
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE CELULASES,
XILANASES E FERRULOIL ESTERASE PARA BIOCONVERSÃO DE BAGAÇO DE
CANA DE AÇÚCAR EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

MARCIA MARIA DE SOUZA MORETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE CELULASES,
XILANASES E FERRULOIL ESTERASE PARA BIOCONVERSÃO DE BAGAÇO DE
CANA DE AÇÚCAR EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

MARCIA MARIA DE SOUZA MORETTI

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes
Co-orientadora: Dr^a Daniela A. Bocchini-Martins

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada

Março - 2010

576

Moretti, Marcia Maria de Souza

M845i

Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis / Marcia Maria de Souza Moretti. - Rio Claro : [s.n.], 2010

112 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Eleni Gomes

Co-Orientador: Daniela Alonso Bocchini-Martins

1. Microorganismos. 2. Etanol - Produção - Segunda geração. 3. Fermentação - Estado sólido. 4. Pré tratamento. 5. Hidrólise enzimática. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico:

À meus pais, Nílce e João, por todo amor, dedicação e por dar sentido a tudo.

Ao meu irmão, André, pela imensa amizade, amor, incentivo e entusiasmo.

Ao meu noivo, Florisvaldo, pelo bom humor, paciência, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes, pela confiança depositada, incentivo e orientação.

À Dr^a Daniela Alonso Bocchini-Martins, pela co-orientação, esclarecimento de dúvidas e parceria na realização dos experimentos.

Ao Prof^º. Dr^º. Maurício Boscolo, pelo apoio incondicional durante a realização deste projeto, por emprestar seu laboratório e pelas dúvidas esclarecidas.

Ao Prof^º. Dr^º. Roberto da Silva, pelo esclarecimento de dúvidas.

À Dr^a Lara Durães Sette e ao Dr^º Andre Rodrigues, pela disposição na identificação dos microrganismos isolados durante a realização da primeira etapa do projeto.

À Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco, por emprestar seu laboratório, durante a realização de uma parte deste projeto. À Denise, Larissa, Taís e especialmente à Raquel, pela ajuda nas análises com o HPAEC-PAD.

A coordenadora, Sandra Mara Martins Franchetti, pela dedicação no atendimento junto aos funcionários da Seção de Pós-graduação que foram sempre muito solícitos.

Aos Prof^{os}. Dr^{os}. Hamilton Cabral, Heloiza Ferreira e Rodrigo Leite, pela ajuda e incentivo nas etapas iniciais deste projeto.

À Paula Mendes de Freitas pelas primeiras lições na pesquisa científica.

A Christiane pela amizade e o apoio técnico no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

À Luiz Henrique Florindo, Paula de Freitas e Flaviana de Freitas, por terem me acolhido em São José do Rio Preto, pelo incentivo, paciência e afeto nestes últimos anos. A amizade de vocês foi e será sempre muito valiosa.

À Andréia Jacomassi, pela sincera amizade e companheirismo durante as viagens para realização das disciplinas.

Aos meus colegas e amigos dentro e fora do laboratório Ariani, Carol Bezerra, Barbara, Barbara Bonini, Gisele, Larissa, Tiago, Tássia, Rodolfo, Lilian, André, Milla, Ana Flávia. Especialmente aqueles com quem convivi por mais tempo Fabiana, Aline, Carol Merheb, Ellen, Ricardo, Moisés, Natalia, Livia, Marcelo e Ana Lúcia, pela ajuda, incentivo e momentos felizes nos últimos anos.

Ao CNPq pela concessão de bolsa.

A CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

À Deus, acima de tudo!

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto.

Obrigada!

*“...O mundo vai girando
Cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
E o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência...*

*Será que é tempo
Que lhe falta prá perceber?
Será que temos esse tempo
Prá perder?
E quem quer saber?
A vida é tão rara
Tão rara...*

*Mesmo quando tudo pede
Um pouco mais de calma
Mesmo quando o corpo pede
Um pouco mais de alma
Eu sei, a vida não pára
A vida não pára não...*

A vida não pára...”

Paciência

Composição: Lenine e Dudu Falcão

RESUMO

Dos 27 microrganismos recém isolados, *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp M.7.7 foram os melhores produtores de FPase (0,8 e 2,0 U/g de substrato) e xilanase (1040 e 1292 U/g de substrato), quando cultivados por fermentação em estado sólido (FES) em mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). As produções máximas de xilanase (7237,9 U/g de substrato) e endoglucanase (46,2 U/g de substrato) por *A. fumigatus* M.7.1 foram observadas pelo cultivo do fungo em palha de milho e farelo de trigo (9:1 p/p) e bagaço de cana e farelo de trigo (9:1 p/p), respectivamente. Em relação ao isolado *Myceliophthora* sp M.7.7, os picos de produção de ambas as enzimas (xilanase: 1044,6 U/g de substrato; endoglucanase 53,7 U/g de substrato) foram obtidos quando este foi cultivado em mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (9:1 p/p). A endoglucanase e xilanase produzida por *A. fumigatus* M.7.1 apresentaram atividade ótima em pH 4,5, a 70 e 60 °C, respectivamente. Nos ensaios com a linhagem *Myceliophthora* sp M.7.7, ambas as enzimas apresentaram maior atividade em pH 5,0 a 65-70 °C. Ambas as enzimas de *Myceliophthora* sp M.7.7 e a endoglucanase de *A. fumigatus* M.7.1 mantiveram aproximadamente 70-100% da atividade inicial na faixa de pH entre 3,5 a 9,0 e nas temperaturas de 35 a 65 °C. A xilanase de *A. fumigatus* M.7.1 manteve-se estável em pH entre 5,5 e 10,5 e 40 e 50 °C, respectivamente. Dos tratamentos ao qual o bagaço foi submetido, o que mostrou maior eficiência na liberação de açúcares redutores (0,09%) e compostos fenólicos (0,74%), foi a solução de glicerol em microondas por 5 min. O bagaço de cana pré tratado com glicerol foi incubado com o preparado enzimático de *A. fumigatus* M.7.1 a 55 °C. Após 24 h de incubação, foram liberados 0,7 mg/mL de açúcar redutor. As mesmas condições foram utilizadas na sacarificação do bagaço utilizando o extrato enzimático produzido por *Myceliophthora* sp M.7.7, havendo a liberação de 0,5 mg/mL de açúcar redutor. Os resultados de peso seco após a hidrólise não foram significativos, chegando no máximo 10% de perda da massa inicial. Nas análise por HPAEC-PAD foi possível identificar 6 carboidratos (glicose, xilose, celobiose, xilobiose, arabinose e galactose) nos hidrolisados de *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp M.7.7. A endoglucanase de ambos microrganismo e a endoxilanase e β -xilosidase de *A. fumigatus* M.7.1 não sofrem efeito inibitório pela xilose e glicose, quando estes são adicionados na mistura de reação, enquanto que ambas β -glucosidase e a xilanase de *Myceliophthora* sp. M.7.7 perderam 60% e 40% da atividade inicial em 20 mM de glicose e 8 mM de xilose, respectivamente.

Palavras-chave: bagaço de cana, fungo termofílico, fermentação estado sólido, hemicelulases, celulases, pré tratamento, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The microorganisms *A. fumigatus* M.7.1 and *Myceliophthora* SP M.7.7 were the best producers of FPase (0,8 and 2,0 U/g of substrate) and xylanase (1040 and 1292 U/g of substrate) of the 27 isolated microorganisms, when cultivated by solid state fermentation (SSF) in a mixture of cane bagasse and wheat bran (1:1). The greatest production of xylanase (7237,9 U/g of substrate) and endoglucanase (46,2 U/g of substrate) by *A. fumigatus* M.7.1 were noted by the fungi cultivation in corn straw and wheat bran (9:1 p/p) and cane bagasse and wheat bran (9:1 p/p), respectively. In the isolated *Myceliophthora* sp M.7.7, the peak production of the both enzymes (xylanase: 1044,6 U/g of substrate; endoglucanase 53,7 U/g of substrate) were obtained when the microorganism were cultivated in a mixture of cane bagasse and wheat bran (9:1 p/p). The endoglucanase and the xylanase produced by *A. fumigatus* M.7.1 showed higher activity in pH 4,5, at 70 and 60 °C, respectively. In the essays with the *Myceliophthora* sp M.7.7 strains, the both enzymes showed higher activity in pH 5,0, at 65-70 °C. The both enzymes of *Myceliophthora* sp M.7.7 and the endoglucanase of *A. fumigatus* M.7.1 maintained approximately 70-100% of the initial activity between pH 3,5 and 9,0 and between 35 and 65 °C. The xylanase of *A. fumigatus* M.7.1 was stable between the pH 5,5 and 10,5 and the temperature 40 and 50 °C. About the treatments of the bagasse, the most efficient in the liberation of reducing sugars (0,09%) and phenolic compounds (0,74%) was the glycerol solution in microwave for 5 minutes. The cane bagasse pretreated with glycerol was incubated with the enzymatic solution of *A. fumigatus* M.7.1 at 55 °C. After 24 hours of incubation, 0,7mg/mL of reducing sugar was liberated. The same conditions were used in the saccharification of the bagasse using the enzymatic extract produced by *Myceliophthora* sp. M.7.7, with a reducing sugar liberation of 0,5 mg/mL. The dry weight results after the hydrolysis were not significant, with a maximum of 10% loss of the initial mass. In the HPAEC-PAD analysis, was possible to identify 6 carbohydrates (glucose, xylose, cellobiose, xylobiose, arabinose and galactose) in the hidrolysated of *A. fumigatus* M.7.1 and *Myceliophthora* sp.M7.7. The endoglucanase of both microorganisms and the endoxylanase and β -xylosidase of *A. fumigatus* M.7.1 don't have inhibitory effect when the xylose and the glyucose are added to the reaction. But the β -glucosidase and the xylanase of *Myceliophthora* sp. M.7.7 lost 60% and 40% of the initial activity in 20 mM of glucose and 8mM of xylose, respectively.

Keywords: cane bagasse, thermophilic fungi, solid state fermentation, hemicellulases, cellulases, pretreated, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo I

Figura 1: Estrutura representativa (a) cadeias de celulose e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose.....	17
Figura 2: (a) Esquema representativo da estrutura de <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. (b) estrutura de arabino 4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana presente em madeiras macias.....	19
Figura 3: Os fenilpropanóides constituintes da lignina.....	20
Figura 4: Representação esquemática da parede secundária da planta mostrando as cadeias lineares da celulose e as ramificadas da hemicelulose imersas em uma matriz de lignina.....	21
Figura 5: Representação esquemática de um sistema celulolítico.....	22
Figura 6: Representação esquemática do sistema hemicelulose.....	24
Figura 7: Ciclo catalítico das lacases.....	25
Figura 8: Mecanismo de reação das lacases via mediador (Med).....	26
Figura 9: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP).....	27
Figura 10: Ciclo catalítico das manganês peroxidases.....	28
Figura 11: Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorre durante a FES.....	29
Figura 12: Representação esquemática da ação do pré tratamento sobre o material lignocelulósico.....	35

Figura 13: Esquema ilustrativo mostrando as diferenças entre, (a) hidrólise e fermentação separada (HFS) e (b) sacarificação e fermentação simultânea (SFS).....	39
---	----

Capítulo II

Figura 1: Hemicellulolytic enzyme production by <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1 in SSF using different crops and agro-industrial wastes mixtures (9:1 w/w).....	74
---	----

Figure 2: Hemicellulolytic enzyme production by <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7 in SSF using different crops and agro-industrial wastes mixtures (9:1 w/w).....	75
--	----

Figura 3: Effect of pH and temperature on activity of xylanase (■) and Endo-glucanase (○) produced by <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1 (a-c) and <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7.(b-d).....	76
--	----

Figure 4: Effect of pH and temperature on stability of xylanase (■) and Endo-glucanase (○) produced by <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1 (a-c) and <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7 (b-d) when in absence of substrate.....	77
--	----

Capítulo III

Figura 1: Liberação de açúcares redutores (mg/100 mg peso seco), a 55°C, utilizando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1.....	92
--	----

Figura 2: Liberação de açúcares redutores (mg/100 mg peso seco), a 55°C, utilizando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7.....	93
---	----

Figura 3: Peso seco do bagaço de cana após hidrólise enzimática utilizando as enzimas produzidas por <i>Aspergillus fumigatus</i> . M.7.1.....	95
---	----

Figura 4: Peso seco do bagaço de cana após hidrólise enzimática utilizando as enzimas produzidas por <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7.....	96
Figura 5: Padrões usados na identificação dos carboidratos identificados nas análises feitas por HPAEC-PAD.....	97
Figura 6: Efeito da (■) glicose e (●) xilose sobre as atividades de, endoglucanase (a), endoxilanase (b), β -glucosidase (c) e β -xilosidase (d) de <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1.....	102
Figura 7: Efeito da (■) glicose e (●) xilose sobre as atividades de, endoglucanase (a), endoxilanase (b) e β -glucosidase (c) de <i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7.. ..	103

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo I

Tabela 1: Produção de enzimas lignocelulolíticas por diferentes fungos, utilizando-se resíduos lignocelulósicos como substrato em FES.....	31
---	----

Tabela 2: Produção de enzimas ligno-hemi-celulolíticas por diferentes fungos isolados de ambientes em processo de decomposição.....	33
--	----

Capítulo II

Tabela 1: Xylanase and cellulase (FPase) production by thermophilic fungal strains in SSF using sugarcane bagasse and wheat bran as substrate (1:1 w/w).....	73
---	----

Capítulo III

Tabela 1: Produção de xilanases, celulasas e ligninases por <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1 e <i>Myceliophthora sp.</i> M.7.7, após 240 e 196 h de cultivo em FES, respectivamente, usando misturas de palha de milho e farelo de trigo, e bagaço de cana e farelo de trigo.....	87
--	----

Tabela 2: Liberação de açúcares redutores e fenóis do bagaço de cana de açúcar suspenso em diferentes soluções, após 5 min de tratamento em microondas.....	89
--	----

Tabela 3: Preparado enzimático de <i>A. fumigatus</i> M.7.1 e <i>Myceliophthora sp.</i> M.7.7 utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço.....	90
--	----

Tabela 4: Análises por HPAEC-PAD dos carboidratos liberados do bagaço de cana de açúcar após 24 h de hidrólise enzimática.....	100
---	-----

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
I.1.1 Biomassa lignocelulósica.....	17
I.1.2 Enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal... ..	21
I.1.2.1 Celulases, Hemicelulases e Pectinases	22
I.1.2.2 Ligninases.....	25
I.1.3 Uso de resíduos agroindustriais como substratos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas microbianas.....	28
I.1.4 Microrganismos e enzimas termofílicas.....	32
I.1.5 Pré tratamento da biomassa lignocelulósica.....	34
I.1.6 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....	37
I.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
 CAPÍTULO II- Selection of thermophilic and thermotolerant fungi and production of cellulases and xylanase by solid-state fermentation.....	 51
II.1. INTRODUCTION.....	53
II.2. MATERIAL AND METHODS.....	54
II.2.1 Microorganisms- isolation, identification and maintenance.....	54
II.2.2 Enzyme production by solid-state fermentation (SSF).....	56
II.2.3 Enzyme activity measurements.....	57
II.2.4 Enzymes properties.....	57
II.3. RESULTS AND DISCUSSION	58
II.3.1 Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi.....	58
II.3.2 Production of xylanase and cellulase (FPase) by the isolated fungal strains.....	59
II.3.3 Production of xylanase, endoglucanase (CMCase) and β -glucosidase by <i>Myceliophthora</i> and M.7.7 and <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> M.7.1.....	61
II.3.4 Enzymes properties.....	63
II.4 ACKNOWLEDGMENTS.....	65
II.5 REFERENCES.....	66

CAPÍTULO III- Hidrólise Enzimática de bagaço de cana de açúcar tratado com microondas para produção de açúcares.....	78
III.1 INTRODUÇÃO.....	80
III.2 MATERIAL E MÉTODO.....	82
III.2.1 Microrganismos e produção das enzimas.....	82
III.2.2 Medida das atividades enzimáticas.....	82
III.2.3 Tratamento do bagaço de cana de açúcar.....	84
III.2.4 Hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	84
III.2.5 Efeito da glicose e xilose sobre as atividades de endoglucanase, endoxilanase, β -glicosidase e β -xilosidase	85
III.2.6 Métodos analíticos.....	85
III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
III.3.1 Produção das enzimas por FES.....	86
III.3.2 Tratamento do bagaço com microondas e hidrólise enzimática.....	88
III.3.3 Análises do peso seco do bagaço e identificação dos carboidratos liberados após a hidrólise enzimática.....	94
III.3.4 Efeito da glicose e xilose sobre as atividades de endoglucanase, endoxilanase, β -glicosidase e β -xilosidase.....	100
III.4 CONCLUSÕES.....	104
III.5 AGRADECIMENTOS.....	105
III.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de resíduos agroindustriais acumulados no ambiente podem afetar os ecossistemas e resultar na perda de materiais com valor energético em potencial (SÁNCHEZ, 2009). A utilização destes materiais como substratos alternativos para o cultivo de microrganismos, além de viabilizar a produção de biomassa ou de produtos como, etanol, enzimas e outros metabólitos secundários pode ainda ajudar a solucionar problemas ambientais causados pelo seu descarte (REDDY et al, 2003).

