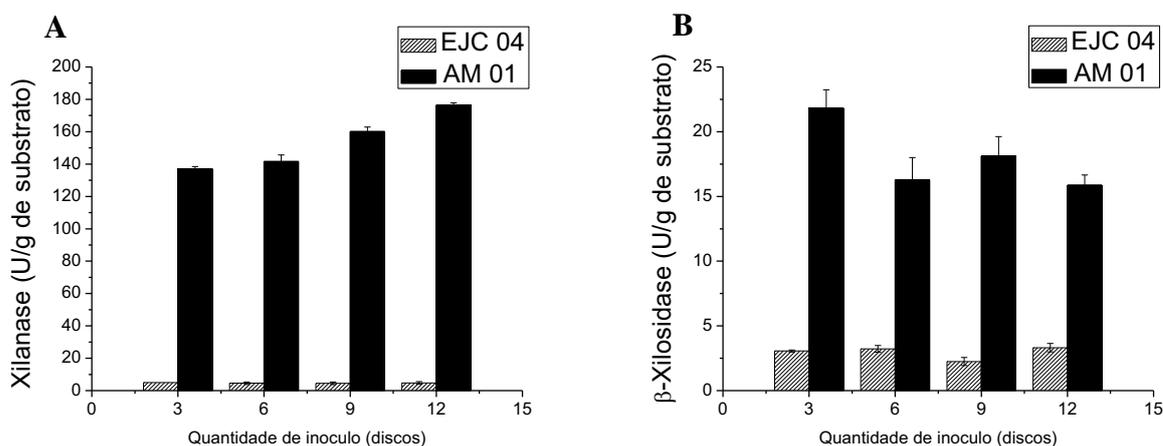




Fonte: elaborado pelo autor.

A produção de xilanase pelo isolado AM01 aumentou proporcionalmente com o aumento na concentração de inóculo utilizada. A produção máxima foi de 176,39 U/g de substrato na concentração de 12 discos. O isolado EJC04 teve produção semelhante em todas as concentrações de inóculo. A maior produção foi de 4,98 U/g na concentração de 3 discos de inóculo (Figura 21 A).

**Figura 21** - Influência da concentração de inóculo na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: elaborado pelo autor.

Acharya e colaboradores (2008), otimizando a produção de celulase por *Aspergillus niger* utilizando serragem como substrato em fermentação submersa notaram que, quando uma elevada massa de fungos (no caso 15 e 20 discos de inóculo) foi inoculada, a atividade de celulase (CMCase) e a produção de açúcar redutor diminuiu. Mas quando baixa carga de massa fúngica (5 a 10 discos) foi inoculada, houve

aumento na produção de açúcar e a atividade da celulase foi continuamente observada até 96 h. Apesar de o presente estudo ser realizado em condições diferentes daquele realizado por Acharya e colaboradores, nota-se que os isolados EJC04 e AM01 apresentaram um comportamento contrário em relação a produção das enzimas, já que, quanto maior a massa fúngica utilizada, maior a produção enzimática.

Zilly e colaboradores (2012) a fim de obter enzimas hidrolíticas cultivaram fungos causadores de podridão como *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Macrocybe titans*, *Ganoderma lucidum* e *Grifola frondosa*, em FES em resíduos de casca de maracujá e farelo de trigo. Utilizaram como inóculo 3 discos de micélio com 10 mm de diâmetro e após 14 dias obtiveram produções máximas de 22 U/g de  $\beta$ -glicosidase por *P. pulmonarius*, 3,25 U/g de xilanase por *G. lucidum* e 31 U/g de  $\beta$ -xilosidase por *P. pulmonarius*, todos os cultivos no substrato farelo de trigo. As produções de  $\beta$ -glicosidase e xilanase estão abaixo das alcançadas pelos isolados do presente trabalho na mesma quantidade de inóculo e apenas a produção de  $\beta$ -xilosidase por *P. pulmonarius* superou a produção máxima do isolado AM01.

Com base na produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, considera-se satisfatória a quantidade de inóculo de 6 discos para posterior avaliação da influência do teor de umidade na produção das enzimas.

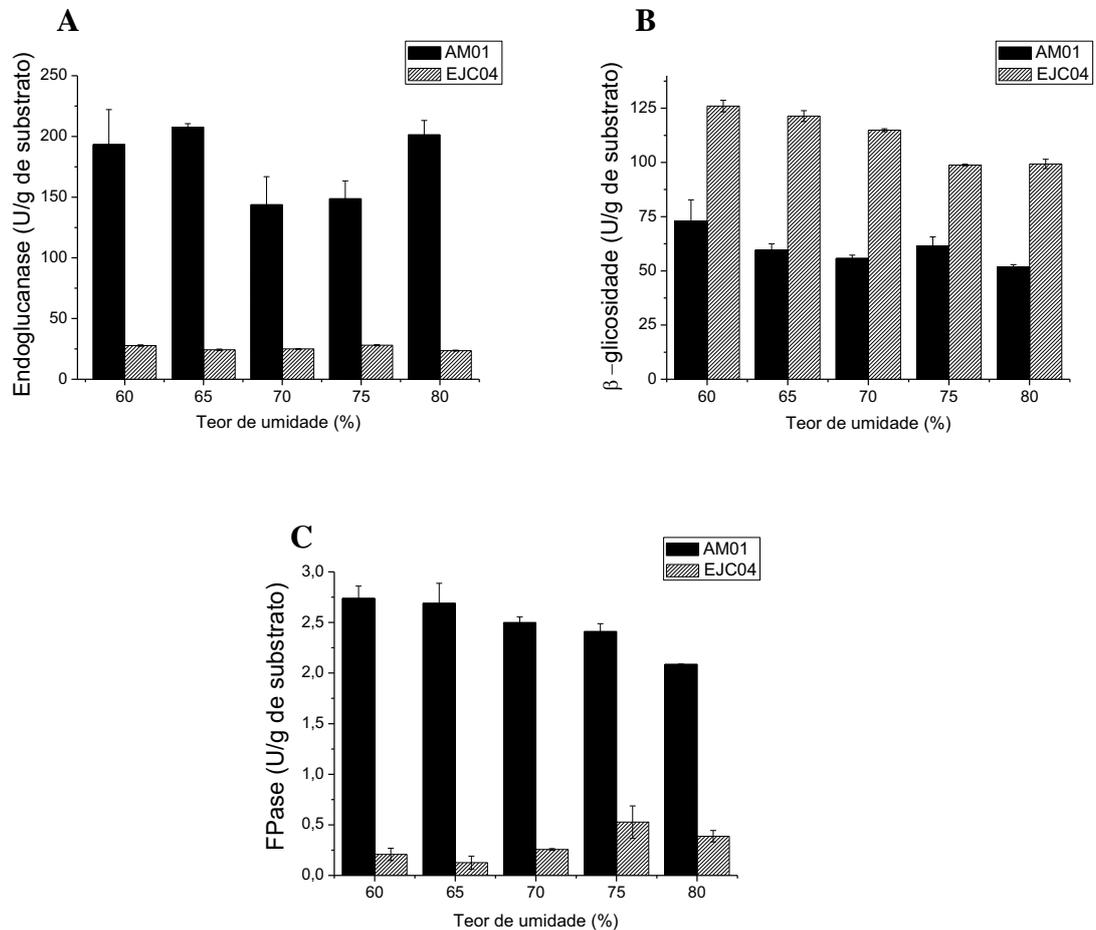
### 5.5 Avaliação da influência da umidade na produção das enzimas

Após fixado o tempo de cultivo em 192h e a concentração de inóculo em 6 discos, a produção das enzimas em FES pelos fungos selecionados EJC04 e AM01 foi avaliada utilizando-se substrato nas umidades iniciais de 60, 65, 70, 75 e 80%.

Em relação às celulases, para o isolado AM01, uma tendência à queda na produção das enzimas foi observada quando se utilizou teores de umidade acima de 65% (Figuras 22 A, B e C). Já em relação ao isolado EJC04, o aumento no teor de umidade inicial do substrato parece praticamente não ter influenciado a produção de endoglucanase (Figura 22 A). Ainda para este isolado, utilizando-se teores de umidade maiores observou-se uma tendência à diminuição na produção de  $\beta$ -glicosidase e ao aumento na produção de FPAse (Figura 22B e C).

Pelos dados apresentados, uma produção satisfatória das duas enzimas seria, portanto obtida, fixando-se a umidade inicial em torno de 60-65%.

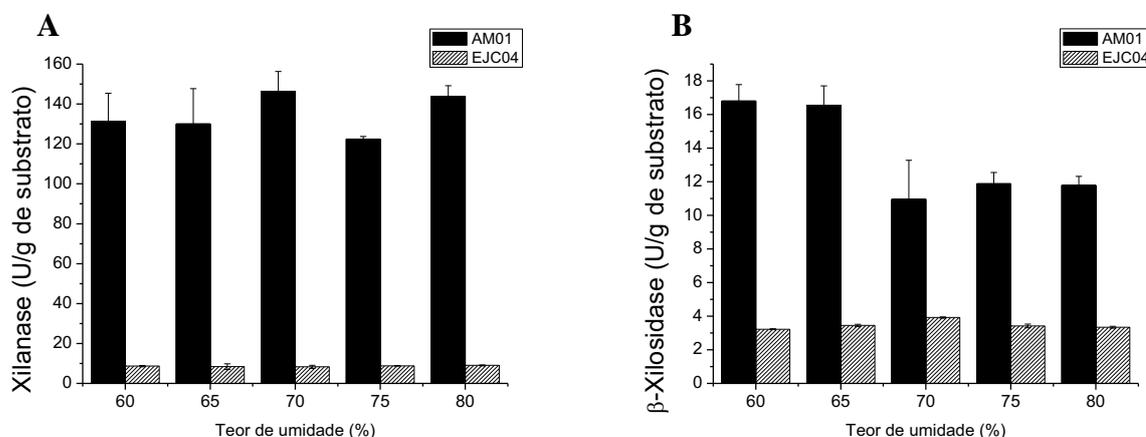
**Figura 22** - Influência do teor de umidade na produção de celulases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): FPase.



**Fonte:** elaborado pelo autor

A produção de xilanase foi semelhante nos diferentes teores de umidade para ambos os fungos. A maior produção (146,34 U/g) foi observada para o isolado AM01, em 70% de umidade. Em relação à  $\beta$ -xilosidase, as maiores produções (em torno de 16 U/g) foram observadas para o isolado AM01, utilizando-se umidade inicial entre 60-65%. O isolado EJC04 produziu apresentou uma produção em torno de 4 U/g em todas as umidades avaliadas. Sendo assim, para as xilanases, a escolha de 60-65% de umidade inicial do substrato também levaria a produções satisfatórias de ambas as enzimas.

**Figura 23** - Influência do teor de umidade na produção de xilanases pelos isolados AM01 e EJC04, em FES, utilizando como substrato (misturas 1:1 m/m) farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT). (A): xilanase; (B):  $\beta$ -xilosidase.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Nota-se que, em geral, teores de umidade mais baixos resultaram em maiores produções enzimáticas. Isto era esperado uma vez que os substratos utilizados são farelos e não absorvem muito bem a fase líquida, fato que se pode comprovar pela análise a olho nu dos sacos de fermentação logo após a inoculação dos fungos.

Em FES, o nível de umidade desempenha um papel importante na biossíntese e secreção de muitos tipos de enzimas, especialmente celulases. Teores de umidade muito altos em meio sólido resultam em diminuição da porosidade do substrato, bem como a redução na penetração de oxigênio entre as partículas do mesmo. Por outro lado, níveis de umidade excessivamente baixos em meio sólido conduzem a um menor crescimento microbiano bem como diminuem a acessibilidade aos nutrientes (VU; PHAM; KIM, 2010).

Xia e Cen (1999) obtiveram uma produção de CMCCase de 128 U/g (148 h) cultivando *Trichoderma reesei* em FES sob condições otimizadas, utilizando farelo de trigo com umidade inicial de 70%. O isolado AM01 apresentou uma produção pouco superior sob a mesma condição de umidade (143,68 U/g). Porém, utilizando-se 65% de umidade inicial, observou-se uma produção mais elevada (207,70 U/g).

Estudos da produção de celulase em FES, pelo fungo *Trichoderma reesei* NCIM 992, utilizando três diferentes materiais lignocelulósicos, foram realizados por Maurya e colaboradores (2012). A máxima produção de endoglucanase (11,45 U/g) foi obtida pelo

cultivo em farelo de trigo com umidade inicial de 70%, produção esta inferior a obtida no mesmo teor de umidade pelo isolado AM01.

Liang e colaboradores (2012) obtiveram a mais elevada produção de celulase total (0,7 FPU/g) pelo fungo *Aspergillus* sp. em FES na mistura de substratos capim de arroz e farelo de trigo (3:1) quando o teor de umidade estava em torno de 70%, produção esta superior a alcançada pelo isolado AM01.

A produção de celulases e hemicelulases pelo fungo mesófilo *Neurospora crassa* foi avaliada em FES em mistura de palha de trigo e farelo de trigo (5:1) por Dogaris e colaboradores (2008). As máximas produções enzimáticas foram de 492,8 U/g, 1,08 U/g, 26,7 U/g, 297,8 U/g, 0,132 U/g para endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidase, respectivamente, no teor de umidade de 70,5%. Estas produções enzimáticas são superiores as produções obtidas pelo isolado AM01, exceto para as enzimas  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase.

De acordo com os dados de literatura expostos, pode-se concluir que quando se faz uso de farelos para composição de meios para cultivo de fungos e produção de enzimas em FES, as máximas produções são alcançadas quando o teor de umidade destes substratos se encontram em torno de 70%.

## **5.6 Caracterização físico-química das enzimas**

Para caracterização físico-química e bioquímica das enzimas foram utilizados os extratos enzimáticos obtidos do cultivo em FES na mistura de farelo de algodão e farelo de trigo (1:1 m/m), utilizando-se teor de umidade inicial de 65%.

Foram avaliados os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulases e xilanases. Nesta etapa, apenas a enzima Fpase não foi selecionada para caracterização visto que sua produção foi muito baixa.

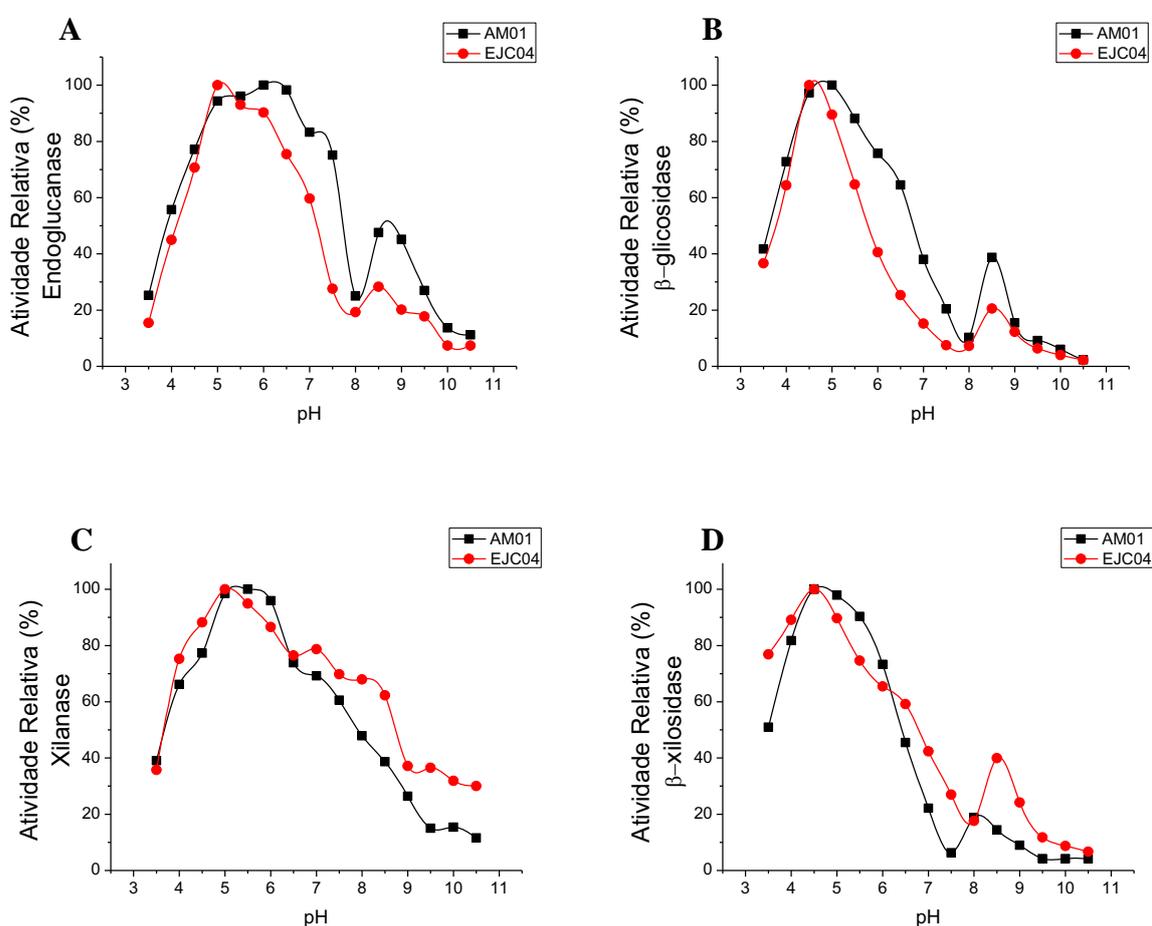
Foi considerado como 100% a maior atividade da enzima encontrada.

### **5.6.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas**

Os isolados apresentaram pH ótimo de atividade entre 4,5 e 6,0 tanto para celulases quanto para xilanases. O pH ótimo de atividade de endoglucanase foi 6,0 para

o isolado AM01 e 5,0 para EJC04 (Figura 24 A). As  $\beta$ -glicosidases apresentaram valores de pH ótimo de atividade bem próximos, 5,0 e 4,5 para AM01 e EJC04, respectivamente (Figura 24 B). Para xilanases as maiores atividades foram observadas em pH 5,5 para AM01 e 5,0 para EJC04 (Figura 24 C). As  $\beta$ -xilosidases apresentaram pH ótimo de atividade de 4,5 para ambos os isolados (Figura 24 D). Os pontos de queda e retomada da atividade observados nas figuras provavelmente devem-se a mudança na solução tampão utilizada, entre pH 8,0 e 8,5.

**Figura 24** - Influência do pH sobre a atividade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B):  $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D):  $\beta$ -xilosidase.