A conversão microbiana de materiais vegetais em um produto de interesse comercial pode requerer processos que envolvem várias etapas. O uso de resíduos lignocelulósicos visando, por exemplo, à produção de etanol requer etapas sequenciais de pré-tratamento para desestruturação do material, sacarificação enzimática e fermentação. Contudo, algumas dessas etapas ainda são ineficientes e requerem investimentos em procedimentos e equipamentos, sendo que o maior obstáculo encontrado ao longo do processo de produção de bioetanol está relacionado à conversão das fibras que compõem a parede celular vegetal em açúcares simples, devido à recalcitrância desses materiais que impede a ação eficiente das enzimas. Parte desses problemas pode ser minimizada se houver métodos eficientes que facilitem o acesso da enzima às fibras, melhoramento no desempenho das enzimas e redução nos custos de produção das mesmas (WEI et al, 2009).

A fermentação em estado sólido tem grande potencial como processo de produção de enzimas a baixo custo. Os resíduos agro-industriais utilizados por FES são geralmente considerados excelentes substratos indutores de enzimas como celulasas, hemicelulasas e ligninases. (PANDEY et al, 2000). Na natureza, há muitos microrganismos capazes de crescer nesses materiais, principalmente os fungos filamentosos, uma vez que as condições da FES estão muito próximas às de seus ambientes naturais (FISCHER et al, 2008).

Muitos processos industriais requerem enzimas funcionais em temperaturas elevadas, as quais são em sua maioria, produzidas por microrganismos termofílicos. Os fungos termofílicos produzem hidrolases com importantes características, tais como, superior termoestabilidade, atividade ótima a altas temperaturas e altas taxas de hidrólises. As enzimas termoestáveis são normalmente mais robustas sendo mais resistentes a variações de pH e determinados reagentes químicos em meios de reação, por sua vez, estas também promovem a hidrólise a altas temperaturas (MERHEB-DINI et al, 2009). Além disso, a diminuição da viscosidade no fluido processado, o aumento da solubilidade do substrato e a redução do risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, tem também incentivado o uso de enzimas termoestáveis em processos biotecnológicos (LEITE et al., 2008).

Em relação à obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, observa-se que o bom desempenho das enzimas durante a hidrólise enzimática, não está apenas relacionado com as características físico-químicas das mesmas. Outro obstáculo encontrado durante a utilização efetiva da lignocelulose na produção de etanol é a cristalinidade da celulose, que impede a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise enzimática. Desta forma, o pré tratamento do material lignocelulósico tem sido proposto, a fim de facilitar a ação das enzimas sobre as fibras (ADSUL et al., 2005).

Cada pré tratamento tem seu próprio efeito na celulose, hemicelulose e lignina que, de modo geral, está relacionado com a dissolução da hemicelulose e alteração da estrutura da lignina, providenciando um melhor acesso à celulose pelas enzimas hidrolíticas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Portanto, a finalidade do pré tratamento é remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, promovendo uma diminuição na quantidade de enzima necessária para a hidrólise. A eficácia dos pré tratamentos está relacionada com os seguintes fatores: (a) aumentar a liberação de açúcares ou a habilidade subsequente de liberar açúcares pela hidrólise enzimática; (b) evitar a degradação de carboidratos; (c) evitar a formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação e (d) ter baixo custo (ADSUL et al., 2005; MARTÍN et al., 2006).

O presente estudo teve por objetivo o isolamento de fungos termofílicos com alto potencial de expressão de enzimas e adaptação a processos fermentativos usando substratos sólidos, além da aplicação destas enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado com microondas. As análises químicas dos produtos obtidos após as etapas de tratamento e hidrólise também se mostraram viáveis dentro do contexto.

Capítulo I
Revisão Bibliográfica

1.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é constituída de celulose (32-50%), hemicelulose (19-25%) e lignina (23-32%), além de uma pequena parte de ácidos orgânicos, sais e minerais (HAMELINCK et al, 2005; PANDEY et al, 2000).

A celulose é um homo-polissacarídeo linear composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo o principal componente da parede celular vegetal (Fig. 1a). Apresenta mais de 10.000 resíduos de β -glicose anidra e sua massa molar é de $1,5 \cdot 10^6$ M. As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por pontes de hidrogênio e força de van der Waals, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível à hidrólise (Fig. 1b) (GRAY et al, 2006; GÓMEZ, 1985; SANDGREN et al, 2005).

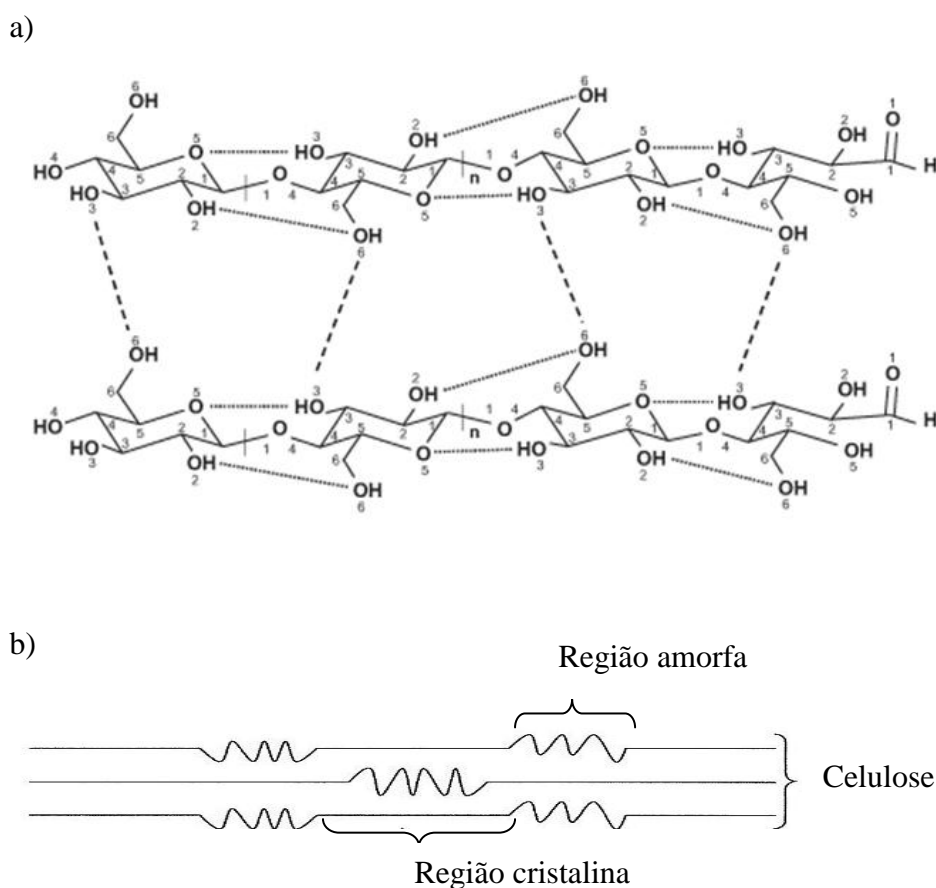
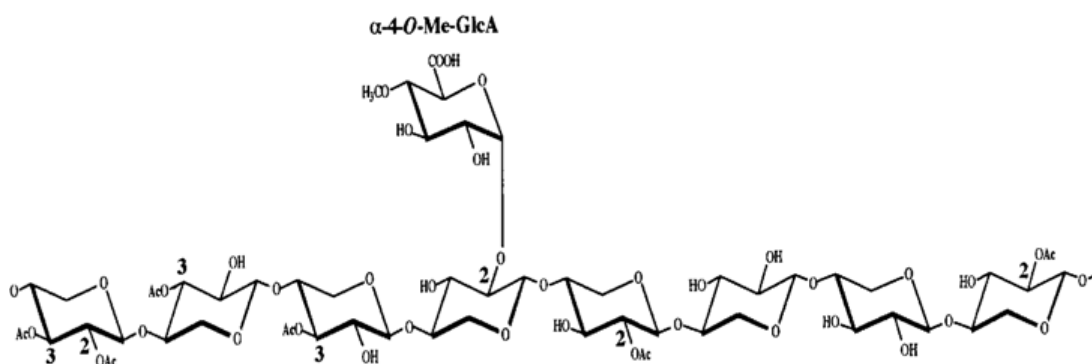


Figura 1: Estrutura representativa (a) cadeias de celulose e (b) regiões amorfas e cristalinas da celulose (FESTUCCI-BUSELLI et al, 2007; KRAUSE et al., 2003) com modificações.

A celulose é resistente ao processo de hidrólise devido as longas cadeias de glicose, com mais de 7 μm , unidas por lignina formando micelas, combinadas de modo a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm, visíveis em eletromicrografias. O conjunto de microfibrilas é denominado de macrofibrilas, aos quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina, formando os materiais lignocelulósicos (CARLILE et al., 2002).

O segundo maior constituinte do material lignocelulósico é a hemicelulose, uma mistura de vários monossacarídeos polimerizados, tais como glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, 4-*O*-ácido metil glucurônico e resíduos de ácido galacturônico (BALAT et al, 2008). A xilana é o principal componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,4. A xilana de cereais, madeiras macias (como pinho e cedro) e gramíneas contém grande quantidades de L-arabinose e são muitas vezes, relacionadas às arabinoxilanas (Fig. 2 a), enquanto a xilana da madeira dura (como eucalipto e carvalho) são frequentemente relacionadas as glucuronoxilanas devido à grande quantidade de ácido D-glucurônico que constitui sua estrutura (Fig. 2 b) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

a)



b)

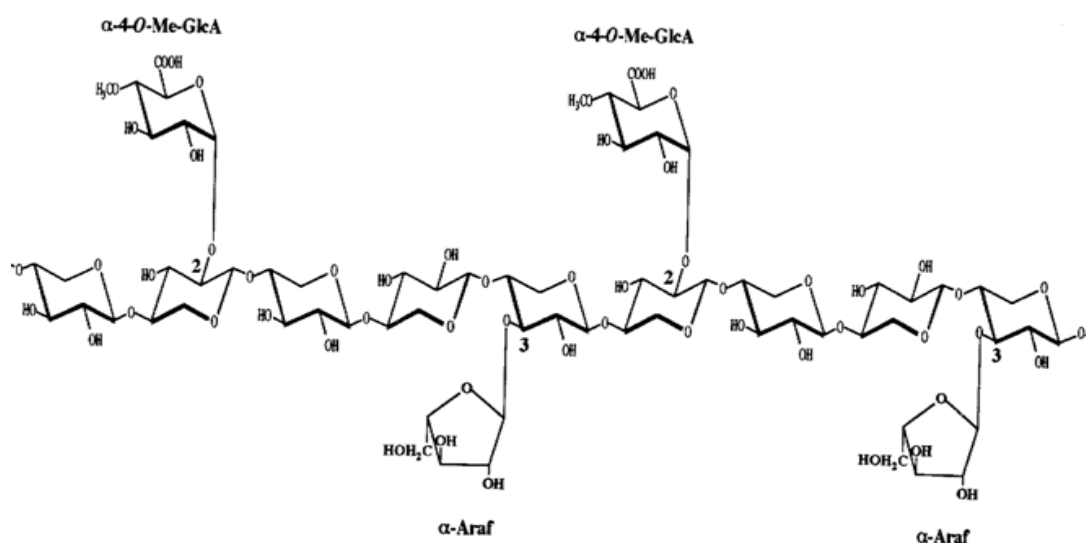


Figura 2: (a) Esquema representativo da estrutura de *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Ac: grupo acetil; α -4-*O*-Me-GlcA: ácido α -4-*O*-metilglucurônico e (b) estrutura de arabino 4-*O*-metilglucuronoxilana 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 (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Este tipo de xilana também apresenta acetilações ao longo da molécula. A arabinoxilana é conectada a estrutura da xilana via ligação α -1,2 ou α -1,3, ambas como resíduos simples ou cadeias laterais curtas. Estas cadeias laterais também podem conter xilose ligadas por ligações β -1,2 a arabinose e galactose, que podem ser unidas por ligações β -1,5 a arabinose ou β -1,4 a xilose. Os resíduos acetil são conectados a O-2 ou O-3 na xilose da estrutura de xilana, mas o grau de acetilação difere grandemente entre as xilanas de diferentes origens. O ácido glucurônico e o 4-*O*-metil-éter são conectados a estrutura da xilana via ligação α -1,2, enquanto os resíduos aromáticos (ferruloil e *p*-coumaril) foram descritos como sendo conectados somente a O-5 de resíduos arabinose terminais. O ácido ferrulico também pode estar ligado as frações de hemicelulose e pectina e estes polissacarídeos são capazes de fazer ligações-cruzadas uns com outros, assim como, com compostos aromáticos polimerizados da lignina. Esta estrutura de ligações-cruzadas resulta em um aumento na rigidez da parede celular (VRIES; VISSER, 2001).

A hemicelulose representa uma íntima conexão entre a lignina e as fibras de celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. As pectinas são polissacarídeos coloidais ácidos complexos, com resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4. As cadeias

consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. No caso do ácido galacturônico, os grupos carboxila são parcialmente estereificados por grupos metil e parcialmente ou totalmente neutralizados por íons sódio, potássio e amônio. Quando na sua forma nativa, a pectina está presente na parede celular e geralmente apresenta-se interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas, formando moléculas insolúveis de protopectina (KASHYAP et al., 2001).

A lignina é o mais importante componente não-carboidrato da biomassa lignocelulósica. Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento (SANDGREN et al, 2005). Este heteropolímero amorfo é constituído de unidades de fenilpropano (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) conectadas por diferentes ligações C-C e C-O-C (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) (Fig. 3).

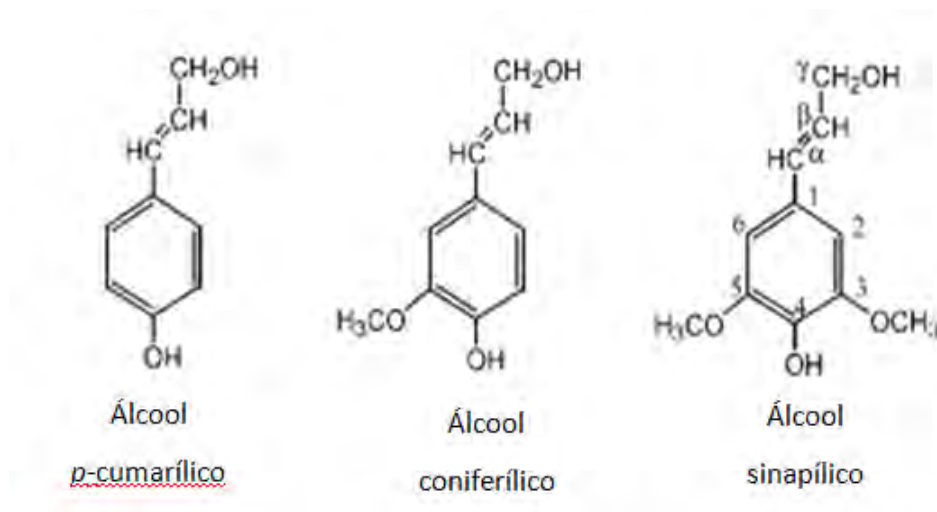


Figura 3: Os fenilpropanóides constituintes da lignina. (Adaptado de Tuor et al., 1995).

A estrutura predominante durante as ligações da molécula de lignina são as β -O-4 éter, as quais não são hidrolisáveis sob condições biológicas. Já foi claramente demonstrado que a lignina é racêmica e, conseqüentemente, mesmo um simples dímero com ligação β -O-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de sub-unidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas definidas (HAMMEL, CULLEN, 2008).