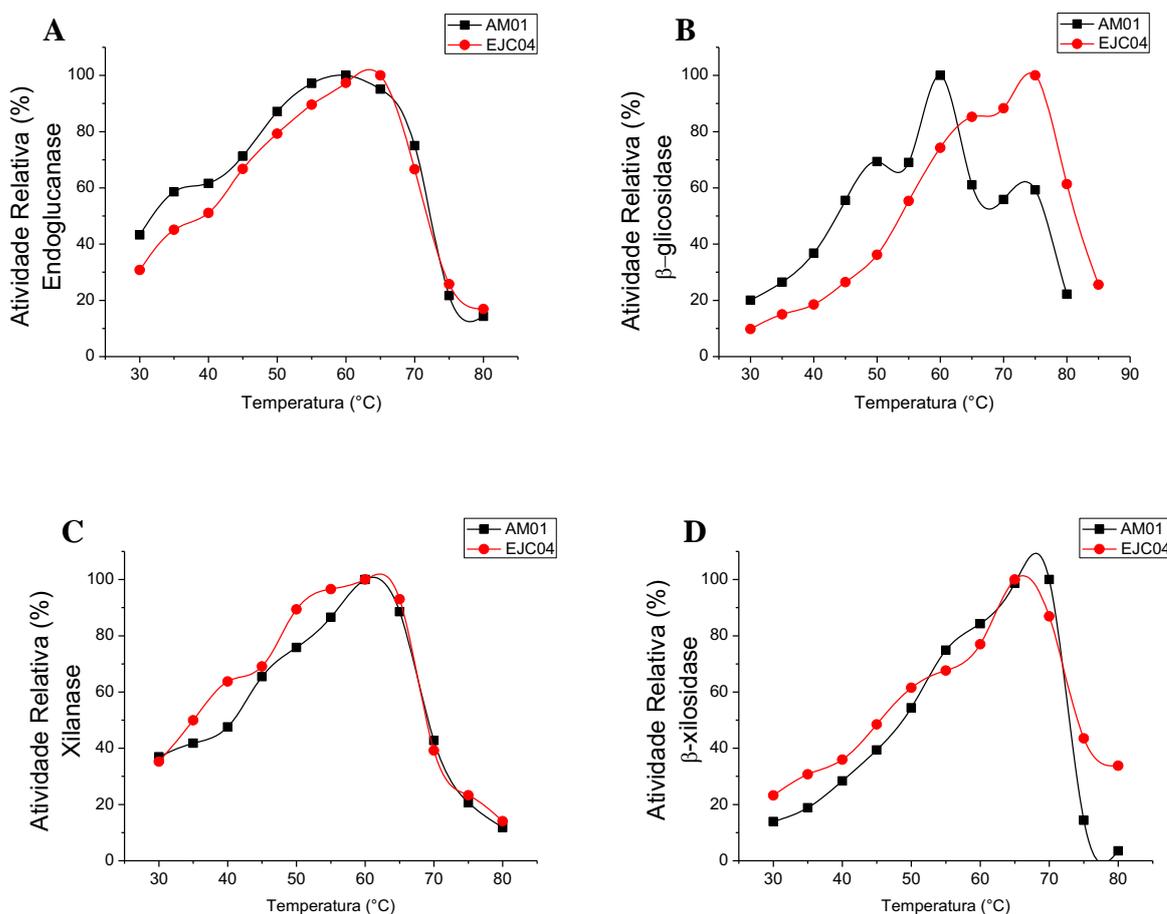


**Fonte:** elaborado pelo autor.

As enzimas apresentaram temperatura ótima de atividade entre 60 e 75 °C (Figura 25). Para o isolado AM01, a temperatura ótima de atividade das enzimas foi de 60 °C, exceto para  $\beta$ -xilosidase (75 °C). De modo geral, as enzimas do isolado EJC04

foram mais ativas sob temperaturas superiores, destacando-se a  $\beta$ -glicosidase, mais ativa sob 75 °C (Figura 25 B).

**Figura 25** - Influência da temperatura sobre a atividade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B):  $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D):  $\beta$ -xilosidase.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um ponto a ser levado em consideração foi que, determinando-se as condições ótimas de pH e temperatura, houve um aumento significativo na atividade de todas as enzimas destacando-se a atividade de  $\beta$ -glicosidase do isolado EJC04 (488 U/g, 4 vezes superior à atividade determinada no extrato enzimático antes da caracterização).

Como as enzimas são proteínas, as mudanças no pH afetam profundamente o caráter iônico dos grupos ionizáveis na superfície e/ou no sítio ativo da molécula, podendo influenciar a conformação e/ou a natureza catalítica da enzima. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

Toda reação química catalisada por enzimas será afetada de acordo com a variação da temperatura. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de reação inicialmente aumenta, em virtude da energia cinética aumentada entre as moléculas de enzima e de substrato. Sob temperaturas ótimas, a velocidade da reação é máxima (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Kormelink e colaboradores (1993) obtiveram resultados semelhantes quanto ao pH e temperatura ótimos para 3 xilanases e 1  $\beta$ -xilosidase purificadas produzidas por *Aspergillus awamori*. O pH ótimo para xilanases ficou entre 4,0 e 6,0 e a temperatura ótima entre 45 °C e 55 °C, e para a enzima  $\beta$ -xilosidase a atividade ótima ocorreu em pH 6,5 sob 70 °C.

Almeida e colaboradores (2011) caracterizaram enzimas produzidas pelo isolado endofítico *Acremonium* sp. EA0810 e obtiveram as atividades máximas de endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase, e xilanase em pH e temperaturas de 5,0 e 70 °C; 4,5 e 60 °C e 6,5 e 50 °C, respectivamente, resultados esses próximos aos encontrados no presente trabalho.

Endoglucanases produzidas por *Aspergillus niger* isolado de sabugo de milho apresentaram pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 60 °C (OYELEKE et al., 2012).

Endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases produzidas por *Chaetomium* sp., em estudo realizado por Ravindran e colaboradores (2010) apresentaram pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 50 °C.

Xilanases produzidas pelo endofítico *Alternaria alternata* apresentaram pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 45 °C (WIPUSAREE et al., 2011).

Pode-se notar que, para celulasas fúngicas, as melhores atividades são observadas em pH ácido (entre 4,0 e 5,0), segundo os dados de literatura. Em pH alcalino, a perda da atividade é elevada. A maioria das xilanases fúngicas apresentam pH ótimo para hidrólise da xilana na faixa de 4,5 a 6 (KORMELINK et al., 1993).

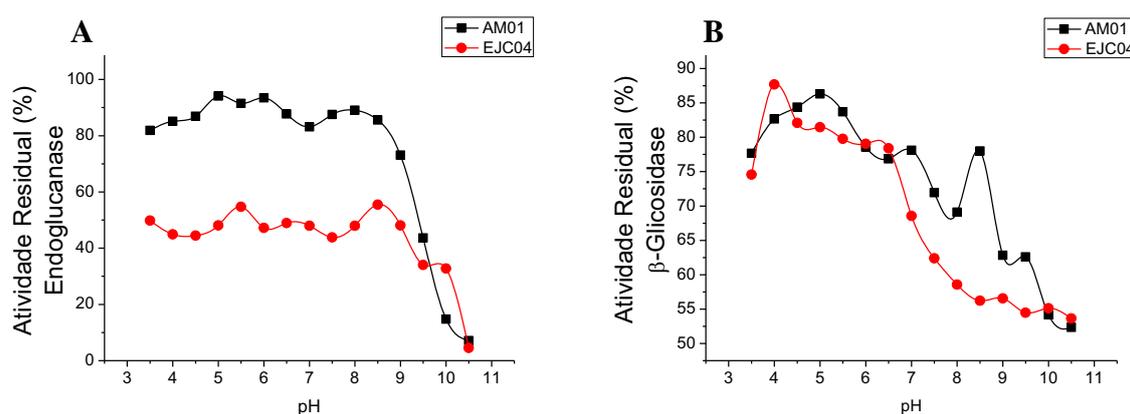
### **5.6.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas**

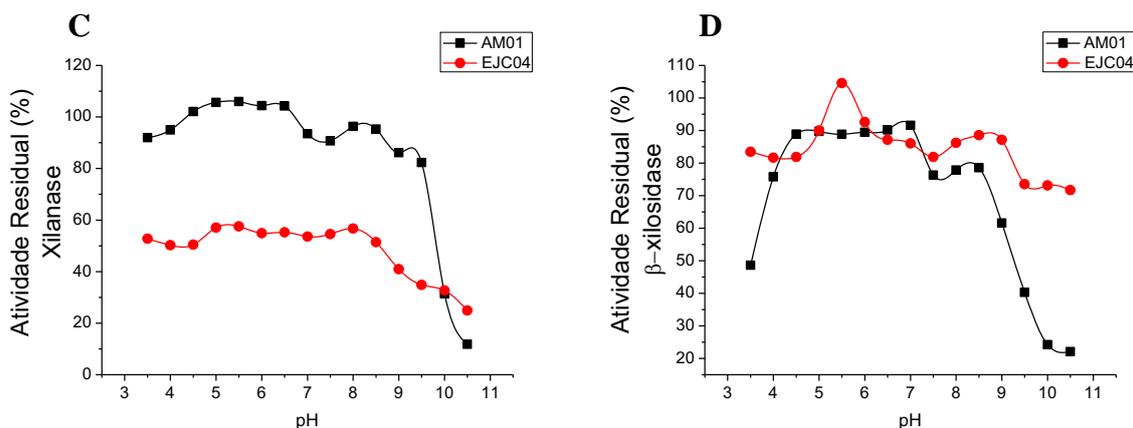
A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, por 24 h, a temperatura ambiente, em soluções tampão na faixa de pH de 3,5 – 10,5 e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação de cada enzima. Foi considerado como 100% a atividade da

enzima quantificada no seu pH e temperatura ótima de atividade antes do período de incubação.

Em relação às endoglucanases, a produzida pelo isolado AM01 foi mais estável ao pH, mantendo cerca de 81 a 94% de sua atividade após 24h de incubação em valores de pH entre 3,5 e 8,5. Para a endoglucanase produzida por EJC04 houve uma queda de aproximadamente 50% em 24h de incubação em valores de pH de 3,5 a 9,0 (Figura 26 A). As enzimas  $\beta$ -glicosidases de ambos os isolados apresentaram comportamento semelhante após a incubação em diferentes valores de pH (cerca de 50 a 85% entre pH 3,5 e 10,5) (Figura 26 B). A xilanase de AM01 foi bastante estável frente a variações de pH entre 3,5 e 9,5 (Figura 26 C) sendo que a incubação em pH entre 4,5 e 6,5 favoreceu a atividade da enzima. A xilanase de EJC04 manteve apenas 50% de sua atividade após incubação na faixa de pH de 3,5 a 8,5. As atividades de  $\beta$ -xilosidase do isolado AM01 mantiveram-se mais estáveis na faixa de pH de 4,5 – 7,0 mantendo em média 90% da atividade máxima. Já as enzimas do isolado EJC04 foram estáveis em uma faixa maior de pH de 3,5 a 9,0 mantendo de 80 a 90% de sua atividade máxima (Figura 26 D). Cabe ressaltar que, para esta última enzima, a incubação em pH 5,5 favoreceu a atividade.

**Figura 26** - Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B):  $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D):  $\beta$ -xilosidase.



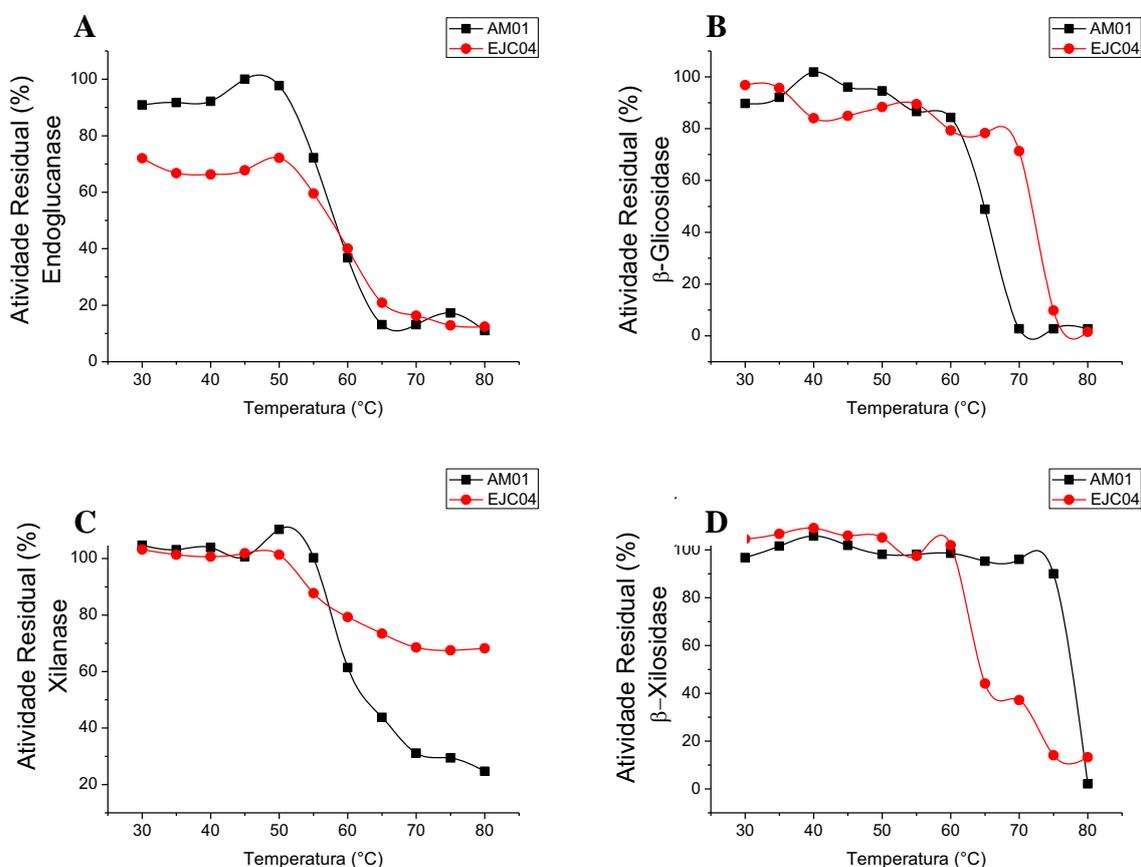


**Fonte:** elaborado pelo autor

Pode-se verificar que em pH 5,0 todas as enzimas avaliadas apresentaram boa estabilidade, sendo este pH escolhido para posterior avaliação da termoestabilidade. Desta forma cada enzima foi incubada, por 1 h, em pH 5,0 a temperaturas de 30 a 80 °C, seguida da determinação da atividade residual sob as condições ótimas.

A endoglucanase de AM01 foi bastante estável em 1 hora de incubação entre 30 e 50 °C, sendo que manteve 100% de sua atividade quando incubada a 45 °C. Já a endoglucanase de EJC04 foi menos estável, apresentando cerca de 67% de sua atividade após a incubação a 45 °C (Figura 27 A). A enzima  $\beta$ -glicosidase de AM01 apresentou uma maior faixa de termoestabilidade (30 – 60 °C), mantendo cerca de 100% de sua atividade quando incubada a 40 °C (Figura 27 B). Já a  $\beta$ -glicosidase de EJC04 perde drasticamente sua estabilidade quando incubada a temperaturas superiores a 70 °C. A incubação em temperaturas de até 55 ou 50 °C favoreceu a atividade das xilanases de AM01 e EJC04, respectivamente. Destaca-se ainda que a xilanase de EJC04 foi mais estável frente as variações de temperatura (Figura 27 C). Assim como as xilanases, as  $\beta$ -xilosidases de ambos os fungos apresentaram boa termoestabilidade. A  $\beta$ -xilosidase de AM01 foi estável em praticamente todas as temperaturas avaliadas, perdendo atividade apenas após a incubação a 80 °C. A atividade desta enzima foi favorecida pela incubação em temperaturas entre 35 e 45 °C. Em relação à  $\beta$ -xilosidase de EJC04, houve uma queda acentuada na atividade após a incubação em temperaturas superiores a 60 °C (Figura 27 D).

**Figura 27** - Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A): Endoglucanase, (B):  $\beta$ -glicosidase, (C): Xilanase e (D):  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: elaborado pelo autor.

Endoglucanases e xilanases produzidas por *Cellulosimicrobium cellulans* foram caracterizadas por Song e Wei (2010), e mantiveram 64 e 87% da sua atividade máxima, respectivamente, após 1 h de incubação a 45 °C. Em relação a estabilidade ao pH, as enzimas tiveram uma perda de 50% da sua atividade máxima em pH 5,0 sendo incubadas por apenas uma hora no tampão correspondente. Ambas as enzimas do isolado AM01 mostraram-se mais estáveis em relação ao pH e temperatura, já que mantiveram suas atividades em uma faixa de pH e temperatura maior do que os resultados apresentados acima.

Segundo estudo de Almeida e colaboradores (2011) as endoglucanases de *Acremonium* sp. EA0810 se mostraram termoestáveis, pois mantiveram mais do que 75% da sua atividade máxima após incubação durante 1 hora a 70 °C. As xilanases mantiveram 63% da sua atividade máxima após incubação a 50 °C, durante 30 minutos e a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi totalmente perdida após incubação a 60 °C. Com

exceção da enzima endoglucanase, xilanases e  $\beta$ -glicosidases produzidas por AM01 e EJC04 se mostraram mais estáveis quanto a variação de pH e temperatura.

Endoglucanases produzidas por *Aspergillus fumigatus* Z5 em estudo realizado por Liu e colaboradores (2011) apresentaram estabilidade em uma faixa de pH de 4,0 – 8,0 mantendo em média 80% de sua atividade máxima. Quanto à estabilidade térmica, a enzima manteve mais de 80% de sua atividade máxima entre as temperaturas de 40 – 60 °C. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para endoglucanase de AM01.

As enzimas produzidas pelos isolados AM01 e EJC04 apresentaram um grande potencial para serem utilizadas na hidrólise de biomassa lignocelulósica por apresentarem excelentes características de estabilidade a variações de pH e temperatura.

Embora os isolados do presente trabalho sejam fungos mesofílicos, suas enzimas apresentaram temperaturas ótimas de atividade elevadas, como por exemplo a  $\beta$ -glicosidase de EJC04 (75 °C) bem como foram estáveis em temperaturas mais elevadas ( $\beta$ -xilosidase de AM01 a 75 °C apresentou 90% de sua atividade inicial).

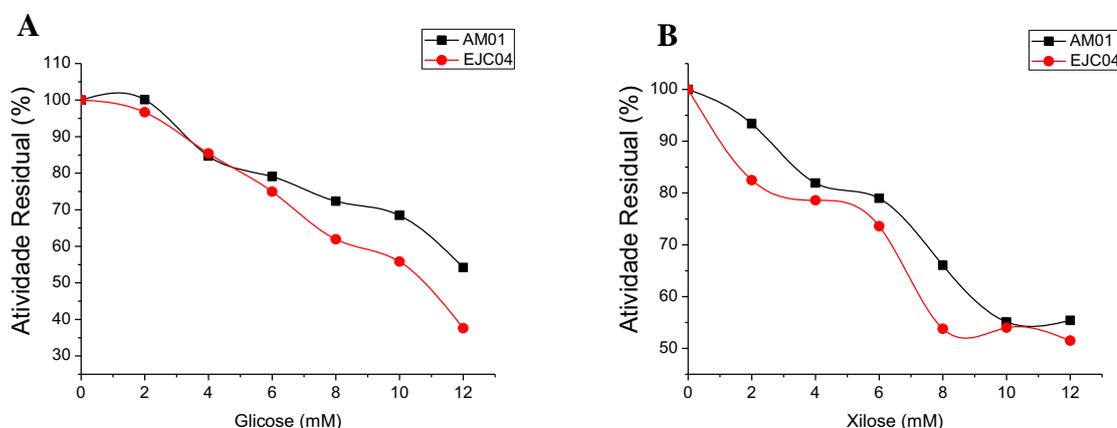
## **5.7 Caracterização bioquímica das enzimas**

### **5.7.1 Efeito de glicose e xilose sobre as atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase**

As atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram quantificadas, como descrito nos itens 4.7.2 e 4.7.5 respectivamente, sob condições ótimas de pH e temperatura, na presença de glicose ou xilose, respectivamente, em concentrações de 2 a 12 mmol/L, a fim de se avaliar o efeito dos açúcares na atividade das enzimas.

Pode-se notar que com o aumento da concentração dos açúcares houve uma redução nas atividades residuais das enzimas de ambos os isolados (Figuras 28 A e B) demonstrando que as mesmas sofreram inibição pelo produto.

**Figura 28** - Efeito da concentração de açúcares nas atividades de  $\beta$ -glicosidase (A) e  $\beta$ -xilosidase (B) produzidas pelos isolados AM01 e EJC04.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Inibição causada por glicose é comumente observada em  $\beta$ -glicosidases microbianas (ZANOELO et al., 2004). Algumas enzimas são mais inibidas e outras menos. As  $\beta$ -glicosidases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* foram fortemente inibidos por glicose. Em concentrações de 5mmol/L de glicose, nenhuma atividade enzimática foi observada em ambas as enzimas (LEITE et al., 2008).

Em estudo para caracterização de uma  $\beta$ -glicosidase de *Monascus purpureus*, Daroit (2007) observou que uma concentração de 10 mmol/L glicose reduziu em 58% a atividade máxima da enzima, resultado esse semelhante ao observado para as enzimas dos isolados AM01 e EJC04.