A lignina é covalentemente ligada à hemicelulose, principalmente às xilanas, por ligações éster, formando uma matriz complexa que circunda as microfibrilas de celulose (Fig. 4) O principal propósito da lignina é dar resistência às plantas contra ataques microbianos e ao estresse oxidativo (SANDGREN et al, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

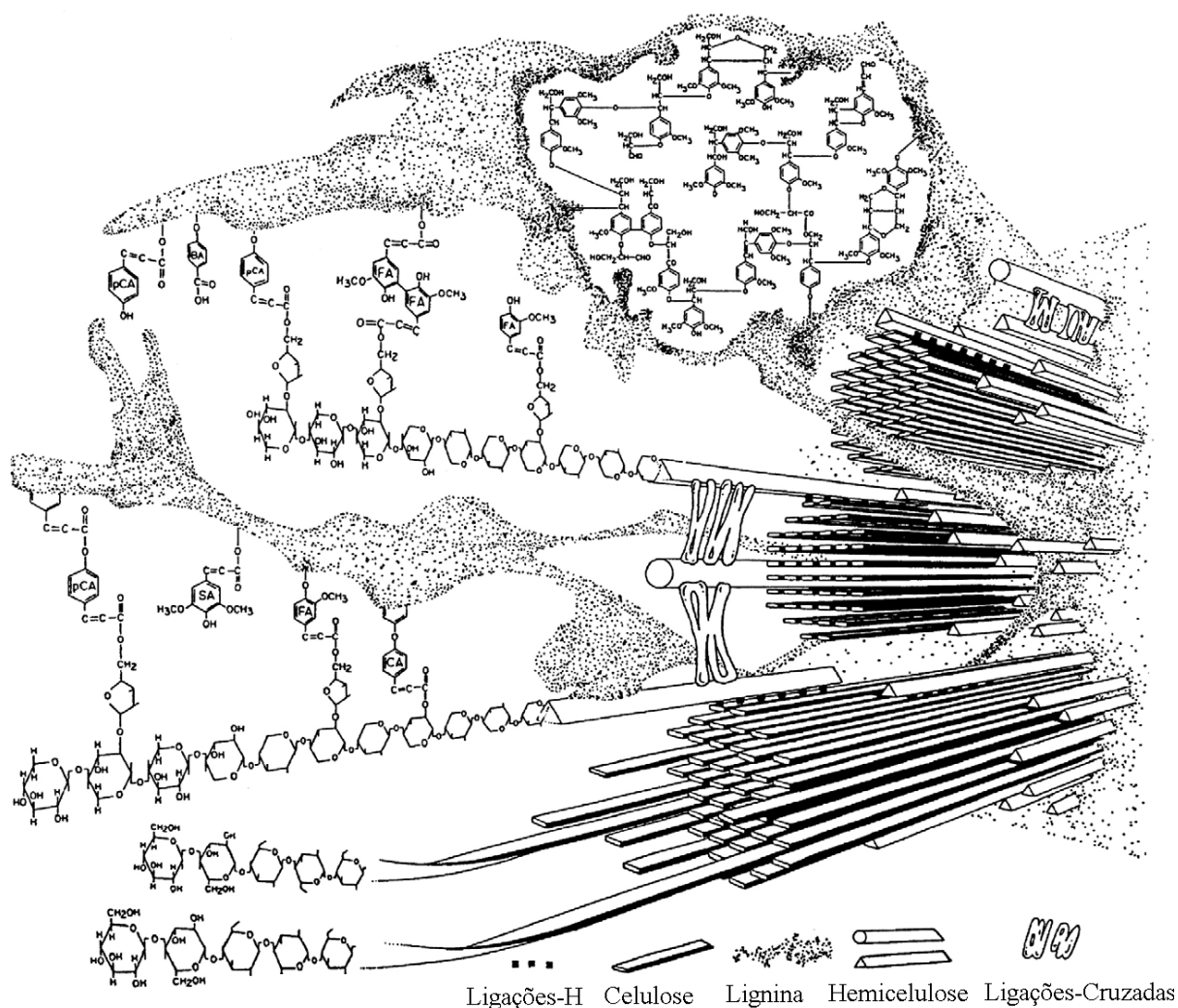


Figura 4: Representação esquemática da parede secundária da planta mostrando as cadeias lineares da celulose e as ramificadas da hemicelulose imersas em uma matriz de lignina formada por unidades de fenilpropanóides dimetoxilados (siringil), monometoxilados (guaiacil) e não-metoxilados (*p*-hidroxifenil) em uma variedade de subestruturas contendo éster e ligações interunidades de C-C. Os (ácidos cinâmicos (CA = ácido *p*-coumarico; FA = ácido ferrúlico e SA = ácido sinápico) também são mostrados (alguns deles formando ligações carboidrato-lignina) (BIDLACK et al, 1992).

1.2. Enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal

A complexidade da biomassa lignocelulósica influencia os microrganismos a produzirem complexos igualmente múltiplos de enzimas. Desta forma, a degradação enzimática da biomassa vegetal por microrganismos é realizada por uma mistura complexa de celulasas, hemicelulasas e ligninasas, que quebram os polímeros em fragmentos menores, os quais são hidrolisados a sacarídeos solúveis metabolizáveis (SANDGREN et al, 2005).

1.2.1. Celulases, Hemicelulases e Pectinases

A completa hidrólise da celulose a glicose requer a ação combinada de múltiplas enzimas com diferentes especificidades ao substrato (Fig. 5) (ARO et al, 2005).

As *endo-(1,4)- β -D-glucanases* (EC 3.2.1.4) (endoglucanase, carboximetilcelulase ou endocelulase) hidrolisam ligações internas (β -1,4), preferencialmente nas regiões amorfas que são mais suscetíveis, reduzindo o grau de polimerização deste substrato, produzindo terminais redutores e não-redutores. Sua atuação expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases (MAHESHWARI et al, 2000; MARTINS et al, 2008; FUKUDA et al, 2009).

As *exo-endo-(1,4)- β -D-glucanases* (EC 3.2.1.91) (celobiohidrolase, exocelulase, celulase microcristalina ou avicelase) tem ação de exoglucanase ao remover monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias. A avicelase possui um sistema de celulases formado por avicelase I, que se caracteriza por ser uma enzima rara que combina as atividades de exoglucanase e endoglucanase, e por avicelase II que representa um novo tipo de atividade celodextrinohidrolase (RIEDEL et al., 1997).

As *β -glucosidases* (EC 3.2.1.21) (celobiase) por sua vez, hidrolisam celobioses e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos a glicose (MAHESHWARI et al, 2000; MARTINS et al, 2008; FUKUDA et al, 2009).

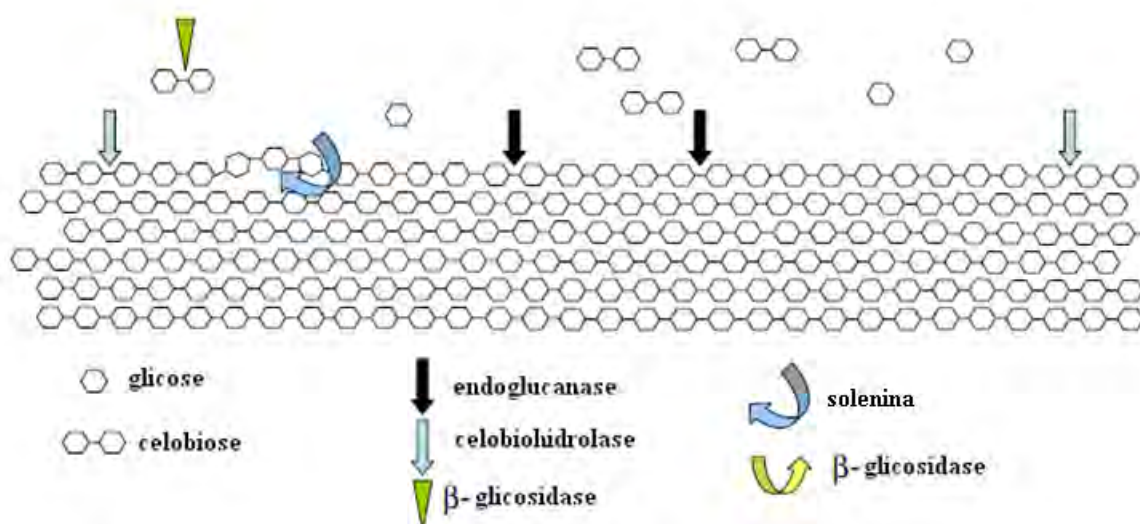


Figura 5: Representação esquemática de um sistema celulolítico. Os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas são mostrados (com alterações ARO et al, 2005).

Após a celulose, a hemicelulose é um dos mais abundantes polissacarídeos da natureza, sendo sua maior fração constituída por xilana. A completa degradação da hemicelulose requer ação sinérgica de uma variedade de enzimas hidrolíticas, entre as quais se destacam as do complexo xilanolítico (Fig. 6):

I- As *endo-1,4-β-D-xylanases* (EC 3.2.1.8) atacam internamente a estrutura polissacarídica, hidrolizando as ligações β-1,4 da molécula de xilana, resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato;

II- As *β-xilosidases* (EC 3.2.1.37), hidrolizam xilooligossacarídios curtos a xilose;

III- As *α-L-arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55) hidrolisam os grupos α-L-arabinofuranosil terminais;

IV- As *α-glucoronidases* (EC 3.2.1.1) são requeridas para a hidrólise das ligações α-1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glicurônico ou sua ligação 4-*O*-metil-éster;

V- As *acetil xilana esterases* (EC 3.1.1.72) hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético e ácido ferrúlico;

VI- As *ferruloil esterases* (EC 3.1.1.73) (ácido ferrulico esterases, cinnamoil esterases, ácido cinâmico hidrolases, *p*-coumaroil esterases, hidroxicinnamoil esterases), apresentam um papel chave proporcionando um aumento na acessibilidade das enzimas hidrolíticas sobre as fibras de hemicelulose devido à remoção do ácido ferrulico das cadeias laterais e ligações cruzadas (PAPINUTTI; FORCHIASSI, 2007; WONG; SADDLER, 1988). A ferruloil esterase quebra as ligações éster entre os ácidos hidroxicinnâmicos estereificados em arabinoxilana e certas pectinas presentes na parede celular da planta. Todas as enzimas (exceto a *p*-coumaril esterase de *A. awamori*) são ativas sobre ferrulato metil, que é um substrato sintético comumente usado nos ensaios de ferruloil esterase (VRIES et al., 1997).

Estudos da atividade de ferruloil esterase sobre substratos naturais têm focado principalmente sua ação sobre oligossacarídeos derivados de xilana e xilana, onde as enzimas na sua maioria são capazes de liberar o ácido ferrulico. Somente duas destas enzimas, a FaeA (VRIES et al., 1997) e a CinnAeE (KRONN et al., 2009) tem mostrado liberação de ácido ferrulico de pectina. Um estudo comparativo usando FaeA e CinnAeE de *A. niger* demonstrou a preferência de FaeA por grupos metoxi com posição 3 do anel aromático, e um aumento na atividade foi observado quando o número de grupos metoxi do anel aromático diminuiu. A atividade de CinnAeE foi baixa ou ausente sobre os substratos contendo grupo metoxi com posição 3 do anel aromático, enquanto, que grupos metoxi adicionais com outras posições do anel aromático, reduziu a atividade de CinnAeE comparados a compostos não substituídos. Substituições hidroxí sobre o anel aromático aumenta a atividade de CinnAeE, mas reduz a

atividade de FaeA (RALET et al., 1994). A presença da enzima ferruloil esterase é um fator importante no aumento das taxas de degradação da biomassa lignocelulósica para conversão em bioenergia e produção de polpa e papel (VRIES et al., 2002).

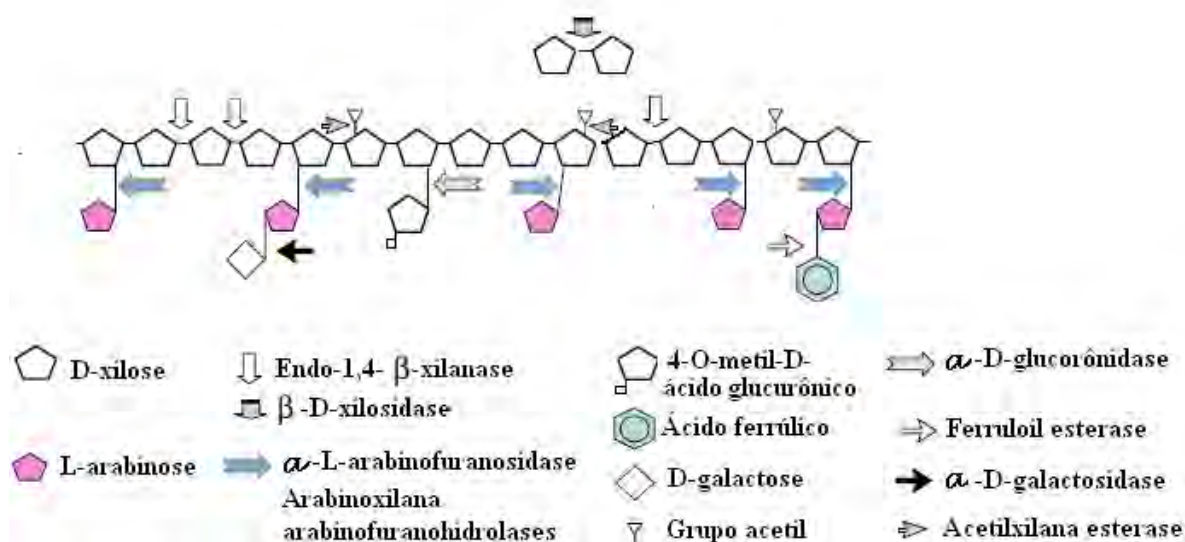


Figura 6: Representação esquemática do sistema hemicelulose, como um exemplo, a degradação da arabinoxilana (ARO et al, 2005).

As pectinases são enzimas responsáveis pela degradação das moléculas longas e complexas das pectinas. As poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 no ácido péctico ou poligalacturônico, o qual é produzido por demetilação da pectina pela pectinesterase. Esta por sua vez possui ação endo (clivagem randômica) ou exo (clivagem sequencial) (KASHYAP et al., 2001). As endopoligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 internas entre os ácidos galacturônicos e seus produtos primários são oligogalacturonases. As exopoligalacturonases são subdivididas em Exo-PG-1 (E.C. 3.2.1.67) que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos graxos livres. A Exo-PG-2 hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônicos a partir da extremidade não redutora, liberando ácido digalacturônicos livres (REXOVA-BENKOVA; MARKOVIC, 1976; PILNIK; ROMBOUTS, 1981).

1.2.1. Ligninases

A lacase (E.C. 1.10.3.2) é uma proteína multicobre pertencente à família das enzimas oxidases azuis. Essa enzima geralmente contém quatro íons cobre, agrupados em três grupos: T1, formado por um íon e é encarregado da oxidação do substrato e pela transferência de elétrons; T2, também formado por um íon e, juntamente com o grupo T3, que contém dois íons, constitui o centro trinuclear de cobre, envolvido na redução do oxigênio e liberação de água (TORRES et al., 2003). A catálise está fundamentada na redução do oxigênio molecular formando água, por meio de sucessivas oxidações monoeletrônicas do substrato. O ciclo catalítico das lacases (Fig. 7) inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado à T1 remove elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que reduz o O_2 a H_2O , ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos $C\alpha$ e desmetilações (BALDRIAN, 2006). A lacase é classificada como fenol oxidase e catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos (particularmente fenóis) com concomitante redução de oxigênio a água. Entre os substratos oxidados por essa enzima encontram-se: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, alguns difenilmetanos e benzopirenos (DURÁN, ESPOSITO, 2000).

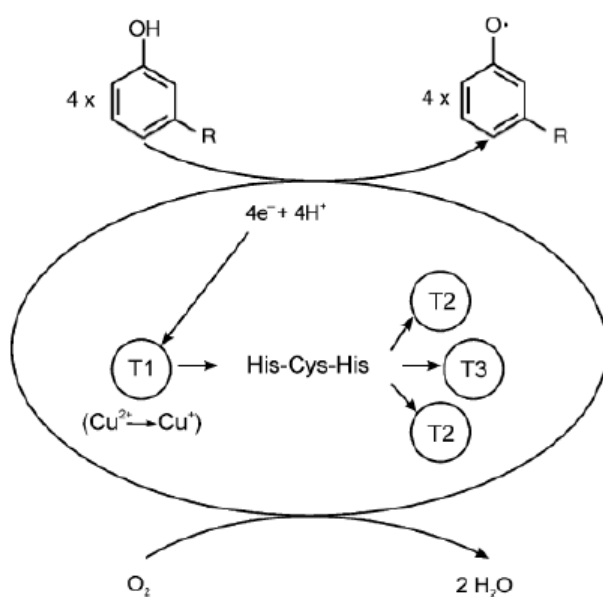


Figura 7: Ciclo catalítico das lacases. FONTE: BALDRIAN, 2006.

As lacases podem interagir diretamente com substratos fenólicos e oxidá-los. Porém, devido ao baixo potencial de oxidorredução, estas enzimas são incapazes de atuar diretamente sobre moléculas aromáticas não-fenólicas, havendo a necessidade de uma molécula mediadora para a degradação dos mesmos. Nesse mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular (TORRES, et al., 2003; MOREIRA NETO, 2006). Os mediadores são, de modo geral, substâncias de baixo peso molecular, secretadas pelo próprio fungo, que quando oxidados pelas lacases, são capazes de oxidar compostos que não seriam alvos diretos da enzima. O fenômeno da mediação (Fig. 8) amplia significativamente a gama de substratos destas enzimas (LEONOWICZ et al., 1999).

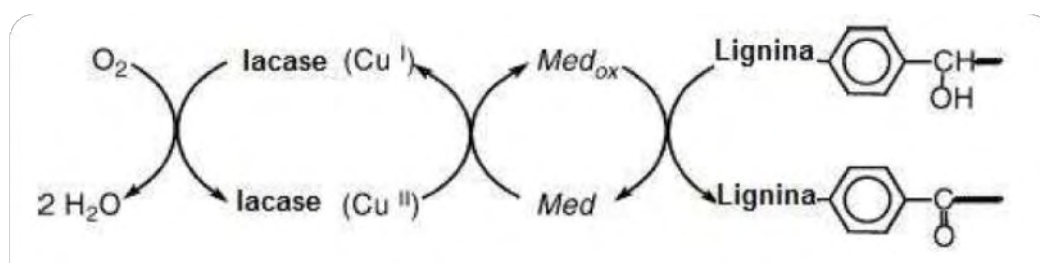


Figura 8. Mecanismo de reação das lacases via mediador (Med). FONTE: BRANCHI, et al., 2005.