Já Sorensen e colaboradores (2012) verificaram que em uma concentração de glicose de 100 mmol/L a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus saccharolyticus* foi reduzida a 50% da sua atividade máxima, demonstrando que esta enzima foi menos sensível a inibição do produto. Belancic e colaboradores (2003) também verificaram que a  $\beta$ -glicosidase extracelular de *Debaryomyces vanriijiae* foi fracamente inibida por concentrações de glicose, mantendo 98%, 86% e 78% da atividade inicial na presença de 5, 10 e 450 mmol/L glicose, respectivamente.

### 5.7.2 Efeito do etanol sobre a atividade de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase

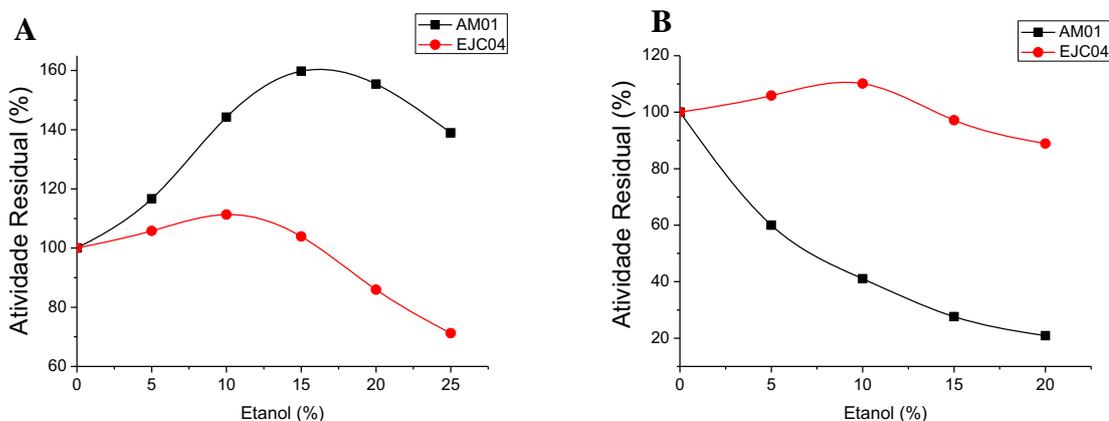
Buscando avaliar o efeito do etanol sobre as atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, estas foram quantificadas, como descrito nos itens 4.10.2 e 4.10.5 respectivamente, sob condições ótimas de pH e temperatura, na presença de etanol (0 a 25,0%).

Por serem utilizadas em diversas aplicações industriais, a inibição por álcoois é um importante tópico no estudo das  $\beta$ -glicosidases (SUN; CHENG, 2002), especialmente quando estas enzimas são empregadas em processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

Observou-se que a atividade da  $\beta$ -glicosidase de AM01 foi estimulada em todas as concentrações de etanol avaliadas (Figura 29 A). Já a  $\beta$ -glicosidase de EJC04 passa a ter sua atividade reduzida em concentrações de etanol acima de 15% (Figura 29 B).

Um perfil inverso foi observado para as enzimas  $\beta$ -xilosidases. A enzima de AM01 teve sua atividade reduzida na presença de etanol, apresentando cerca de 60% de atividade residual na presença do álcool a 5%. Já a  $\beta$ -xilosidase produzida por EJC04 teve sua atividade favorecida na presença de 5 a 10% de etanol, mantendo cerca de 100% de atividade quando o álcool foi empregado na concentração de 20% (Figura 29 B).

**Figura 29** - Efeito da concentração de etanol nas atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase produzidas pelos isolados AM01 e EJC04. (A):  $\beta$ -glicosidase, (B):  $\beta$ -xilosidase.



Fonte: elaborado pelo autor.

O aumento da atividade enzimática observado na presença de baixas concentrações de etanol pode ser atribuído à atuação da  $\beta$ -glicosidase como uma  $\beta$ -glicosiltransferase. O etanol pode aumentar a velocidade da reação de algumas  $\beta$ -glicosidases, pois atua como um aceptor preferencial dos resíduos glicosil durante a hidrólise do substrato (PARRY et al., 2001), substituindo a água na reação e dando origem a outros glicosídeos, como etil-glicosídeos (BARBAGALLO et al., 2004). A atividade de glicosiltransferase das  $\beta$ -glicosidases é uma característica muito interessante para a sua utilização em processos simultâneos de sacarificação e fermentação (LEITE et al., 2008). A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, diferindo apenas na natureza do aceptor final (água ou outra molécula, respectivamente) (BHATIA et al., 2002), sendo que álcoois parecem associar-se melhor ao sítio ativo destas enzimas do que a água (KURASHIMA et al., 2003).

Por outro lado, o efeito adverso sobre a atividade enzimática, observado na presença de concentrações elevadas destes álcoois, deve-se, provavelmente, a efeitos na estrutura da enzima, ocasionando a desnaturação ou modificações conformacionais devido à alteração na polaridade do meio (BARBAGALLO et al., 2004).

Diversos dados na literatura demonstram resultados onde nota-se que a presença de etanol em baixas concentrações pode estimular a atividade de  $\beta$ -glicosidases produzidas por fungos, como em estudo realizado por Leite e colaboradores (2008), onde  $\beta$ -glicosidases de *Aureobasidium pullulans* mantiveram 80% da sua atividade máxima em concentrações de 10% de etanol (v/v). Quando a concentração de álcool foi elevada para 20% (v/v), a enzima apresentou apenas 31% de sua atividade catalítica. De forma semelhante a presença de etanol estimulou atividade de  $\beta$ -glicosidase extracelular de *Aspergillus oryzae* em 30% e 15% na presença de 15% (v/v) e 20% (v/v) de etanol, respectivamente (RIOU et al., 1998). A presença de etanol (20%) estimulou em 51% a atividade de  $\beta$ -glicosidase produzida por *Aspergillus niger*, e concentrações mais elevadas (até 40%) inibiram a atividade enzimática, que mesmo assim continuou 9% superior à atividade máxima (YAN et al., 1998).

Alguns dados demonstram fungos que são estimulados em concentrações mais elevadas de etanol, como foi observado em estudo de Kaur e colaboradores (2007) verificando que concentrações de etanol até 70% (v/v) estimularam a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, a qual manteve até 120% de sua atividade máxima.

## 5.8 Avaliação do cultivo misto de AM01 e EJC04

Devido ao ótimo desempenho apresentado individualmente pelos isolados AM01 e EJC04 quanto à produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente, buscou-se avaliar a produção das enzimas pelo cultivo misto dos fungos, como uma forma de direcionamento para futuros trabalhos.

Um fator muito importante considerado foi a excelente produção de  $\beta$ -glicosidase pelo isolado EJC04. Visto que essa enzima é responsável pela hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, reduzindo o efeito inibidor destes açúcares sobre as enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases, ela desempenha um efeito crucial na degradação enzimática da celulose, controlando assim a velocidade global da reação. Como se tem interesse em realizar sacarificação de material lignocelulósico em trabalhos futuros, elevadas quantidades destas enzimas são necessárias no processo para garantir o sucesso da hidrólise.

Na natureza, a maioria dos fungos durante seu ciclo de vida convivem com outros micro-organismos em comunidades mistas e interações complexas, como simbiose ou competições. Para obter nutrientes do meio ambiente secretam enzimas para a hidrólise de fontes de carbono complexas (como por exemplo, polissacarídeos de origem vegetal) e, muito provavelmente, a degradação natural da biomassa vegetal ocorre por meio da mistura de diversas enzimas produzidas por diversos organismos.

O Co-cultivo de fungos pode, portanto, resultar em “coquetéis” enzimáticos mais eficazes para aplicações industriais do que as enzimas obtidas a partir de cultivos isolados (HU et al., 2011).

Co-culturas fúngicas são descritas na literatura para a produção de enzimas específicas. *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, foram co-cultivados para a produção de celulasas (MAHESHWARI et al., 1994), enquanto *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* foram co-cultivados para a produção de celulasas (GUPTA; MADAMWAR, 1997). O co-cultivo de *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* resultou em uma maior produção de enzimas lignolíticas (VERMA; MADAMWAR, 2002).

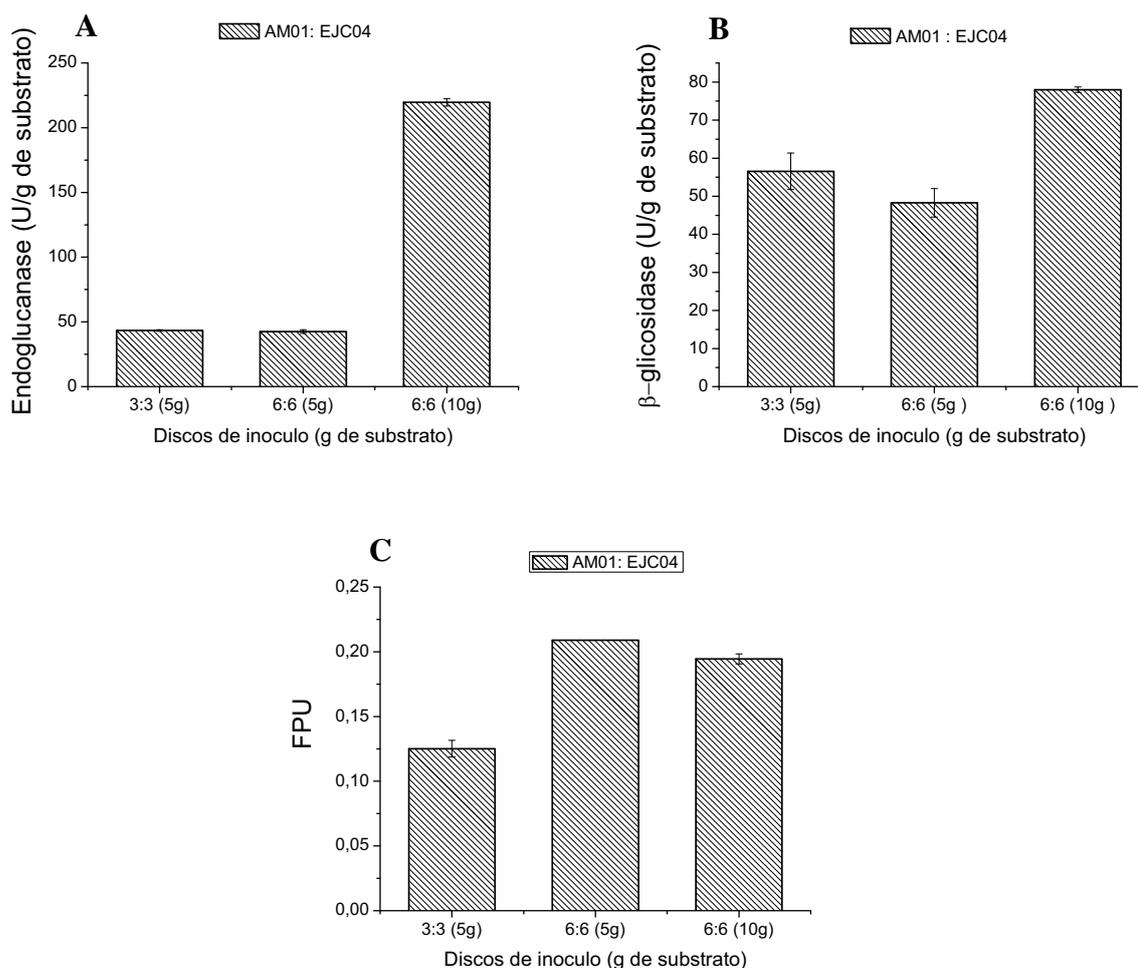
No presente estudo, os parâmetros que foram mantidos por terem proporcionado boas produções enzimáticas em etapas anteriores do trabalho foram: a combinação dos substratos lignocelulósicos farelo de algodão e farelo de trigo (FA:FT) (1:1 m/m),

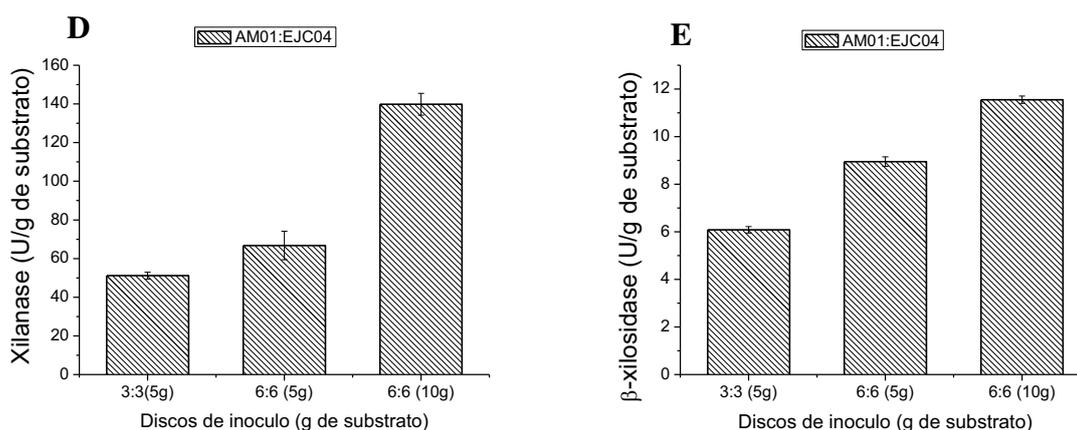
o tempo de cultivo em 8 dias e a umidade inicial do substrato em 65%. Como trata-se de um cultivo misto, foram estudadas a influência da quantidade de discos de inóculo de cada fungo (3 ou 6) e a quantidade de substrato em cada co-cultivo (5 ou 10g). Pode-se observar que a quantidade de inóculo de 6 discos de micélio de cada fungo com a utilização de 10g de substrato (1:1) proporcionou maior produção enzimática, exceto para Fpase, cuja produção foi um pouco superior no cultivo com 6 discos de micélio e 5 g de substrato (1:1) (Figura 30). Outra observação é que as melhores produções obtidas neste cultivo misto se assemelham as produções obtidas pelo isolado AM01 quando cultivado isoladamente.

**Figura 30** - Produção de celulases e xilanases pelo cultivo misto dos isolados AM01 e EJC04 na combinação de substratos farelo de algodão e farelo de trigo (misturas 1:1 m/m).

Uso de 3 (3:3) e 6 (6:6) discos de inóculo de cada fungo.

(A): endoglucanase; (B):  $\beta$ -glicosidase; (C): Fpase (D): xilanase; (E):  $\beta$ -xilosidase.





**Fonte:** elaborado pelo autor.

Dados apresentados na literatura sempre reportam cultivos mistos em que foram otimizados diversos parâmetros, maximizando-se as produções enzimáticas, como no estudo de Dwivedi e colaboradores (2011) que, em cultivo misto de *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 e *Pleurotus ostreatus* MTCC 1804, em FES, na combinação de substrato bagaço de cana e casca de grama preta (3:1) alcançaram uma produção de 8.205,31 U/g de xilanase.

O cultivo misto de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* realizado por Oberoi e colaboradores (2012), em FES, na combinação de resíduos de tangerina e farelo de trigo, proporcionou a produção de aproximadamente 60, 20 e 25 U/g de endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e Fpase respectivamente.

As cepas F3 e F4 de *Aspergillus niger*, em cultivo misto em farelo de trigo e pó de semente de algodão, sob condições otimizadas, produziram 996 e 15.863 U/g de endoglucanase e xilanase respectivamente (WANG; BAI; LIANG, 2006).

Em estudo realizado por Dhillon e colaboradores (2011) com cultivo misto de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, em FES, foram alcançadas produções de 35,8 U/g de Fpase, 33,71U/g de  $\beta$ -glicosidase, 131,34 U/g de CMCase e 3.106,34 U/g de xilanase, utilizando com substrato palha de arroz com farelo de trigo na proporção de 3:2, no cultivo em bandejas.

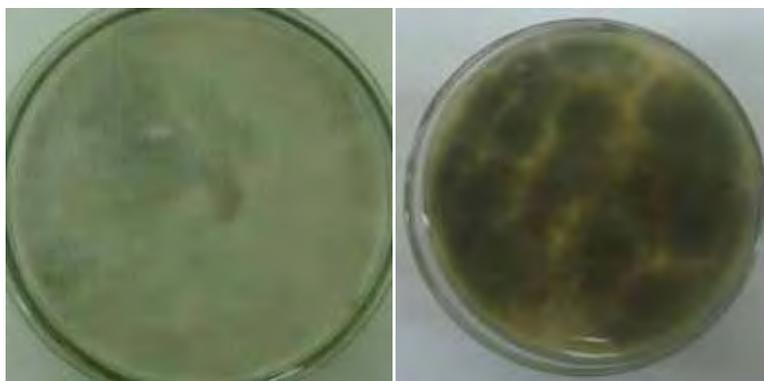
Os resultados obtidos pelo cultivo misto dos isolados AM01 e EJC04 direcionam e estimulam estudos futuros sobre a otimização das condições de cultivo visando aumentar a produção das enzimas para a aplicação das mesmas em processos de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.

### 5.9 Identificação molecular

Apesar de todos os isolados fúngicos endofíticos selecionados para realização do trabalho estarem identificados pelo menos em nível de gênero, fez-se necessário realizar novamente a identificação do isolado AM01, pois o mesmo, foi classificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, porém não apresentava características morfológicas atribuídas a organismos do gênero. Como o isolado EJC04 juntamente com AM01 se destacou na produção das enzimas celulases, optou-se por realizar a identificação a nível molecular de ambos e no caso de EJC04 apenas para confirmação.

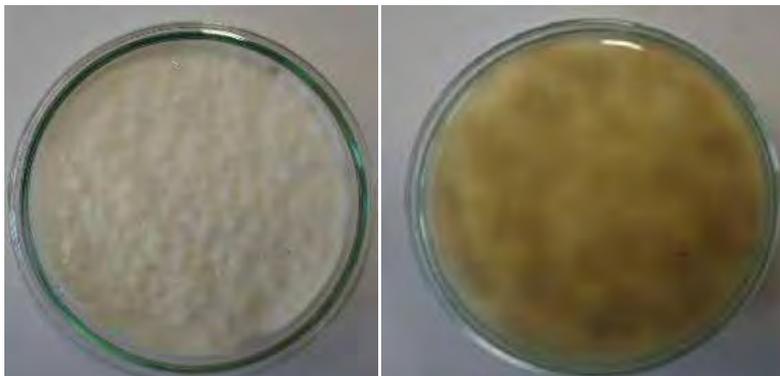
As colônias de AM01 (Figura 31) são inicialmente brancas com aspecto cottonoso baixo, sendo que com o amadurecimento vão se tornando de coloração acinzentada tanto a frente como o verso da placa. Já as colônias de EJC04 (Figura 32) não apresentam pigmentação, as hifas são de crescimento rasteiro.

**Figura 31-** Colônia do isolado AM01 cultivado em meio de cultura PDA (potato agar dextrose). (a) frente; (b) verso.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Figura 32-** Colônia do isolado EJC04 cultivado em meio de cultura PDA (potato agar dextrose). (a) frente; (b) verso.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

A identificação através da análise de características morfológicas não foi possível, pois, ambos os isolados não produziram estruturas como os corpos de frutificação e esporos para que fosse possível a utilização de chaves de identificação. Partiu-se então para identificação a nível molecular.

A técnica utilizada para taxonomia dos fungos foi a amplificação da região ITS do rDNA por PCR como descrito no item 4.11.

A partir da análise da região ITS do rDNA foram obtidas sequências de 837 e 537 pares de bases para os isolados fúngicos AM01 e EJC04, respectivamente (Figuras 33 e 34). As sequências dos dois isolados quando submetidas ao Genbank, apresentaram os maiores scores com as sequências de diferentes estirpes dos gêneros *Saccharicola* sp. (sequência de EJC04) e *Botryosphaeria* sp. (sequência nucleotídea obtida a partir do isolado AM01), com possibilidade de identificação dos isolados (Tabela 2).