A lignina peroxidase (LiP) (E. C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína que possui grupo prostético constituído de ferro protoporfirina IX, com atividade catalítica dependente de H_2O_2 (RODRIGUEZ; DURÁN, 1988). O H_2O_2 necessário à atividade da LiP origina-se de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo (CONESSA et al., 2002).

LiP é uma enzima capaz de oxidar vários compostos aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico, clivar cadeias laterais desses compostos, catalisar reações de abertura de anéis aromáticos, desmetoxilação e desclorinação oxidativa (CONESSA et al., 2002).

A Figura 9 mostra o ciclo catalítico das LiP. Inicialmente, a enzima e o Fe^{3+} contido no sítio ativo são oxidados pelo H_2O_2 , gerando água e um intermediário com dois elétrons oxidados, denominado Composto I. Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, gerando um substrato-radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como Fe^{4+} . O Composto II oxida um segundo substrato (que pode ser outra molécula de álcool veratrílico), originando outro substrato-radical livre, e a enzima volta à sua conformação original (HAMMEL; CULLEN, 2008).

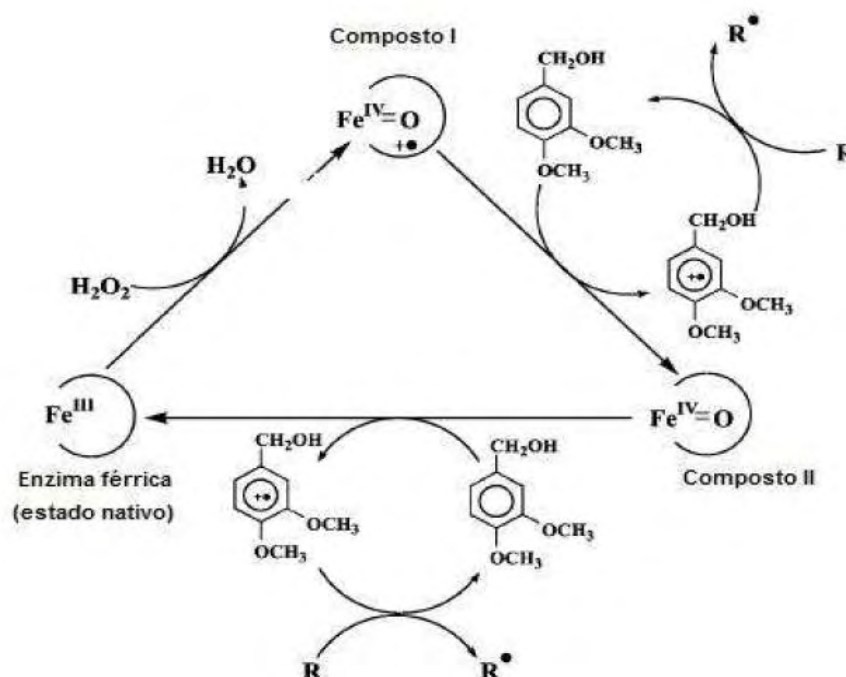


Figura 9: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). FONTE: CAMERON et al., 2000.

A manganês peroxidase (MnP, E. C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular glicosilada que possui grupo prostético heme (STEFFEN et al., 2002). O ciclo catalítico da MnP inicia-se pela transferência de dois elétrons do sítio ativo da enzima para o H_2O_2 , gerando o Composto I oxidado denominado Complexo Fe^{4+} -oxoporfirina, com liberação de água. A seguir, o Mn^{2+} reduz o Composto I a composto II, e é liberado na forma de Mn^{3+} . Uma segunda redução do composto II por outro íon de Mn^{2+} restitui a enzima à sua configuração nativa (Fig. 10). As transferências de elétrons envolvendo o manganês ocorrem na presença de radicais dicarboxílicos, como oxalato, malato, fumarato e malonato (LEONOWICZ et al., 1999). Esses radicais são agentes quelantes de Mn^{3+} . Ao se complexarem, aparentemente, atuam como medidores de baixo peso molecular que efetivamente oxidarão os compostos fenólicos da lignina (HIGUCHI, 2004; CONESSA, et al., 2002; LEONOWICZ, et al., 1999). A catálise da MnP é similar ao de outras peroxidases, como a lignina peroxidase mas, nesse caso, os compostos I e II da MnP oxidam Mn^{2+} (CONESSA, et al., 2002).

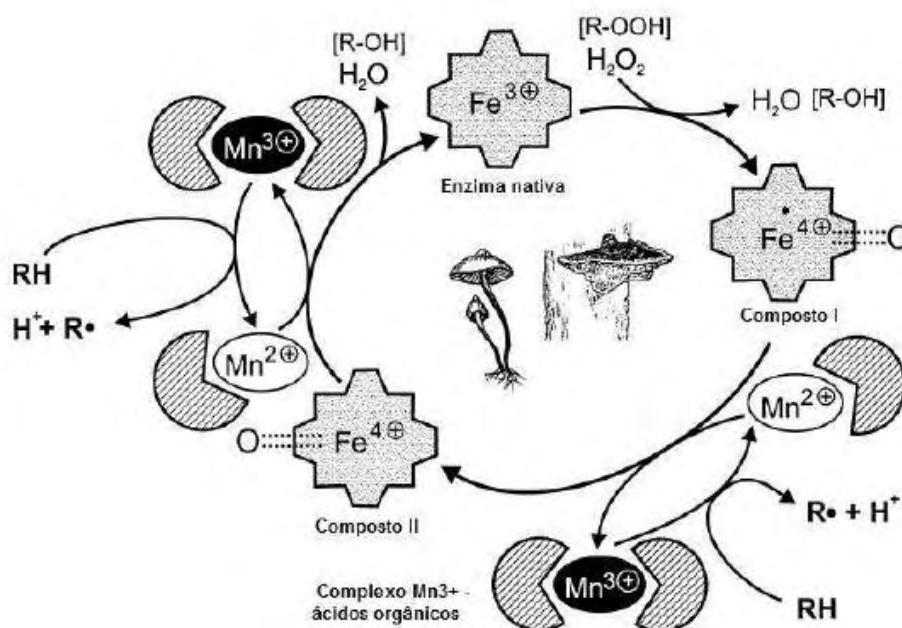


Figura 10: Ciclo catalítico das manganês peroxidases. FONTE: HOFRICHTER, 2002.

1.3. Uso de resíduos agroindustriais como substratos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas microbianas

O alto custo na produção das enzimas lignocelulolíticas é um dos principais obstáculos para a aplicação das mesmas em processos industriais. Vários dados da literatura indicam que as fontes de carbono usadas nas fermentações são os fatores de maior importância, afetando os custos e o rendimento da produção de enzimas. Para reduzir os custos de produção das celulases, hemicelulases e ligninases, tem sido sugerido o uso de substratos disponíveis e de baixo custo na fermentação (GAO et al, 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é descrita na literatura como o processo em que o substrato sólido é utilizado pelo microrganismo como fonte de energia e carbono ou é usado apenas como suporte inerte, sendo a fonte de carbono de outra origem (PANDEY et al, 2000).

A FES é um processo interessante para produção lignocelulases de maneira econômica, devido à possibilidade de usar resíduos agrícolas e agroindustriais, como substratos para o crescimento microbiano (GAO et al, 2008; GRAMINHA et al, 2008). Os fungos são atualmente considerados os microrganismos mais adaptados para FES, pois suas hifas podem crescer na superfície das partículas e penetrar nos espaços intra-partículas,

colonizando assim, os substratos sólidos (HÖLKER; LENZ, 2005). A (Fig. 11) apresenta um esquema de alguns dos processos que ocorrem durante a FES em substratos lignocelulósicos.

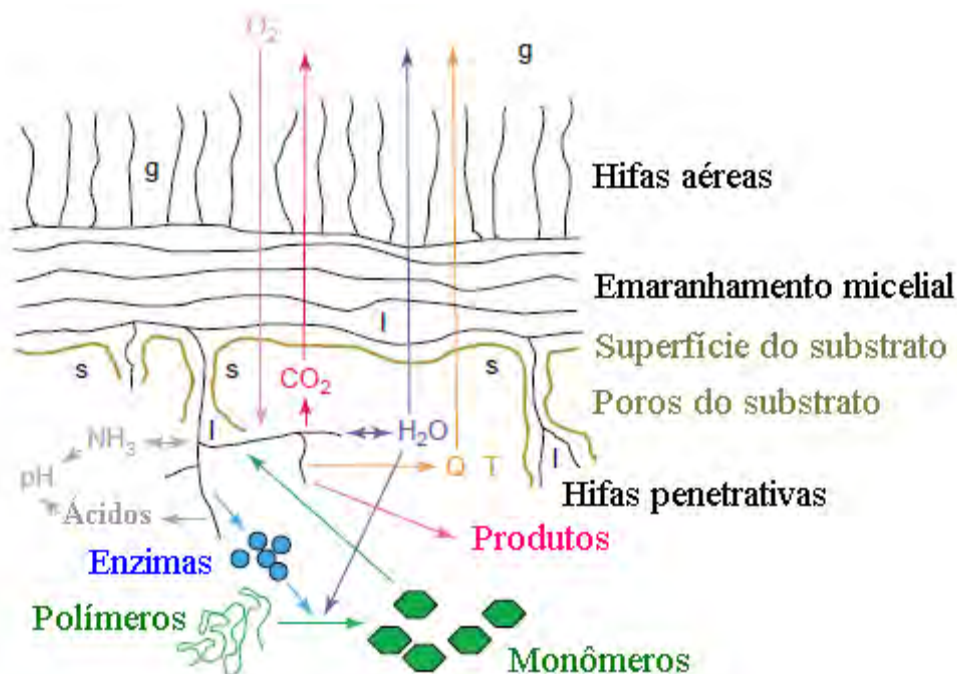


Figura 11: Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorre durante a FES (legenda no texto) (HÖLKER; LENZ, 2005).

Após a germinação de esporos, a hifa do fungo se desenvolve em um emaranhado micelial, este por sua vez, projeta-se formando hifas aéreas e penetrar o substrato. Os espaços vazios entre as hifas aéreas são frequentemente preenchidos por ar (g), enquanto que os espaços vazios entre o emaranhado micelial ou partículas são preenchidos por água (l). A atividade metabólica ocorre principalmente próxima à superfície do substrato e entre os poros, contudo regiões expostas do micélio (hifas aéreas), também mostram metabolismo e servem como transportadores de substâncias para as hifas penetrativas. Enzimas hidrolíticas (azul) são produzidas pelo micélio, difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores (verde). O O_2 é consumido e CO_2 , H_2O , calor e metabólitos bioquímicos são produzidos durante o cultivo. Portanto, gradientes se desenvolvem dentro de biofilmes que, por exemplo, forçam o O_2 difundir para a fase gasosa em regiões profundas do biofilme (lilás) e o CO_2 difunde para regiões gasosas (vermelha). O desenvolvimento de calor (Q) faz com que ocorra rapidamente um aumento na temperatura (T), que é um sério problema durante a FES. O calor é removido do substrato via condução e

evaporação da água (azul escuro). O sistema de equilíbrio da H_2O também inclui a H_2O que passa lentamente pelo micélio, o consumo de H_2O durante as reações de hidrólise e a produção da mesma durante a respiração. Outro importante fator é o pH local, é alterado devido a liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia (cinza) (HÖLKER; LENZ, 2005).

Dentre as características da FES, a baixa atividade de água do meio sólido influencia determinados aspectos fisiológicos dos microrganismos, tais como, crescimento vegetativo, esporulação (esporos mais estáveis e resistentes à desidratação) e germinação de esporos (superiores taxas de germinação) (HÖLKER; LENZ, 2005). Outro fator importante a ser considerado na FES é a aeração. A oxigenação, a remoção de CO_2 , a dissipação de calor (regulação da temperatura do meio), a distribuição do vapor d'água (regulação da umidade) e a distribuição de compostos voláteis produzidos durante o metabolismo estão amplamente relacionados à aeração. As taxas de aeração dependem da porosidade do substrato, e esta pode ser regulada para cada tipo de substrato, microrganismo e processo (CHAHAL, 1987).

Apesar de alguns obstáculos o cultivo de microrganismos em FES oferece várias vantagens, tais como, a alta produtividade e menor requerimento de espaço, problemas operacionais escassos, pois é rudimentar, apresentando tecnologia simples e baixo custo (PANDEY et al, 2000).

Vários co-produtos agrícolas e agroindustriais são usados em processos de FES para a produção de celulasas (GAO et al, 2008; KANG et al, 2004), xilanases (KANG et al, 2004), pectinases e ligninases (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007) e pectinases (COUTO; SANROMÁN, 2006) (Tab. 1).

Tabela 1. Produção de enzimas lignocelulolíticas por diferentes fungos, utilizando-se resíduos lignocelulósicos como substrato em FES.

Substrato(s)	Microrganismo(s)	Enzima(s)	Referência(s)
Farelo de soja	<i>Fomes sclerodemeus</i>	Endoglucanases Endoxilanases Lacase Poligalacturonase Manganês peroxidase	Papinutti; Forchiassin, 2007
Resíduos de palmeira	<i>Aspergillus terreus</i>	Xilanase	Lakshmi et al, 2009
Palha de arroz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Myceliophthora sp</i>	Papel de filtro (FPase) Endoglucanase β -glucosidade β -xilosidase Xilanase	Kang et al, 2004 Badhan et al, 2007
Bagaço de cana	<i>Penicillium janthinellum</i> <i>Trichoderma viride</i>	Endoglucanase β -glucosidade Papel de filtro (FPase) Xilanase	Adsul et al, 2004
Farelo de trigo	<i>Fomes sclerodemeus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	Endoglucanases Endoxilanases Lacase Poligalacturonase Manganês peroxidase Papel de filtro (FPase) β -glucosidade β -xilosidase Xilanase β -celobiohidrolase	Papinutti; Forchiassin, 2007 Kang et al, 2004 Sukumaran et al, 2008 Hanif et al, 2004 Leite et al, 2008
Resíduos de Banana	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus sajor-caju</i>	Lacase Lignina peroxidase Endoglucanase Exoglucanase	Reddy et al, 2003
Palha de trigo	<i>Lentinus edodes</i> <i>Pleurotus spp</i> <i>Aspergillus niger</i>	Endoglucanase Xilanase Papel de filtro (FPase) Lacase β -celobiohidrolase	Elisashvili et al, 2008 Hanif et al, 2004

1.4. Microrganismos e enzimas termofílicas

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo decompositores naturais de material vegetal em função de sua capacidade de secretar uma grande variedade de enzimas, as quais têm sido produzidas e aplicadas industrialmente (GOMES et al, 1998).

Microrganismos que crescem em altas temperaturas podem ser classificados como termofílicos (temperatura ótima de crescimento em torno de 45°C) e hipertermofílicos (temperatura ótima de crescimento em torno de 80°C) (MADIGAN et al, 2003). Poucas espécies de eucariotos conseguem crescer entre 45° e 50°C. Essa maior termolabilidade deve-se mais aos seus sistemas de membrana, do que a termoestabilidade das enzimas ou de outros compostos químicos celulares. Muitos organismos variam a composição de ácido graxos de suas membranas fosfolipídicas em função do aumento da temperatura, deste modo sua fluidez de membrana é mantida constante para o funcionamento ótimo de transportes localizados na membrana e enzimas. Por exemplo, com a elevação da temperatura, há um aumento na proporção de ácidos graxos saturados incorporados nos fosfolipídios, quando a temperatura baixar, uma proporção superior de ácidos graxos insaturados é incorporada. Cerca de 30 espécies de fungos somente, entre as 50.000 descritas, crescem em temperaturas entre 40°C e 45°C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60° a 62°C (MAHESHWARI et al, 2000).

Os fungos termofílicos podem ser encontrados em processos de compostagem durante a fase de alta temperatura, substituindo a microflora mesofílica. O processo de compostagem pode ser dividido em três etapas: na primeira etapa os microrganismos mesofílicos crescem com rapidez e assimilam as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros que estejam de fácil acesso, gerando calor através das reações metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura aproximadamente a 40°C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos microrganismos mesofílicos, iniciando a segunda etapa do processo através estimulação da germinação dos esporos termofílicos. Nesta fase, as fontes de carbono facilmente assimiláveis, já se encontram exauridas, restando os polissacarídios constituintes da biomassa (celulose e hemicelulose), cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. As ações destas enzimas degradam o material vegetal em polímeros menores e aumenta a temperatura do material em compostagem para próximo de 60 °C. A terceira etapa do processo caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução de atividade bioquímica no material (MAHESHWARI

et al, 2000). Por estes motivos locais onde se encontra materiais em compostagem, tais como, resíduos de bagaço de indústrias sucroalcooleiras, resíduos agrícolas, pilhas de esterco, lixo urbano, são geralmente bons ambientes para coleta de fungos filamentosos destinados a estudos de produção de enzimas, como celulases, hemicelulases e ligninases (Tab. 2):

Tabela 2: Produção de enzimas ligno-hemi-celulolíticas por diferentes fungos isolados de ambientes em processo de decomposição.