**Figura 33-** Sequência de pares de bases obtidas do isolado fúngico AM01 a partir da análise da região ITS do rDNA.

```
GCCCCCCTTTCGGCAAGGACGCGTGTGACGCCCTGACGACTATAAACAA
GAGGGACACGCAAGTCGGCCTGCGGGCCGGCGACACTTTCGAATTGCGG
GGATATCCTTAGAGCTCTGCCTACCAACCCGGGGGGGAAACCCCTCGGG
GGCCGGTGTTAACAGCACCGGGGTGCGGTAAGAATGGTCAGAGATTGGAC
AATCCGCAGCCAAGCCCCTACGTCCC GCGGGATATGGGGAAGGTTCAACA
GACTAAGTGGAAGTGGGTGCGGCCGTTTCGACCGCGCTTAAGATATAGTC
GGGCCCTGGCGAAAGCCAGGGGGTAAGTCACTGCACTTTGAACCGTTC
CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTGATTGCGGGCTCCGGC
CCGATCCTCCCACCCTTTGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCG
GTTCTCCGCGGCCGCCCCCTCCCCGGGGGGTGGCCAGCGCCCGCCAGAG
GACCATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGATGCAGTCTGAAAAACATTTAAT
AACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCT
GTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTC
CTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGAGTGGCGTCTTGCCTCAAGC
GTAGTAGAACATACATCTCTGTTTTTATTATGAAAAAAAGC
```

**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Figura 34-** Sequência de pares de bases obtidas do isolado fúngico EJC04 a partir da análise da região ITS do rDNA.

```
TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATTACGCAAGCTATAGC
CCCTCCGGGGGTTATTGCATCCACCCTTTGTCTACTTGTACCTCTTGTTGT
TTCTCGGCAGGCTTGCCTGCCGCTAGGAACCCATCAAACCCTTGATTC
ATAGTATTAATAATCTCTGATAACTATTTAAATTATTACAACCTTCAACAAT
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAG
TAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTCGGTATTCCGTGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACACC
CTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCGTCTGTCCCCTTTACGCGTGGACTCG
CCCTAAAGTCATTGGCAGCGGTCGTGCCAGCTTCTCGCGCAGCACATTTG
CGTTTCTTGAAGTTTGGTGGATCAGCATCCAGTAAGCTCTTTTATGACTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
```

**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Tabela 2.** Sequências encontradas com a maior similaridade de nucleotídeos com as sequências analisadas dos isolados AM01 e EJC04 e porcentagens de similaridades recuperadas a partir do GenBank.

AM01			EJC04		
Isolados <sup>1</sup>	Similaridade	Número de acesso <sup>2</sup>	Isolados <sup>1</sup>	Similaridade	Número de acesso <sup>2</sup>
<i>Botryosphaeria dothidea</i> MGEF23	95%	KC492466.1	<i>Saccharicola</i> sp.	97%	GQ370379.1
<i>Botryosphaeria dothidea</i> MGEF9	95%	KC492452.1	<i>Saccharicola</i> clone SB1_1	100%	KC753446.1
<i>Botryosphaeria fuispora</i> MFLUCC 10-0098	94%	JX646789.1	<i>Saccharicola bicolor</i> ATCC 42652	98%	U04203.1
<i>Botryosphaeria dothidea</i> MGEF34	95%	KC492477.1	<i>Saccharicola bicolor</i> wb557	99%	AF455415.1

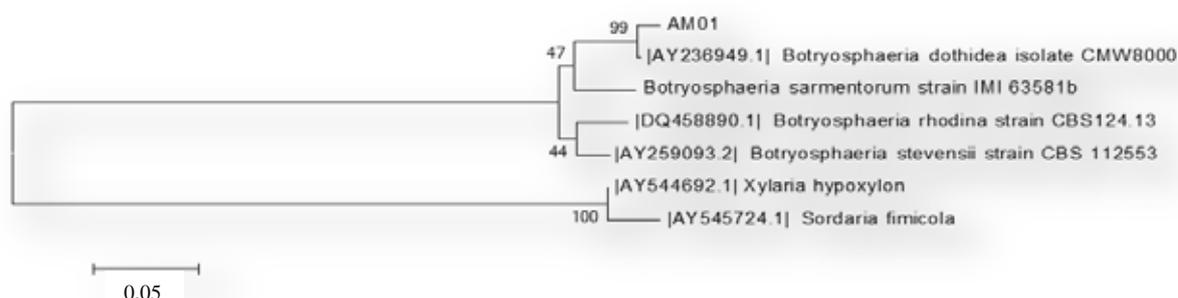
1- Isolados e 2-número de acesso dos mesmos depositados no GenBank – NCBI.

**Fonte:** National Center for Biotechnology Information, (2013).

Consultando-se a literatura (PHILLIPS et al., 2008) foi possível construir uma árvore filogenética do isolado AM01 e, devido ao índice de similaridade da sequência ITS (cerca de 99%) (Figura 35), o isolado pode se tratar de uma espécie de *Botryosphaeria dothidea*.

Não foi possível construir a árvore filogenética do isolado EJC04 por falta de informações na literatura a respeito de regiões ITS depositadas em bancos de dados.

**Figura 35** – Dendograma filogenético da sequência do fungo AM01 baseado na análise Neighbor-joining da região ITS rDNA com base em 1000 replicatas de “bootstrap”. Os isolados *Xylaria hypoxylon* e *Sordaria fimicola* foram utilizados como “outgroup”.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

## 6. CONCLUSÕES

Pelos dados apresentados no presente trabalho, conclui-se que:

- ❖ De modo geral, todos os fungos avaliados são potenciais produtores das enzimas de degradação de material vegetal estudadas;
- ❖ A exploração de diferentes materiais lignocelulósicos como substratos para o cultivo dos fungos em FES mostrou que alguns deles são capazes de induzir significativamente a produção das enzimas por alguns isolados;
- ❖ Os isolados *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 foram os mais versáteis quanto à produção de todas as enzimas avaliadas em diferentes substratos, sendo que a combinação FA:FT induziu significativamente a produção em de celulasas ambos os fungos;
- ❖ As celulasas e xilanases produzidas pelos isolados acima citados apresentaram características interessantes quanto a estabilidade a variações de pH e temperatura e inibição por produto final, o que estimula a aplicação destas em processos de sacarificação de bagaço de cana de açúcar visando produção de etanol de segunda geração em trabalhos futuros;
- ❖ Pelos resultados obtidos pode-se inferir que os fungos endofíticos são uma fonte muito interessante para produção de enzimas em FES, o que estimula o desenvolvendo de diversos estudos dentro do grupo de pesquisa.

## APÊNDICE

**Tabela 3.** Produção de amilase e Exo-PG por isolados endofíticos (U/g), em FES, em (misturas 1:1 m/m) de farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BC) e aveia (AV).

ISOLADOS	AMILASE		EXO-PG	
	FA:FT	BC:AV	FA:FT	BC:AV
PAJ 01	12,14	0,00	20,47	15,86
SC 04	319,12	25,60	42,12	25,23
SF 021	52,70	1.547,56	16,24	16,72
PAJ 03	149,35	0,00	27,16	287,15
CV 04	300,59	2,59	208,45	90,04
XYA 04	294,26	0,00	26,73	120,28
AM01	77,18	0,44	68,00	84,42
EJC04	208,45	1,51	240,57	487,58

**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Tabela 4.** Produção de amilase e Exo-PG pelos isolados AM01 e EJC04 (U/g), em FES, em farelo de algodão (FA) e farelo de trigo (FT), na avaliação da influência do tempo de cultivo (horas) na produção das enzimas.

TEMPO DE CULTIVO (horas)	EJC04		AM01	
	AMILASE	EXO-PG	AMILASE	EXO-PG
48	31,57	83,57	51,46	24,83
96	47,27	378,97	80,70	27,73
144	41,32	297,82	79,63	28,27
192	39,57	205,32	77,58	27,41
240	371,34	63,88	78,16	23,49
288	1.169,59	76,25	767,05	27,68
336	3.079,92	77,33	783,62	29,62

**Fonte:** elaborado pelo autor.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, P. B.; ACHARYA D. K.; MODI, H. A. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 22, p. 4147-4152, 2008.

AIYER, P. V. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1525-1529, 2005.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; BISCHOFF, K. M.; FALKOSKI, D. L.; PEREIRA, O. L.; GONÇALVES, D. S. P. O.; REZENDE, S. T. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 594-610, 2011.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

ARVELA, P. M.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFÖR, S.; MURZIN, D. Y. U. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- a review. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5638-5666, 2011.

BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T. Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 305-309, 1995.

BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of  $\alpha$ -Amylase from *P. chrysogenum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 439-442, 2007.

BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONARY, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 108, p. 737-748, 2003.

BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M.; AGOSIN, E.  $\beta$ -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1453-1459, 2003.
- BIGELOW, P.; WYMAN, E. Production of cellulolytic on bagasse pretreated with chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102 p. 78-82, 2004.
- BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Xylanase and p-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 613-616, 1988.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência. 2008.
- BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S; VADLANI, P. V. Production of cellulolytic enzyme system in mixed culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 120-128, 2010.
- BUSELLI, R. A. F.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Estrutura, organização e funções dos complexos da sintase da celulose em plantas superiores. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, p. 259-272, 2005.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.
- COUGHLAN, P.; LJUNGDAHL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. **FEMS Symposium**, v. 43, p. 11-30, 1988.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 137 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

- DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- DEL RIO, J. C.; MARQUES, G.; RENCORET, J.; MARTINEZ, A. T.; GUTIERREZ, A. Occurrence of naturally acetylated lignin units. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5461-5468, 2007.
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Source**, v. 27, p. 327-337, 2005.
- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v.102, p. 6065-6072, 2011.
- DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.
- DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992.
- DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 404-411, 2009.
- DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.
- DWIVEDI, P.; VIVEKANAND, V.; PAREEK, N.; SHARMA, A.; SINGH, R. P. Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 616-626, 2011.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research: Oxford Journals**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.
- EI-BONDKLY, A. M.; EI-GENDY, M. M. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant strain of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 331-346, 2012.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRIGUEZ, U. F. Z.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 22, 2008. Disponível em:

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/31744/1/BPD222008.pdf>>.

Acesso em: 27 jun. 2013.

FERNANDEZ, E. R. D. P.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 685-690, 2002.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

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

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, p. 1791-1798, 2004.

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

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; LUKASIC, R. B. Hemicellulose. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R. da; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1- 22, 2008.

GUIMARÃES, L. H. S.; NOGUEIRA, S. C. P.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; BARBOSA JUNIOR, A.; POLIZELI, M. de. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.