Fungo	Ambiente de coleta	Enzima	Referência
<i>T. aurantiacus</i> 179-5 Miehe	Madeira em decomposição	β -glucosidase	Leite et al., 2007
<i>A. fumigatus</i> sp.	Madeira e folhas em decomposição	Endoglucanase	Saqib et al., 2009
<i>Myceliophthora</i> sp. IMI 387099	Solos em compostagem	Endoxilanase Endoglucanase β -glucosidase Papel de Filtro	Chadha et al., 2004
<i>M. thermophila</i> ATCC 48104	Lixo urbano	Endoglucanase Lacase	Roy et al., 1990 Berka et al., 1997
<i>S. thermophile</i> ATCC 34628	Lixo urbano	Celobiose Desidrogenase Celobiohidrolase Ferruloil Esterase Galactanase Poligalacturonase Xilanase	Subramanian et al., 1999 Fracheboud; Canevascini, 1989 Topakas et al., 2004 Le Nours et al., 2003 Kaur et al., 2004 Katapodis et al., 2003

Microrganismos termofílicos são de grande interesse científico, pois servem como modelos para estudos de mecanismos fisiológicos adaptativos e evolutivos, além de apresentar um grande potencial para aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas termoestáveis as quais têm sido estudadas com vistas à sua aplicação em diversos processos industriais (MARTINS et al, 2002).

Enzimas produzidas por fungos termofílicos apresentam várias propriedades importantes. O uso de enzimas termofílicas e termoestáveis (termozimas) permite que os bioprocessos sejam realizados em temperaturas mais elevadas, inferindo a estas facilidades como maior fluidez do meio, operação em maiores concentrações de produtos e substratos, e diminuição do risco de contaminação por microrganismos mesofílicos. Além de apresentarem maior estabilidade à temperatura, as termozimas são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e à enzimas proteolíticas, além de serem estáveis em amplas faixas de pH, podendo ser usadas em diferentes tipos de materiais e processos (GOMES et al, 2007).

As tecnologias de polpa e papel são umas das mais rápidas crescentes indústrias e o uso de xilanses termoestáveis parece atrativo em algumas etapas. No processo de branqueamento de papel, por exemplo, a polpa anteriormente cozida por “Kraft” apresenta altas temperaturas. Assim, o uso das xilanasas termoestáveis fornece um método alternativo na redução dos custos do processo, evitando uma etapa de resfriamento. As celulases também são utilizadas em diversos processos industriais, entre os quais podem ser citados a presença de celulase na mistura de enzimas usadas pelas indústrias de sucos, onde estas exercem um efeito favorável na melhoria da viscosidade e filtrabilidade de sucos (KAUR et al., 2004), no pré-tratamento da biomassa para melhorar a qualidade nutricional de forragens assim como, no pré-tratamento de resíduos industriais. (HAKI; RAKSHIT, 2003). Desse modo, a busca de linhagens com alto potencial de produção de enzimas termofílicas é de grande interesse biotecnológico.

1.5. Pré tratamento da biomassa lignocelulósica

O alvo da tecnologia de pré tratamento é alterar ou remover impedimentos estruturais ou composicionais, para melhorar as taxas de hidrólise e aumentar os rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir da celulose ou hemicelulose (MOSIER et al., 2005). Assim, o pré tratamento é necessário para alterar a estrutura da biomassa celulósica tornando-a mais acessível para as enzimas que atuam na conversão de carboidratos em açúcares fermentescíveis e para microrganismos (PATEL; ONKARAPPA, 2007) (Fig. 12). Um pré tratamento eficiente deve reunir os seguintes requisitos: (a) evitar a degradação de carboidratos, (b) evitar a formação de co-produtos inibitórios das etapas subsequentes de hidrólise e fermentação e (c) ter custo efetivo (SUN; CHENG, 2002).

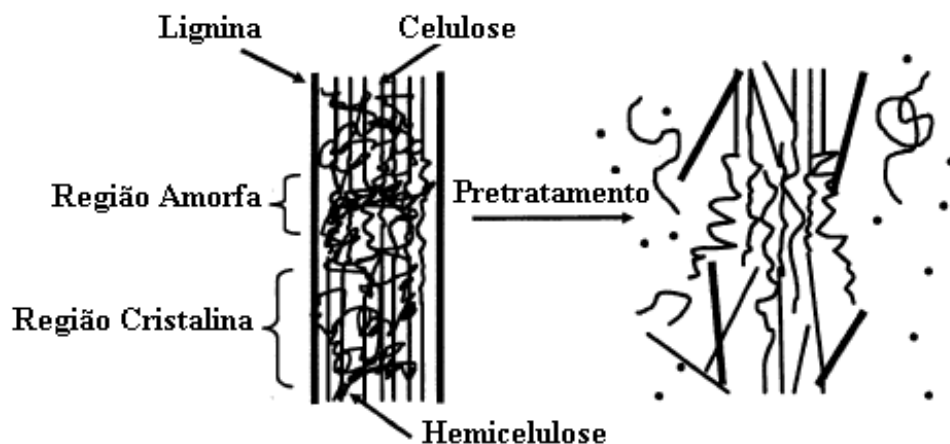


Figura 12: Representação esquemática da ação do pretratamento sobre o material lignocelulósico (adaptado de HSU et al., 1980).

Uma variedade de métodos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos tem sido empregados em processos de pré tratamentos de resíduos lignocelulósicos e suas eficácias técnica e econômica tem sido avaliadas. O relativo sucesso de cada método depende da eficiência com que o material pré tratado é transformado, e no caso de aplicações específicas tais como bioconversão, a dimensão para com a hidrólise enzimática é melhorada (RAMOS, 2003).

O pré tratamento biológico resulta na delignificação parcial da lignocelulose usando microrganismos decompositores de lignina, tais como, fungos e bactérias. Contudo, a biodegradação da lignina é um processo muito lento que pode ser considerado custo efetivo somente se aplicado em conjunto a outros métodos físicos e/ou químicos, tais como, os termoquímicos. Em ambos os casos, a remoção de materiais obtidos podem também ter um importante papel no melhoramento da acessibilidade da lignocelulose para bioconversão (RAMOS, 2003).

O pré tratamento químico visa a solubilização da hemicelulose e lignina para exposição do componente de celulose à hidrólise ácida ou enzimática. Uma ampla variedade de substâncias químicas tem sido sugerida na literatura, entre elas hidróxido de sódio, dióxido de sulfúrico, amônia aquosa, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio alcalino, sais inorgânicos com propriedades ácidas, sais amônio, ácido acético, ácido fórmico, ácido sulfúrico, *n*-butilamina, *n*-propilamina e álcool (metanol, etanol, butanol) na presença de um catalisador ácido ou alcalino (RAMOS, 2003).

Os pré tratamentos físicos, tais como, moagem, microondas e irradiação, também tem sido utilizados a fim de favorecer a hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Contudo, a maior

desvantagem destes métodos é o alto requerimento de energia. A moagem geralmente resulta na redução do tamanho da partícula do substrato (aumentando a área de superfície disponível) e diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose (RAMOS, 2003).

A utilização de microondas é um método alternativo para o aquecimento convencional. Comparado com o aquecimento por condução/convecção, os quais são baseados na transferência superficial de calor, o método de aquecimento por microondas usa a habilidade de interação direta entre um objeto aquecido e um campo eletromagnético para gerar calor. Quando as microondas são aplicadas a biomassa lignocelulósicos, elas seletivamente aquecem a parte mais polar e criam um “hot spot” com os materiais não homogêneos. Acredita-se que esta característica resulta em um efeito de explosão entre as partículas, melhorando a desestruturação das porções recalcitrantes da lignocelulose. Além disso, o campo eletromagnético empregado pode criar efeitos não-termais que podem também facilitar a desintegração das estruturas mais cristalinas do material (DE LA HOZ et al., 2005).

O pré-tratamento com microondas apresenta um resultado positivo na digestão da biomassa principalmente quando é associado à substâncias químicas. Aqueles que utilizam soluções ácidas hidrolisam as frações da hemicelulose, enquanto deixam as porções celulose e lignina intactas no sólido residual. Contudo, a utilização de soluções alcalinas tem mais efeito sobre os componentes de lignina e ambas celulose e hemicelulose permanecem intactas (GRAY et al., 2006). Processos “organosolv” que empregam agentes deslignificantes como NaOH ou Na₂SO₃ também tem sido citados na literatura (RUZENE et al., 2007). O uso de solventes orgânicos em conjunto com catalisadores ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄, etc) leva à quebra das ligações internas da lignina e da hemicelulose. O solvente primeiramente impregna-se no tecido vegetal e faz com que haja solubilização dos fragmentos de lignina produzidos. Uma parte considerável de lignina é separada da polpa; a celulose liberada é facilmente hidrolisada pelas enzimas celulolíticas produzindo glicose (ARAQUE et al., 2008). O glicerol, um solvente orgânico de alto ponto de ebulição, é atualmente um dos principais subprodutos da indústria oleoquímica. Com o aumento do preço do petróleo e as preocupações com a geração de fontes de energia alternativas, tais indústrias tem prosperado, especialmente aquelas produtoras de biodiesel, elevando a geração de glicerol. Apesar do baixo custo deste produto, poucas pesquisas têm explorado seu uso no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, o que pode eficientemente promover a deslignificação com baixa degradação da celulose (KÜCÜK; DEMIRBAS, 1993; DEMIRBAS, 1998).

1.6. Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Um grande número de processos para hidrolisar a celulose em glicose tem sido desenvolvido nos últimos anos. A grande maioria dos métodos utilizados durante o processo é realizada com a utilização de enzimas microbianas ou ácido sulfúrico, variando-se as concentrações (BALAT et al., 2008).

A hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica produz principalmente xilose a partir da xilana, mantendo as frações celulose e lignina inalteradas. A xilana é mais susceptível a hidrólise por tratamentos ácidos leves, devido as suas estruturas amorfas. Já a celulose necessita de condições de hidrólise mais severas, considerando-se sua natureza cristalina (RAHMAN et al., 2007). A hidrólise da celulose catalisada por ácido é uma reação complexa e heterogênea, envolvendo fatores físicos e químicos seguindo o mecanismo de clivagem das ligações glicosídicas β -1,4 (XIANG et al., 2003). Durante a hidrólise ácida, a xilose é rapidamente degradada a furfural e outros co-produtos de condensação, os quais são inibitórios a microrganismos (RAO et al., 2006). A hidrólise ácida, além de formar compostos inibidores para subsequente fermentação, também apresenta outros problemas, tais como, condições de manuseio severas (pH e temperatura), e o alto custo de manutenção devido os problemas de corrosão.

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é realizada por enzimas altamente específicas, tais como, celulasas, hemicelulasas e ligninases. Porém, a hidrólise do material lignocelulósico é um processo lento e a susceptibilidade do substrato celulósico as celulasas depende de suas características estruturais tais como, cristalinidade e grau de polimerização da celulose, área de superfície e conteúdo de lignina (SUN; CHENG, 2002). Durante a hidrólise enzimática dos substratos celulósicos surgem vários fatores que restringem a atividade catalítica das enzimas. Uma das dificuldades encontradas estão relacionadas com a reciclagem das celulasas, pois as características de adsorção das celulasas sobre os substratos lignocelulósicos, ainda é um processo não totalmente compreendido (LU et al., 2002). A degradação enzimática da celulose sólida é um processo complicado que se realiza a um limite de fase sólido-líquida, onde as enzimas são os componentes móveis. Quando as celulasas agem *in vitro* sobre o substrato celulósico insolúvel, três processos ocorrem simultaneamente: (a) mudanças físicas e químicas no restante (ainda não solubilizado) da celulose em fase sólida, (b) hidrólise primária, envolvendo a liberação de intermediários solúveis da superfície das moléculas de celulose reagindo e (c) hidrólise secundária,

envolvendo a hidrólise de intermediários solúveis para intermediários de baixo peso molecular, e por ultimo para glicose (MOSIER et al., 2002).

Em geral, a taxa de hidrólise enzimática do material celulósico diminui rapidamente sendo a degradação enzimática da celulose caracterizada por uma rápida fase inicial seguida por uma lenta fase secundária, que pode durar até que todo o substrato seja consumido. Isto tem sido explicado muito frequentemente pela a rápida hidrólise da fração celulósica facilmente acessível, forte inibição pelo produto e lenta inativação de moléculas de enzima assimiladas adsorvidas (BALAT et al., 2008).

O custo da hidrólise enzimática é baixo se comparado a hidrólise ácida, uma vez que é frequentemente conduzida sob condições moderadas (pH 5,0 e 45-70 °C), sem problemas de corrosão. Além disso, os recentes métodos têm reduzido substancialmente os custos de produção das enzimas. A hidrólise enzimática também proporciona melhores rendimentos sem a geração de produtos colaterais. Porém, uma das grandes desvantagens apresentadas no processo de hidrólise enzimática esta relacionado com as enzimas que degradam os dissacarídeos. A β -glucosidase é uma enzima chave na completa hidrólise da celulose a glicose. A falta desta enzima ou sua inibição pela glicose durante a hidrólise resulta no acúmulo de celobiose, o que inibe a ação das celobiohidrolases e endoglucanases, diminuindo a taxa de hidrólise (KOVÁCS et al., 2009).

Vários métodos para reduzir os problemas de inibição foram sugeridos, incluindo, o uso de altas concentrações de enzima, a suplementação com β -glucosidase e a remoção de açúcares durante a hidrólise por ultra filtração ou sacarificação e fermentação simultânea (SFS) (Fig. 12). Na SFS, as celulases e xilanases convertem os polímeros de carboidratos a açúcares fermentescíveis. Estas enzimas são notoriamente susceptíveis a inibição por “feedback”. Contudo, no processo de SSF os açúcares produzidos durante a hidrólise enzimática são simultaneamente fermentados a etanol (SUN; CHENG, 2002; JEFFRIES; JIN, 2000).

Comparado ao processo de duas etapas (hidrólise-fermentação), a SFS tem as seguintes vantagens: (a) aumento da taxa de hidrólise por conversão de açúcares inibidores, (b) menor requerimento de enzima, (c) maior rendimento de produtos, (d) menor requerimento por condições estéreis, (a glicose é imediatamente removida e o etanol é produzido), (e) tempo curto de processo e (f) menor volume no reator porque um reator simples é usado. Contudo, o processo de SFS apresenta algumas desvantagens que devem ser consideradas: (a) incompatibilidade de temperatura da hidrólise e fermentação, (b) tolerância de etanol pelos microrganismos e (c) inibição das enzimas pelo etanol (SUN; CHENG, 2002).

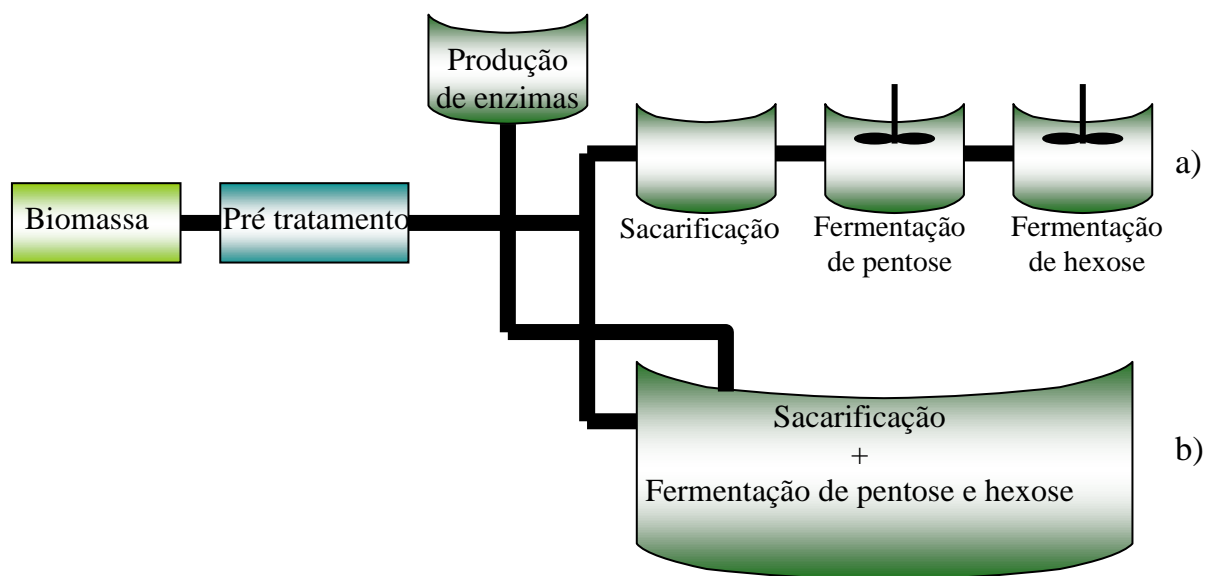


Figura 13: Esquema ilustrativo mostrando as diferenças entre, (a) hidrólise e fermentação separada (HFS) e (b) sacarificação e fermentação simultânea (SFS).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carboh. Polym.**, v. 62, p. 6- 10, 2005.

ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carboh. Polym.**, v. 57, p. 67- 72, 2004.

ARAQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 43, p. 214–219, 2008.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 719–739, 2005.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K.; Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 504 – 510, 2007.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progr. in Ener. and Combust. Scien.**, v. 34, p. 551- 573, 2008.

BALDRIAN, P. Fungal laccases — occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BERKA, R.M.; SCHNEIDER, P.; GOLIGHTLY, E.J.; BROWN, S.H.; MADDEN, M.; BROWN, K.M. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.** .v. 63 p. 3151-3157, 1997.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proc. Okla. Acad. Sci.**, v. 72, p. 51-56, 1992.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. **The fungi**, Ed Elsevier Academic Press, ed.2, 588 f., 2002.

CHADHA, B.S.; AJAY, B.K.; MELLON, F.; BHAT, M.K. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **J. Biotechnol.** v. 109, p. 227-237, 2004.

CHAHAL, D. S. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses e cellulases production. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.**, v. 207, p. 421- 442, 1987.

CONESSA, A.; PUNT, P. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **J. Biotechnol.**, v. 93, p. 143-158, 2002.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **J. Food Engin.**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DEMIRBAS, A. Aqueous glycerol delignification of wood chips and ground wood. **Bioresour. Technol.**, v. 63, p. 179-185, 1998.

DE LA HOZ, A.; DIAZ-ORTIZ, A.; MORENO, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects, **Chem. Soc. Rev.**, v. 34, p. 164–178, 2005.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential application os oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. Environ.**, v. 28, p. 83-99, 2000.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 457- 462, 2008.

FISCHER, C.R.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; STEPHANOPOULOS, G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production, **Metabol. Engineer.**, 2008, (disponível on line: <http://www.sciencedirect.com>).

FRACHEBOUD, D.; CANEVASCINI, G. Isolation, purification, and properties of the exocellulase from *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p.113-118, 1989.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Engineer. J.** v. 44, p. 2–12, 2009.

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. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GOMES, E.; AGUIAR, A.P.; BOSCOLO, M.; CARVALHO, C.C.; SILVA, R.; BONFÁ, M.R. B. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. **J. Biotechnol.**, v. 131, p. S228, 2007.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 187-192, 1998.

GÔMEZ, C.H.R.J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. **Universidade Estadual de Campinas**, 1985.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Anim. Feed Scien. Technol.**, v. 144, p. 1- 22, 2008.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opin. Chem. Biol.**, v. 10, p. 141-146, 2006.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 89, p. 17 – 34, 2003.

HANIF, A.; YASMEEN, A.; RAJOKA, M.I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.**, v. 94, p. 311-319, 2004.

HAMELINK, C.N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno- economic performance in short-, middle- and long- term. **Biom. Bioener.**, v. 28, p. 384- 410, 2005.

HAMMEL, K.E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.11, p. 349–355, 2008.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10- 18, 2009.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proce. J. Acad., Ser. B**, v. 80, p. 204-213, 2004.

HOFRICHTER, M. Review: conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enz. Microb. Technol.**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 301- 306, 2005.

HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Chem. Technol.**, v. 10, p. 315- 319, 1980.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 47, p. 221- 268, 2000.

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. **Bioresour. Technol.**, v.91, p. 153- 156, 2004.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.**, v.77, p. 215- 227, 2001.

KATAPODIS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; NERINCKX, W.; BIELY, P.; CLAEYSSSENS, M. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. **Carbohydr. Res.** v. 338, p.1881-1890, 2003.

KAUR G, KUMAR S, SATYANARAYANA T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* apinis. **Bioresour. Technol.** v. 94, p. 239-243, 2004.

KLUCZEK-TURPEINEN, B.; MAIJALA, P.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. **Internat. Biodeterior. Biodegr.** v. 59, p. 283–291, 2007.

KOVÁCS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G.; Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 1350-1357, 2009.

KROON, P.A.; FAULDS, C.B; WILLIAMSON, G. Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 23, p. 255-262, 1996.

KÜÇÜK, M.M.; DEMIRBAS, A. Delignification of ailanthus altissima and spruce orientalis with glycerol or alkaline glycerol at atmospheric pressure. **Cellul. Chem. Technol.**, v. 27, p. 679- 686, 1993.

LAKSHMIA, S.; RAO, C.S.; RAO, R.S.; HOBBSB, P.J.; PRAKASHAMA, R.S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochem. Engineer. J.**, 2009.

LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 43, p. 391 – 395, 2008.

LE NOURS, J.; RYTTERSGAARD, C.L.O.; LEGGIO, L.; OSTERGAARD, P.R.; BORCHERT, T.V.; CHRISTENSEN, L.L. Structure of two fungal beta-1,4-galactanases: searching for the basis for temperature and pH optimum. **Protein Sci.** v. 12, p.1195-1204, 2003.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; *et al.* Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fung. Genet. Biol.**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; MANSFIELD, S.; SADDLER, J.; Cellulase adsorption and an avaluation of enzymes recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, p. 641- 654, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINK, J. M. PARKER, J. **Brock Biol. Microrg.**, Prentice Hall International Inc., New York, 10^a ed., 2003.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MARTIN, C.; GALBE, M.; JÖNSSON, L.J. Comparison of the fermentability hydrolysates of sugar cane bagasse preteated by steam explosion using different impregnation agents. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98, p. 699-716, 2002.

MARTIN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JÖNSSON, L.J. Wet oxidation as a pretreatment method foe enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.**, 2006, (diponivel on line: <http://www.sciencedirect.com>).

MARTÍNEZ, Á.T.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, M.J.; RÍO, J.C.; GUTIÉRREZ, A. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 20, p. 348–357, 2009.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 1417- 1424, 2008.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R.S.R.; ZANPHORLIN, L.M.; OKAMOTO, D.N.; RODRIGUEZ, G.O.B.; JULIANO, L.; ARANTES, E.C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **J. Agric. Food Chem.**, 2009, (disponível on line: <http://www.sciencedirect.com>).

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**, 110 p., 2006. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 673- 686, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. **Proc. Biochem.**, v. 35, p. 1153- 1169, 2000.

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodemeus* growing in solid-state fermentation. **J. Food Engin.**, v. 81, p. 54-59, 2007.

PATEL, S.J.; ONKARAPPA, R.; KS, S. Funkal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production. **Electron J. Environ Agric. Food Chem.**, v. 6, p. 1921- 1926, 2007.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F.M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G.C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K.J. (Ed.). **Enzymes Food Proces.** London: Applied Science Publishers, p. 105-128, 1981.

RAHMAN, S.H.A.; CHOUDHURY, J.P.; AHMAD, A.L.; KAMARUDDIN, A.H. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 554- 559, 2007.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nov.**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAO, R.S.; JYOTHI, C.P.; PRAKASHAM, R.S.; SARMA, P.N.; RAO, L.V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1974- 1978, 2006.

RALET, M.C., FAULDS, C.B.; WILLIAMSON, G.; THIBAUT, J.F.; Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, v. 263, p. 257-269, 1994.

REDDY, G.V.; RAVINDRA BABU, P.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K.R.R.M.; KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Proc. Biochem.**, v. 38, p. 1457-1462, 2003.

REXOVA-BENKOVA, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzyme. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 33, p. 323-385, 1976.

RIDIEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 147, p. 239-243, 1997.

RODRÍGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazil. J. Med. Biol. Resear.**, v. 21, p. 411-422, 1988.

ROY, S.; DEY, S.K.; RAHA, K.S.; CHAKRABARTY, S. L. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). **J. General Microbiol.**, v. 136, p. 1967-1971, 1990.

RUZENE, D.S., GONÇALVES, A.R., TEIXEIRA, J.A., AMORIM, M.T.P. Carboxymethylcellulose obtained by ethanol/water organosolv process under acid conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 136-140, p. 573–82, 2007.

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

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progres. Biophys. Mol. Biol.**, v. 89, p. 246- 291, 2005.

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? **Bioresour. Technol.**, v. 93, p. 261- 268, 2004.

SAQIB, A.A.N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochem.**, 2009 (disponível on line: <http://www.sciencedirect.com>).

STEFFEN, K. T.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. **Enz. Microb. Technol.**, v. 30, p. 550-555, 2002.

SUBRAMANIAN, S.S.; NAGALLA, S.R.; RENGANATHAN, V. Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 365, p. 223-230, 1999.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renew. Ener.**, p.1- 4, 2008.

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

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

TOPAKAS, E.; STAMATIS, H.; BIELY, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Appl. Microb. Biotechnol.** v. 63, p. 686-690, 2004.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potencial use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Appl. Catal. Environ.**, v. 46, p. 1-15, 2003.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.** v. 41, 1-17, 1995.

VRIES, R.P.; MICHELSEN, B.; POULSEN, C.H.; KROON, P.A.; van den HEUVEL, R.H.H., FAULDS, C.B., WILLIAMSON, G.; van den HOMBERGH, J.P.T.W.; VISSER, J. The *faeA* genes from *Aspergillus niger* e *Aspergillus tubigenensis* encod ferrulic acid esterases involved in the degradation of complex cell wall polysaccharides. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, p. 4638-4644, 1997.

VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** p. 497 – 522, 2001.

WEI, H.; XU, Q.; TAYLOR II, L.E.; BAKER, J.O.; TUCKER, M. P.; DING, S. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 20, p. 330–338, 2009.

WONG, K.K.; TAN, L.U.; SADDLER, J.N. Multiplicity of beta-1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 52, p. 305- 317, 1988.

XIANG, Q.; LEE, Y.Y.; PETTERSSON, P.O.; TORGET, R.W. Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of α - cellulose. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, p. 505- 514, 2003.

Capítulo II

*Selection of thermophilic and
thermotolerant fungi and production
of cellulases and xylanase by solid-
state fermentation*

Selection of thermophilic and thermotolerant fungi and production of cellulases and xylanase by solid-state fermentation

Marcia Maria de Souza Moretti¹, Daniela Alonso Bocchini-Martins¹, Roberto Da Silva¹, Rafaella Costa Bonugli-Santos³, André Rodrigues², Lara Durães Sette³, Eleni Gomes¹.

¹ Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, IBILCE-Universidade Estadual Paulista-Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

² Department of Biochemistry and Microbiology, IB- Universidade Estadual Paulista - Unesp, Rio Claro, São Paulo, Brazil

³ Division of Microbial Resources, CPQBA-Universidade de Campinas, Paulínia, São Paulo, Brazil

Correspondent author: Eleni Gomes, Department of Biology, IBILCE-Universidade Estadual Paulista-Unesp, São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd Nazareth, CEP: 15054-000, São Paulo, Brazil

E-mail: eleni@ibilce.unesp.br, Phone: + 55 17 3221 2393, Fax 5517-32212390

Twenty-seven thermophilic and thermotolerant fungal strains were isolated from soil, decaying organic matter and sugarcane piles based on their ability to grow at 45°C on medium containing corn straw and cardboard as carbon sources. These fungi were identified as representatives of *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Myceliophthora*, *Thermomucor* and *Candida* genus. The majority of the isolated strains produced xylanase and cellulases in solid state fermentation (SSF). The highest cellulases and xylanase productions were obtained by the cultivation of the strains identified as *A. fumigatus* M.7.1 and *Myceliophthora* sp.M.7.7, this last

one considered as a new species. The enzymes produced by these two strains exhibited maximum activity at high temperatures and were thermostable.

Keywords: Thermophilic fungi / Solid-state fermentation / Xylanase / Cellulase

1. Introduction

Lignocellulosic biomass from crops, whose main components are carbohydrates as cellulose and hemicellulose (75-80%) and lignin (20-25%), is an important renewable energy source. Cellulose is a linear homopolysaccharide composed of D-glucose residues linked by β -1,4 glycosidic bonds. Hemicelluloses are heteropolysaccharides formed by pentoses (xylose and arabinose), hexoses (glucose, mannose and galactose) and sugar acids. The dominant component of hemicellulose are the xylans that consists of a homopolymeric backbone chain of β -1,4-linked xylosyl residues. Lignin is an amorphous phenolic polymer composed of monolignols such as *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl which are able to form a variety of ether or carbon-carbon bonds, resulting in a complex branched network [1, 2, 3].

Many microorganisms are able to produce enzymatic complexes that degrade cellulose, hemicellulose and lignin of plant cell walls, releasing sugars that have applications in subsequent fermentation processes for obtainment of products with high economical value like bioethanol [4]. However, the cost of enzymes production hinders its application on industrial scale [5, 6, 7]. Therefore, the main challenges to be overcome are the search for microorganisms with high

potential of fibrolytic enzymes production and the development of a low-cost fermentative process.

The majority of commercial enzymes are obtained from mesophilic microorganisms. Since industrial processes using high temperatures are becoming more and more common, a supply of thermostable enzymes for industrial use is needed. Thermophilic fungi produce enzymes with activity and stability at high temperatures and they usually have a broad tolerance to pH variation and greater resistance to denaturing agents [8, 9].

That way we intend to select novel thermophilic fungi strains that produce cellululases and xylanases with potential for many biotechnological applications including the saccharification of lignocellulosic material which have received special attention in the last years. In this work, we report the isolation and selection of thermophilic fungal strains capable of growing in medium with lignocellulosic materials as carbon source, and the use of selected isolates *Aspergillus fumigatus* M.7.1 and *Myceliophthora* sp. M.7.7 for cellulases and xylanase production by SSF using crops and agro-industrial wastes as carbon source. Additionally, the physico-chemical properties of the crude enzymes were presented.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms- isolation, identification and maintenance

The thermophilic and thermotolerant fungal strains were isolated from soil, decaying organic matter and sugarcane piles in the north-west of São Paulo State,

Brazil. Samples (0.5 g) were collected and homogenized in a sterile medium containing (g l^{-1}): corn straw, 5.0; cardboard, 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4; K_2HPO_4 , 2.0; CaCl_2 , 0.3; peptone, 2.0; yeast extract, 2.0; glucose, 1.0; urea, 0.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 and 10.0 ml of nutrient solution. The nutrient solution was composed of (mg l^{-1}): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4; CoCl_2 , 2.0, at pH 5.0. The inoculated medium was incubated at 45 °C for 48 h and then a loop of homogenized culture was streaked on agar plates containing the same medium plus cloranphenicol and ampicillin (0.2 g l^{-1} each one) and agar (25.0 g l^{-1}) and incubated at 45 °C for 24 to 72 h. All morphologically-contrasting colonies were isolated by repeated streaking. Pure cultures were sub-cultured on slants of the same medium for subsequent identification and enzymatic studies.

The fungi strains selected as the best producers of xylanase and cellulases were identified by conventional and molecular approaches. Morphological characterization was carried out by colony observation through a stereoscope (Leica MZ6, Wetzlar, Germany) and by the observation of squashed lumps stained with lactophenol and cotton blue under a light microscope (Leica DM LS, Wetzlar, Germany) [10]. Molecular identification was performed by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region coupled with phylogenetic analyses as described in Sette *et al.* [11].

The stock cultures were maintained in Saboraud slant agar, under water and mineral oil, at room temperature.

2.2. Enzyme production by solid-state fermentation (SSF)

All the isolated species were cultivated by SSF using as substrate a mixture (5.0 g) (1:1 w/w) of washed and dried wheat bran and sugar cane bagasse, placed in polypropylene bags (12 x 20 cm) and sterilized at 120 °C for 40 min. This substrate was inoculated with 20 ml of spore or micelial suspension in a sterile nutrient solution composed of (g l⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 3.5; KH₂PO₄, 3.0; MgSO₄ . 7H₂O, 0.5; CaCl₂, 0.5 and Tween 80 (1.0 % v/v). The moisture content of around 80% was reached with the addition of sterile distilled water. The fermentation was carried out at 45 °C for 14 days. Every 48 h, one bag was taken and the fermented material was mixed with 20 ml of distilled water per gram of fermented material, stirred for 30 min, filtered and centrifuged at 10000 x g, at 10 °C. The supernatant was used as a crude enzyme solution.

The fungi that presented the higher enzymes productions were then cultivated by SSF using different mixtures of lignocellulosic material (wt/wt): sugarcane bagasse and wheat bran (9:1), banana tree leaves and wheat bran (9:1), rice husk and wheat bran (9:1), rice husk and barley bran (9:1), corn straw and wheat bran (9:1), corn straw and barley bran (9:1), wheat bran and sugarcane bagasse (8:2), and wheat bran. The material was washed in tap water to remove impurity and reducing sugars, dried at 65 °C, ground and sieved to select particles of 1.0 to 3.0 mm. The fermentation procedures were identical to those described above.

2.3. Enzyme activity measurements

Cellulase and xylanase activity were assayed by using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method [12] to quantify the number of reducing groups, expressed as glucose and xylose, released by enzymatic action carried out in a reaction mixture containing 0.1 ml of crude enzyme and 0.9 ml of buffer solution 0.1 M pH 5.0 containing carboxy methyl cellulose (CMC) or xylan (birchwood) (5.0 g l^{-1}) incubated at 60°C for 10 min. Cellulase activity on filter paper (FPase) was determined using a piece of paper Whatman n° 1 ($1.0 \text{ cm} \times 6.0 \text{ cm}$) dipped in 1.0 ml acetate buffer 0.05 M, pH 5.0 and 0.5 ml of crude enzyme solution [13]. The reaction was carried out at 60°C for 60 min and stopped with 3.0 ml of DNS. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release one μmol of reducing sugar per minute under assay conditions.