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

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WOSTEN, H. A. B.; GU, J. B.; VRIES, R. P. de. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 248-252, 2011.

ISMAYA, W. T.; HASAN, K.; SUBROTO, T.; NATALIA, D.; SOEMITRO, S. **Chromatography as the major tool in the identification and the structure-function relationship study of amylolytic enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera* R64**. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/chromatography-as-the-major-tool-in-the-identification-and-the-structure-function-relationship-study>>. Acesso em: 27 jun. 2013.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JONES AND BARTLETT PUBLISHERS. **Carbohydrates**. 2013. Disponível em: <<http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.

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

KAPOOR, D.; KUMAR, V.; CHANDRAYAN, S. K.; AHMED, S.; SHARMA, S.; DATT, M.; SINGH, B.; KARTHIKEYAN, S.; GUPTASARMA, P. Replacement of the active surface of a thermophile protein by that of a homologous mesophile protein through structure-guided protein surface grafting. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 1771-1776, 2008.

KAPOOR, N.; TYAGI, M.; KUMAR, H.; ARYA, A.; SIDDIGUI, M. A.; AMIR, A.; MALIK, A. S. Production of cellulase enzyme by *Chaetomium sp* using wheat straw in solid state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, p. 1199-1206, 2010.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, p. 41-53, 2010.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; KAUR, G. S.; SAINI, H. S. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 260-270, 2007.

KHALIL, A. I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 753-759, 2002.

KIM, S.; KIM, C. H. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 61-67, 2012.

KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B. **Química da madeira**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 2005. 96 p. (Série didática nº 01/05).

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Cell associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, v. 26, n.1/2, p. 60-67, 2009.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite –what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

KORMELINK, F. J.; GRUPPEN, H.; VIETOR, R. J.; VORAGEN, A. G. Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 249, n. 2, p. 355-367, 1993.

KRISHNA, S. H.; CHOWDARY, G. V. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1971-1976, 2005.

KURASHIMA, K. et al. Enzymatic beta-glycosidation of primary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 87-98, 2003.

LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL. **Etanol emite 73% menos CO<sub>2</sub> que a gasolina**. 2009. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br/noticias/detalhe.php?ID=Mjl=>>>. Acesso em: 31 maio 2013.

LAKSHMIKANT, K.; MATHUR, S. N. Cellulolytic activities of *Chaetomium globosum* on different cellulosic substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 23-26, 1990.

LEE, S.; JANG, Y.; LEE, Y. M.; LEE, J.; LEE, H.; KIM, G. H.; KIM J. J. Rice straw-decomposing fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1322-1329, 2011.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. L.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

LEITE, R. S. R.; PRADO, H. F. A.; CABRAL, H.; PAGNOCCAB, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulansin* in agricultural wastes. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LIANG, X.; HUANG, Y.; HUA, D.; ZHANG, J.; XU, H.; LI, Y.; ZHANG, X. Cellulase production by *Aspergillus* sp. on rice grass (*Spartina* spp.) under solid-state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 39, p. 6785-6792, 2012.

LIMA, B. M.; CAMARGO, L. E. A. Biocombustível & biotecnologia: etanol celulósico. In: SEMINÁRIO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2009, Piracicaba. [Trabalho apresentado...]. Piracicaba, ESALQ/USP, 2009. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/BMLima-200901-Seminario.pdf>> Acesso em: 31 maio 2013.

LIMA, C. A. F. **Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido**. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 717-725, 2011.

LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of soy sauce koji mold spores inoculum in plastic bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224-1226, 1985.

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

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; HAMINIUK, C. W. I.; FENDRICH R. C.; DELLA, B. E.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Xylanase production by *A. niger* in SSF. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p.183-189, 2008.

MAHESHWARI, D. K.; GOHADE, S.; PAUL, J.; VARMA, A. Paper mill sludge as a potential source for cellulase production by *T. reesei* QM 9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 161-163, 1994.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by products of the citrus processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MATTHEWS, J. F.; SKOPEC, C. E.; MASON, P. E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R. W.; SUGIYAMA, J. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose  $\beta$ . **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 138-152, 2006.

MAURYA, D. P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 5-8, 2012.

MERHEB-DINI, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104 p. 127-131, 2007.

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

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

MUTHEZHILAN, R.; ASHOK, R.; JAYALAKSHMI, S. Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 20-28, 2007.

NADALINI, M. F. C. **Caracterização genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii***. 1997. 111 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica, 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

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

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; DHALIWAL, S. S.; KAUR, S.; VADLANI, P. V.; BHARGAV, V. K.; PATIL, R. T. Enhanced oil recovery by pre-treatment of mustard seeds using crude enzyme extract obtained from mixed-culture solid-state fermentation of kinnow (*Citrus reticulata*) waste and wheat bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 759-767, 2012.

OKUNOWO, W. O.; GBENLE, G. O.; OSUNTOKI, A. A; ADEKUNLE, A. A. Media studies on *Myrothecium roridum* Tode: a potential biocontrol agent for water hyacinth. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 4, p. 55-56, 2010.

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

OROZCO, A. L.; PÉREZ, M. I.; GUEVARA, O.; RODRÍGUEZ, J.; HERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; POLVILLO, O.; ARIAS, M. E. J. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 81, p. 247-252, 2008.

OYELEKE, S. B.; OYEWOLE, O. A.; EGWIM, E. C.; DAUDA, B. E. N.; IBEH, E. N. Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 78-83, 2012.

PANDAYA, J. J.; GUPTA, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 769-779, 2012.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.

PEREZ, L. L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121/124, p. 1081-1100, 2005.

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

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R.; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. **Persoonia**, v. 21, p. 29-55, 2008.

PONSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

PRADO, I. N.; MARTINS, A. S. Efeito da substituição do farelo de algodão pelo farelo de canola no desempenho de novilhas nelore confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 6, p. 1390-1396, 1999.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar**. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAVINDRAN, C.; NAVEENAN, T.; VARATHARAJAN, G. R. Optimization of alkaline cellulase production by the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. using agricultural and industrial wastes as substrates. **Botanica Marina**, v. 53, n. 3, p. 275-282, 2010.

RAVIRAJA, N. S.; MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the western ghats of India. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, p. 515-520, 2006.

RIBEIRO, R. D. X.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; FARIA, E. F. S.; GARCEZ NETO, A. F.; SILVA, T. M.; BORJA, M. S.; CARDOSO NETO, B. M. Capim-tanzânia ensilado com níveis de farelo de trigo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 631-640, 2008.

RIOU, C.; SALMON, J. M.; VALLIER, M. J.; GUNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

RODRIGUEZ, U. F. Z.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROSÉS, R. P.; GUERRA, N. P. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1929-1939, 2009.

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

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

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYSSÖNEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M. PENTTILÄ, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.

SANTOS, M. M.; ROSA, A. S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D. A.; KRIGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Technology**, v. 93, p. 261- 268, 2004.

SENGUPTA, S.; GHOSH, A. K. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase enzymes from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1076, p. 215-220, 1991.

SHARMA, N.; BURGOHAIN, P.; KAUSHAL, R.; TANDON, D. Use of microwave pretreated *Cedrus deodara* wood residue as a substrate for enhanced production of cellulase free xylanase from *Geotrichum* sp. F3 isolated from rural compost. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 4, p. 621-631, 2012.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R. da; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570-1580, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOLIMAN, H. M.; SHERIEF, A. A. D.; TANASH, A. B. Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues. **International Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 1, p. 46-57, 2012.

SONG, J. M.; WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1930-1934, 2010.

SORENSEN, A.; AHRING, B. K.; LÜBECK, M.; UBHAYASEKERA, W.; RUNO, K. S.; CULLEY, D. E.; LÜBECK, P. S. Identifying and characterizing the most significant  $\beta$ -glucosidase of the novel species *Aspergillus saccharolyticus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 1035-1046, 2012.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

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

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744-4753, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

THEVENOT, M.; DIGNAC, M. F.; RUMPEL, C. Fate of lignins in soils: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1200-1211, 2010.

THOMSEN, M. H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 598-606, 2005.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UNITED STATES OF AMERICA DEPARTMENT OF ENERGY. Office of Science. **Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda**. Washington, DC, 2006. (DOE/SC-0095). Disponível em: <[http://www.inl.gov/bioenergy/reports/d/1005\\_breaking\\_the\\_barriers\\_optimized.pdf](http://www.inl.gov/bioenergy/reports/d/1005_breaking_the_barriers_optimized.pdf)>. Acesso em: 28 jun. 2013.

VERMA, P.; MADAMWAR, D. Production of ligninolytic enzymes for dye colorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102/103, n. 1/6, p. 109-118, 2002.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 4, p. 329-418, 1989.

VIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13-24, 2012.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973.

VINOGRADOVA, S. P.; KUSHNIR, S. N. Biosynthesis of hydrolytic enzymes during co-cultivation of macro and micromycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, p. 573-575, 2003.

- VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of a fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid-state fermentation for the hyper-production of rawstarch-digesting enzyme. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 718-26, 2010.
- XIA, L.; CEN, P. L. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 909-912, 1999.
- WANG, X. J.; BAI, J. G.; LIANG, Y. X. Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 533-540, 2006.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-321.
- WHITNEY, S. E. C.; GIDLEY, M. J.; McQUEEN-MASON, S. J. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. **Plant Journal**, v. 22, n. 4, p. 327-334, 2000.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.
- WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Hydrolysis of cellulose and hemicelluloses. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2005. Cap. 43, p. 995-1033.
- WIPUSAREE, N.; SIHANONTH, P.; PIAPUKIEW, J.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Purification and characterization of a xylanase from the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from the Thai medicinal plant, *Croton oblongifolius* Roxb. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 5697-5712, 2011.
- YAN, T. R.; LIN, Y. H.; LIN, C. L. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 431-437, 1998.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.  $\beta$ -glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004.
- ZHANG, H.; SANG, Q. Statistical optimization of cellulases production by *Penicillium chrysogenum* QML-2 under solid-state fermentation and primary application to chitosan hydrolysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1163-74, 2012.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M. A.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Economic analysis of cellulose production methods for bio-ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 23, p. 679-687, 2007.

ZILLY, A.; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1573-1580, 2012.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.