The β -glucosidase activity was determined according to Leite *et al.* [14] in reaction mixture composed of 50 μl of crude enzyme solution, 250 μl of acetate buffer (0.1 M, pH 5.0) and 250 μl of 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (4 mM), (PNPG, Sigma) incubated at 60°C , for 10 min. The reaction was stopped by the addition of 2.0 ml of Na_2CO_3 (2 M). One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release one μmol of *p*-nitrophenol per minute under these assay conditions.

2.4. Enzymes properties

The effect of pH on the enzyme activities was investigated by incubating the reaction mixture at 60°C for 10 min, using solutions containing 5.0 g l^{-1} of CMC

or xylan in 0.1 M buffers: sodium acetate (pH 3.5-5.0), MES (pH 5.5-6.5), HEPES (pH 7.0-8.0), glycine-NaOH (pH 8.5-10.5). Optimum temperature was determined by incubating the reaction mixture at temperatures ranging from 30 °C to 80 °C, at the pH determined as optimum.

The thermal stability was investigated by measuring the enzyme activity after keeping the enzyme solution for 1 h, at temperatures between 35 °C and 80 °C in absence of substrate. Remaining enzyme activity was determined at optimum pH and temperature.

The pH stability of the crude enzyme was evaluated by mixing the enzyme solution and the buffers quoted above to give final proportion of 1:1 (v/v). These solutions were incubated at 25 °C for 24 h. An aliquot was taken to determine the remaining enzymatic activity at the optimum pH and temperature.

3. Results and discussion

3.1. Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi

From 73 collected samples, 26 filamentous fungi and only one yeast were isolated. The number of thermophilic strains isolated was low considering the potential total microbial population that could be found in this kind of material sampled. The heating resulting from decomposition of the lignocellulosic material by microorganisms led to the succession of mesophilic, thermotolerant and thermophilic microorganisms and therefore, a number of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic fungi specimens could be found. On the other hand, the low number of thermophilic fungi isolated is in accordance with those cited by Martin

et al. [15], who isolated thermophilic pectinolytic fungi from a pile of compost. Both results corroborate those obtained by Maheshwari *et al.* [16] that reported that few thermophilic fungi species have been described being around 30 of the 75,000 fungi already described. In relation to genus detected, the prevalence of *Aspergillus* in the samples (Table 1) is consistent with the reports of Wareing [17], Ghatora *et al.* [18] and Martin *et al.* [19] and it is possible that these results are due to the technical approach used, once representatives of this genus are fast growing and easily obtained from many substrates. Culture methods alone have not showed to be sufficient to measure the quantitative and qualitative microbial community in function of its complexity and of the medium and culture conditions standardization [20]. Maybe the association between culture and culture-independent methods could improve the detection of the microbial cellulolytic and hemicellulolytic community associated in degradation of plant biomass.

3.2. Production of xylanase and cellulase (FPase) by the isolated fungal strains

The first evaluation of the isolated fungi ability to produce xylanolytic and cellulolytic enzymes was carried out by SSF using a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran (1:1 wt/wt). Xylanase and FPase productions ranging from 15 to 1292 and from 0.2 to 3.2 U g⁻¹, respectively, were observed. The strains M.7.1, M.7.3 and M.7.7 were the best producers of xylanase (1040, 1239 and 1292 U g⁻¹, respectively) and the higher FPase activities were observed from the culture of

M.6.1, M.6.2, M.7.7 and M.7.8 (Table 1). Similar results for FPase (0.70 U g^{-1}) were obtained by Badhan *et al.* [4] when cultivating *Myceliophthora* sp. IMI 387099 on mixture of sugarcane bagasse and wheat bran, although higher values (243 U g^{-1} and 19.5 U g^{-1}) were obtained by Gao *et al.* [21] and Kang *et al.* [22] when cultivating of *A. terreus* and *A. niger* KK2, respectively on wheat bran.

The xylanase activity was comparable to that obtained from *Myceliophthora* sp IMI387099 (900 U g^{-1}) and *Fusarium oxysporum* (1840 U g^{-1}) [4, 23].

The sugarcane bagasse is composed of, approximately, 15% of lignin, 30-35 % of cellulose and 30-35 % of hemicellulose, and it is a good substrate to induce the microbial production of cellulolytic and hemicellulolytic complex. Wheat bran has also been an excellent medium for fungal growth and for the production of these enzymes in function of its high nutrient content [6,14, 24, 25].

The data from Table 1 shows that, although the FPase production was not very significant, the isolated fungi have a high potential for xylanase production. According to Percival Zhang *et al.* [26] the use of the filter paper method to quantify cellulolytic activity can be subject to several variations that could influence the results. In this way, the endoglucanase (CMCase) and β -glucosidase activities were determined in subsequent assays.

The strains M.7.1 and M.7.7 were chosen to give continuity to the research since they showed a good potential for FPase and xylanase production. These strains were subjected to taxonomic characterization by morphological and molecular approaches. Data derived from BLAST (ITS-rDNA region) showed that isolate M.7.7 had high sequence similarities (99-96%) with three unidentified

Myceliophthora spp. and in the phylogenetic tree these fungi were grouped together (data not shown). Analyses of macro and micro-morphological characteristics accommodated isolate M.7.7 in the genus *Myceliophthora*. Additionally, strain M.7.1 showed ITS high sequence similarities (100%) with different strains of *Aspergillus fumigatus*. Results from morphological analyses corroborate the molecular characterization obtained for this strain.

Considering the combined methods used for fungus identification, the isolate M.7.1 was identified as *Aspergillus fumigatus* and isolate M.7.7 as *Myceliophthora* sp. Data derived from taxonomic characterization suggest that isolate M.7.7 likely represent a new species in the genus *Myceliophthora*. However, additional taxonomic analyses need to be performed in order to confirm the new species hypothesis.

3.3. Production of xylanase, endoglucanase (CMCase) and β -glucosidase by *Myceliophthora* sp M.7.7 and *Aspergillus fumigatus* M7.1.

Aspergillus fumigatus M.7.1 and *Myceliophthora* sp. M.7.7 were cultivated by SSF using different lignocellulosic materials as substrates. The maximum xylanase (7238 U g⁻¹) and β -glucosidase (40.4 U g⁻¹) productions by *A. fumigatus* M.7.1 were obtained by culture on a mixture of corn straw and wheat bran and on wheat bran, respectively (Fig.1a-b-e-f). CMCase production by *A. fumigatus* was similar on mixtures of sugarcane bagasse and wheat bran, corn straw and wheat bran and corn straw and barley bran with values varying from 40 to 47 U g⁻¹ (Fig.1c-d).

Myceliophthora sp. M.7.7 produced 1044.6 U g⁻¹ of xylanase and 54 U g⁻¹ of CMCase in medium composed of a sugarcane bagasse and wheat bran mixture (Fig. 2a-b-c-d) after 192 h of fermentation. Similar to that observed for *A. fumigatus*, the maximum β -glucosidase activity was detected after 336h of fermentation on wheat bran (Fig. 2e-f). These data indicate that the kind of enzyme produced depends on the substrate used for both microorganisms which could have different potential of enzyme induction, i.e. the medium containing only wheat bran improved the β -glucosidase production. The presence of substrate more difficult to degradate such as rice straw decreased the production of all enzymes (Figs. 1, 2b-d-f).

Xylanase, CMCase and β -glucosidase production of both fungi were lower than those reported for some *Thermoascus aurantiacus* strains (6193, 1572 and 101.6 U g⁻¹, respectively), since this is a species known as an excellent xylanase and cellulase producer [2, 27]. On the other hand, the enzymes productions by both *A. fumigatus* M.7.1 and *Myceliophthora* sp M.7.7 are similar to those observed for many fungal species, including other *Thermoascus* strains. For example, the cultivation of *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 on wheat bran [14] provided a β -glucosidase production of 58 U g⁻¹, a value close to those reported in the present work. Similar values were also cited by Heidorne *et al.* [28], when cultivating *Ceriporiopsis suvermispota* by SSF on wood chips. The β -glucosidase and CMCase productions cited by these authors were around 53- 43 and 15-31 U g⁻¹, respectively.

3.4. Enzymes properties

The optimum pH for endoglucanase and xylanase from *A. fumigatus* M.7.1 were 4.5 and 4.5-5.5, respectively (Fig. 3a) and 5.0 for both enzymes from *Myceliophthora* M.7.7 (Fig. 3b). The maximum activities were observed at 60 °C for xylanase and 70 °C for CMCase from *A. fumigatus* M.7.1. Xylanase and CMCase from *Myceliophthora* M.7.7 exhibited maximum activities at 70 °C (Fig. 3c-d). All enzymes from both fungi were stable in the large pH range (5.0-10.0) (Fig. 4a-b). The enzymes showed themselves to be thermostable, maintaining 90% of the initial activity when kept for 1 h at 65 °C in absence of substrate, except the xylanase from *A. fumigatus* M.7.1 that lost 50% of the activity after 1 h at 55 °C (Fig. 4c-d). The thermostability of both enzymes is higher than that reported for xylanase and endoglucanase from mesophilic fungi such as *Aspergillus* sp 2M1, *Trichoderma reesei* [29], *Penicillium canescens* CP10, *P. janthinellum* and *Penicillium* sp [30] and was similar to described for thermophilic as *T. aurantiacus* and *Thermomyces lanuginosus*, which were stable up to 60 °C [27, 31].

The stability of an enzyme is an important parameter for its application in an industrial process and also could be a valuable model for information about structure and function that provide protein thermostability. Enhanced stability and the maintenance of a desired level of activity over a long period are two important points to be considered for the selection and design of enzymes [32].

With this study, we have been able to isolate thermophilic and thermotolerant fungi, including putative new specie from the genus

Myceliophthora. Furthermore, the strains studied presented a high potential for enzymes production such as xylanase and cellulase, which can be used in hydrolyses of plant biomass.

4. Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) for their financial support.

5. References

- [1] Weng, J., Li, X., Bonawitz, N.D., Chapple, C., 2008. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Cur. Opin. Biotechnol.*, **19**, 166-172.
- [2] Glazer, A., Nikaido, H., 1995. Biomass, 327-357. In Glazer, A., Nikaido, H, *Microbial Biotechnol: Fundamental and Applied Microbiology*, ISBN 0-7167-2608-4, Freeman and Company, USA.
- [3] Ramos, L.P., 2003. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nov.*, **26**, 863 - 871.
- [4] Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S. *et al.*, 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour. Technol.*, **98**, 504 - 510.
- [5] Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Engineer. J.*, **44**, 13 -18.
- [6] Rodríguez Couto, S. and Sanromán, M.A., 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Engineer. J.*, **22**, 211 - 219.

- [7] Kovács, K., Szakács, G., Zacchi, G., 2009. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. Proc. Biochem. (available on line: <http://www.sciencedirect.com>).
- [8] Martins, E.S., Silva, D., Leite, R.S.R., Da Silva, R. *et al.*, 2007. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Anton Leeuw., **91**, 291–299.
- [9] Vieille, C. and Zeikus, J.G., 2001. Hyperthermophilic enzyme: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **65**, 1–43.
- [10] Da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C. and Sette, L.D., 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterization and RBBR decolorization screening. Environ. Technol., **29**, 1331-1339.
- [11] Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F., *et al.*, 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. World J. Microbiol. Biotech., **22**, 1185–1195.

- [12] Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
- [13] Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, **59**, 257- 268.
- [14] Leite, R.S.R., Alves-Prado, H.F., Cabral, H., Pagnocca, F.C., *et al.*, 2008. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enz. Microbial Technol.*, **43**, 391–395.
- [15] Martin, N.; Guez, M.A.U.; Sette, L.D.; Da-Silva, R., *et al.*, 2009. Pectinase production by a brazilian thermophilic *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentations. *Microbiology* (accepted to publication).
- [16] Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bath, M.K., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 461-488.
- [17] Wareing, P.W., 1997. Incidence and detection of thermotolerant and thermophilic fungi from maize with particular reference to *Thermoascus* species. *Inter. J. Food Microbiol.*, **35**, 137-145.

- [18] Ghatora, S.K., Chadha, B.S., Saini, H.S., Bhat, M.K., *et al.*, 2006. Diversity of plant cell wall esterases in thermophilic and thermotolerant fungi. *J. Biotechnol.*, **125**, 434–445.
- [19] Martin, N., Souza, S.R., Da Silva, R., Gomes, E., 2004. Pectinase production by fungal strains in solid – state fermentation using agro – industrial bioproduct., *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **47**, 813–819.
- [20] Tang, J., Kanamori, T., Inoue, Y., Yasuta, T., *et al.*, 2004. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Proc. Biochem.*, **39**, 1999-2006.
- [21] Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., *et al.*, 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresour. Technol.*, **99**, 7623-7629.
- [22] Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., *et al.*, 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, **91**, 153-156.
- [23] Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum*

grown on corn stover in solid state fermentation. *Industr. Crops Produc.*, **18**, 37-45.

[24] Silva, D., Martins, E.S., Da Silva, R., Gomes, E., 2002. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. Microbiol.*, **33**, 318-324.

[25] Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R., 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem.*, **104**, 127–131.

[26] Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielens, J.R., 2006. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.*, **24**, 452-481.

[27] Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., *et al.*, 2003. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Proc. Biochem.*, **38**, 1099 - 104.

[28] Heidorne, F.O., Magalhães, P.O., Ferraz, A.L., Milagres, A.M.F., 2006. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis*

subvermispora grown on wood under biopulping conditions. *Enz. Microbial Technol.*, **38**, 436–442.

[29] Castellanos, O.F., Sinitsyn, A.P., Vlasenko, E.Y. 1995. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. *Bioresour. Technol.*, **52**, 119–124.

[30] Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K., 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.*, **38**, 1327–1340.

[31] Singh, S., Madlala, A.M., Prior, B.A., 2003. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 3–16.

[32] Kapoor, D., Kumar, V., Chandrayan, S. K., Ahmed, S., Sharma, S., Datt, M., Singh, Ba, Karthikeyan S, Guptasarma, P., 2008. Replacement of the active surface of a thermophile protein by that of a homologous mesophile protein through structure-guided protein surface grafting. *Bioch. Bioph. Acta.*, 17841771-1776

Figure 1: Xylanase (a, b), endoglucanase (c,d) and β -glucosidase (e, f) production by *Aspergillus fumigatus* M.7.1 in SSF using different crops and agro-industrial wastes mixtures (9:1 w/w). (■) sugar cane bagasse and wheat bran; (●) banana wastes and wheat bran; (▲) corn straw and wheat bran; (▼) corn straw and barley bran; (□) rice husk and wheat bran; (○) rice husk and barley bran; (△) wheat bran and sugar cane bagasse (8: 2 w/w); (▽) wheat bran.

Figure 2: Xylanase (a, b), endoglucanase (c, d) and β -glucosidase (e, f) production by *Myceliophthora* sp. M.7.7 in SSF using different crops and agro-industrial wastes mixtures (9:1 w/w). (■) sugar cane bagasse and wheat bran; (●) banana wastes and wheat bran; (▲) corn straw and wheat bran; (▼) corn straw and barley bran; (□) rice husk and wheat bran; (○) rice husk and barley bran; (△) wheat bran and sugar cane bagasse (8: 2 w/w); (▽) wheat bran.

Figura 3: Effect of pH and temperature on activity of xylanase (■) and Endoglucanase (●) produced by *Aspergillus fumigatus* M.7.1 (a-c) and *Myceliophthora* sp. M.7.7.(b-d)

Figure 4: Effect of pH and temperature on stability of xylanase (■) and Endoglucanase (●) produced by *Aspergillus fumigatus* M.7.1 (a-c) and *Myceliophthora* sp. M.7.7.(b-d) when maintained for 1h in absence of substrate.

Table 1: Xylanase and cellulase (FPase) production by thermophilic fungal strains in SSF using sugarcane bagasse and wheat bran as substrate (1:1 w/w).

Sample	strain	Enzyme activity U g ⁻¹			
		Xylanase	T (h)	FPase	T (h)
Manure	<i>Aspergillus</i> sp M.1.3	588.0	96	0.2	24
Sugar cane bagasse pile	<i>Aspergillus</i> sp M.2.8	708.0	96	0.4	24
	<i>Aspergillus</i> sp M.2.11	374.0	96	0.6	288
	<i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1	1040.0	144	0.8	48
	<i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.3	1239.0	192	1.0	48
	<i>Thermomucor</i> sp M.7.6	15.0	336	ND	-
	<i>Myceliophthora</i> sp M.7.7	1292.0	96	2.0	48
	<i>Aspergillus</i> sp M.7.8	354.0	96	1.8	96
	<i>Aspergillus</i> sp M.7.14	602.0	96	0.4	24
Decaying grass	M.3.4	338.0	144	0.4	24
Silage	M.4.7	ND	-	0.4	288
	M.4.10	674.0	48	0.8	288
Crops wastes	<i>Aspergillus</i> sp M.6.1	392.0	144	3.2	288
	M.6.2	386.0	96	1.4	144
	M.6.3	55.0	96	0.4	24
	<i>Aspergillus</i> sp M.6.3.E	290.0	144	0.8	48
	<i>Candida</i> sp M.6.3.L	ND	-	ND	-
	M.6.4	ND	-	ND	-
	<i>Aspergillus</i> sp M.6.5	234.0	48	0.6	48
	M.6.9	669.0	144	1.0	96
	<i>Thermomyces</i> sp M.6.10	ND	-	0.6	192
	M.6.11	213.0	336	0.6	48
	<i>Thermomyces</i> sp M.6.12	147.0	96	0.6	24
	M.6.14	355.0	240	0.2	24
	M.8.1	300.0	192	0.4	24
	M.8.5	326.0	96	0.4	24
	M.8.6	922.0	144	0.8	144

*ND- No Detected

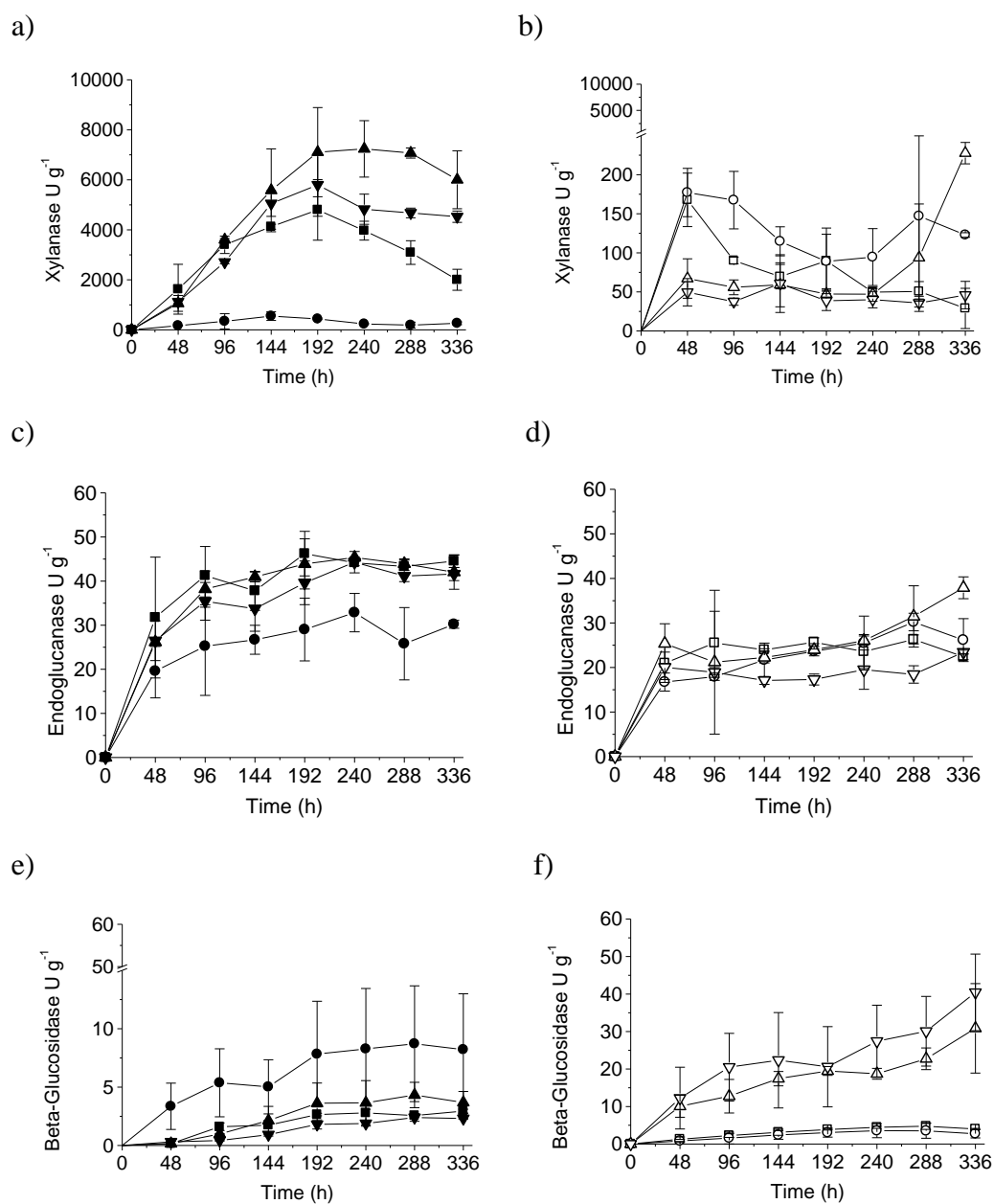


Figure 1

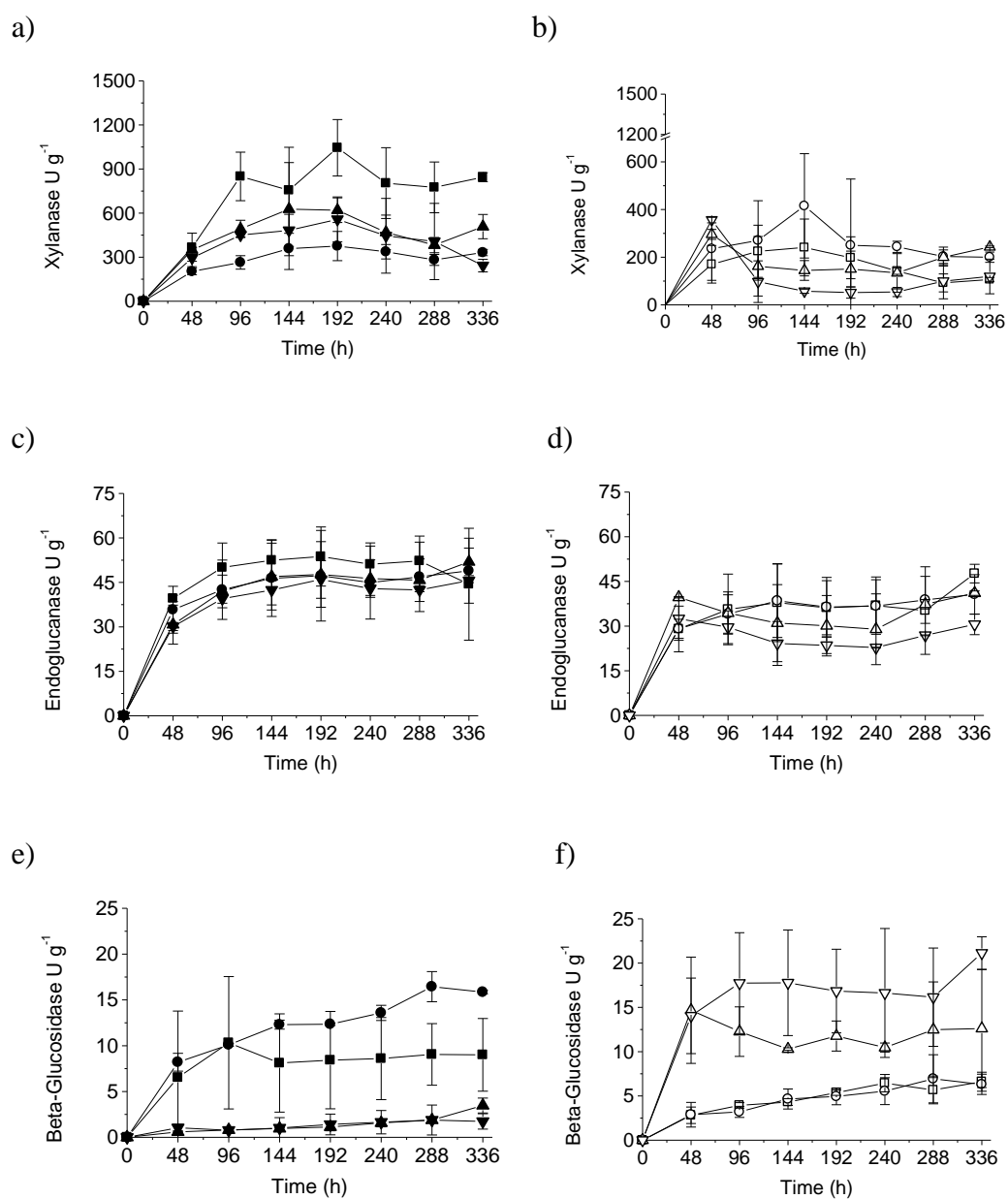
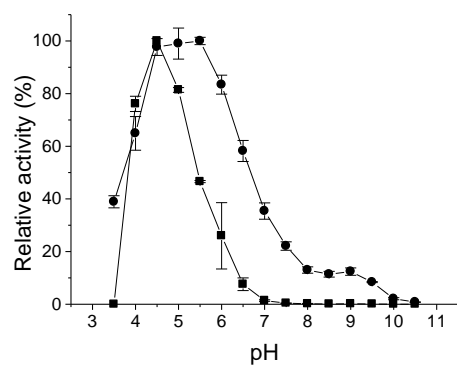
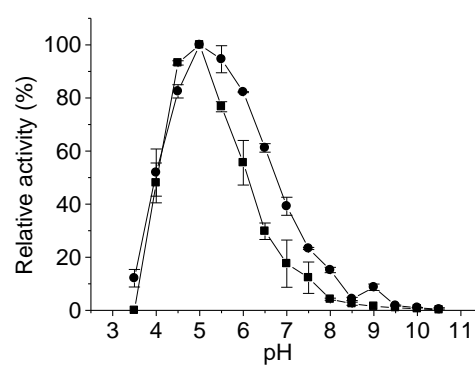


Figure 2

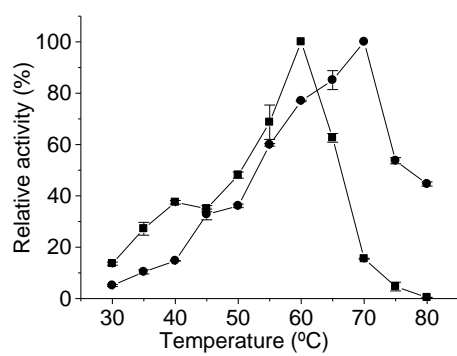
a)



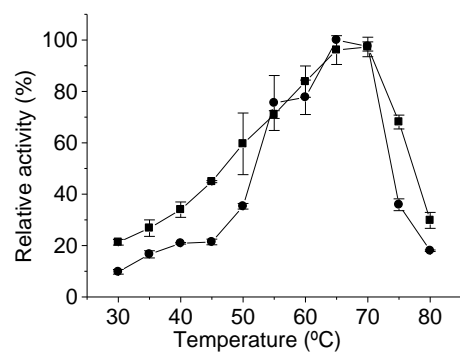
b)

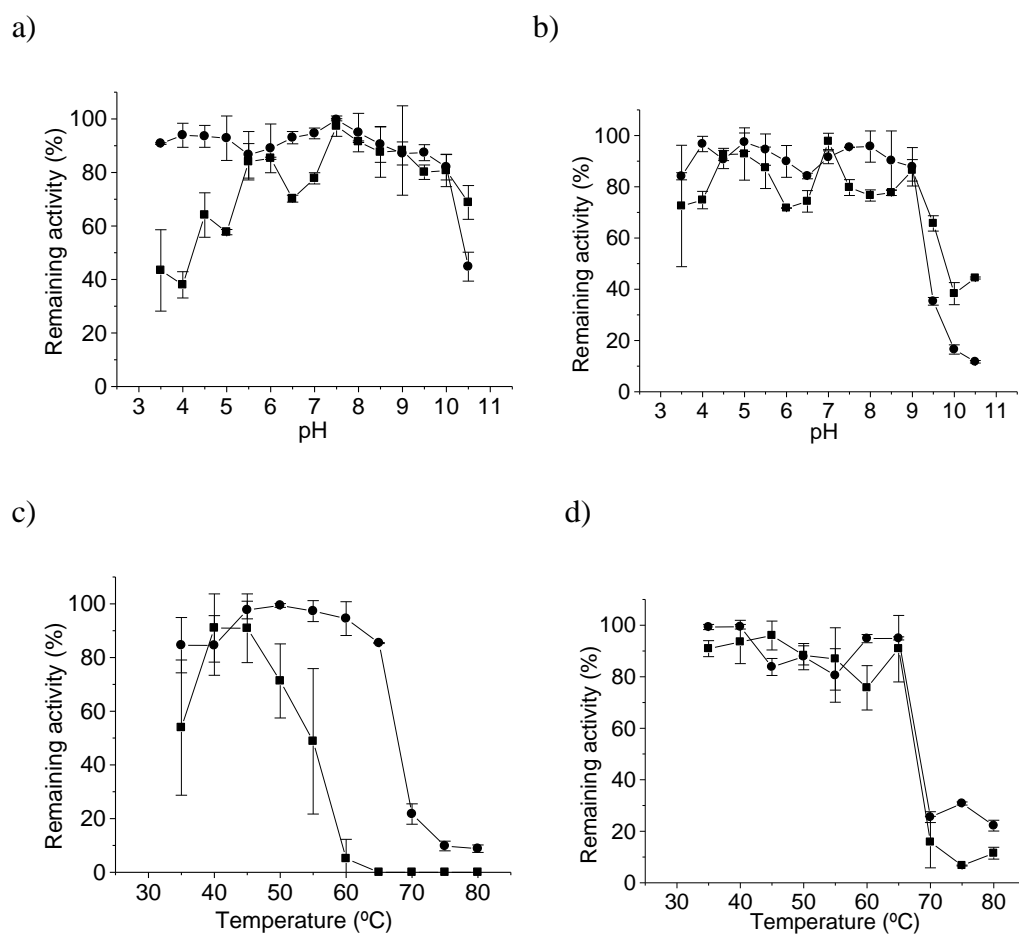


c)



d)

**Figura 3:**

**Figure 4:**

Capítulo III

*Hidrólise Enzimática de bagaço
de cana de açúcar tratado com
microondas para produção de
açúcares*

Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar tratado com microondas para produção de açúcares

Marcia Maria de Souza Moretti¹, Daniela Alonso Bocchini-Martins¹, Roberto Da Silva¹, Maurício Boscolo², Eleni Gomes¹.

¹Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE-Universidade Estadual Paulista-Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica, IBILCE-Universidade Estadual Paulista-Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Autor Correspondente: Eleni Gomes, Departamento de Biologia, IBILCE-Universidade Estadual Paulista-Unesp, São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd Nazareth, CEP; 15054-000, São Paulo, Brasil

E-mail: eleni@ibilce.unesp.br Fone: + 55 17 3221 2393, Fax + 55 17 3221 2390

As eficiências de ácido fosfórico, glicerol e água no tratamento do bagaço de cana sob a ação de microondas, foram comparadas em termos de liberação de compostos fenólicos, açúcares redutores e favorecimento da hidrólise enzimática. O tratamento com microondas por 5 min a 180 °C, em presença de glicerol proporcionou a maior liberação de açúcares redutores e compostos fenólicos (0,09 e 0,74%, respectivamente). As hidrólises enzimáticas do bagaço tratado e não tratado foram realizadas utilizando-se preparados enzimáticos obtidos pelo cultivo de *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp M.7.7 por FES, a 45 °C, por 240 e 192 h, usando misturas de palha de milho e farelo de trigo e bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), respectivamente. O tratamento com glicerol foi o mais eficiente em termos de facilitação da hidrólise enzimática subsequente. A máxima liberação de açúcares redutores (4,6% - em relação ao peso seco do bagaço) foi obtida após 24 h de hidrólise, a 55 °C, usando-se 5,0 mL do preparado enzimático de *A. fumigatus* M.7.1. Sob as mesmas condições, a liberação

máxima de açúcares redutores utilizando-se a solução enzimática de *Myceliophthora* sp. M.7.7 foi de 3,6%. Análises por HPAEC-PAD levaram a identificação de arabinose, galactose, glicose, xilose, xilobiose e celobiose como os açúcares liberados na hidrólise enzimática. As atividades das celulases e xilanases foram avaliadas na presença de diferentes concentrações de xilose e glicose, sendo que as β -glucosidases de ambos os fungos e a xilanase de *Myceliophthora* sp. M.7.7 foram inibidas por glicose e xilose, respectivamente.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora* sp, bagaço de cana de açúcar, microondas, glicerol e hidrólise enzimática.

1. Introdução

O bagaço de cana de açúcar é um resíduo produzido em grande quantidade pelas indústrias de açúcar e álcool. Em geral 1 tonelada de cana de açúcar gera 280 kg de bagaço, sendo parte dele utilizado na própria indústria para geração de vapor e eletricidade (Sun et al., 2004; Martín et al., 2002). O alto conteúdo de carboidratos e a grande disponibilidade desse resíduo fazem com que o bagaço seja um substrato particularmente interessante para conversão a etanol (Martín et al., 2002). A celulose e a hemicelulose correspondem as maiores frações da biomassa lignocelulósica e podem ser hidrolisadas em glicose e xilose, respectivamente por enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Porém, a hidrólise enzimática pode ser comprometida por vários fatores inerentes a estrutura do material, como a baixa porosidade, que reduz a área de superfície acessível a enzima, a cristalinidade da fibra de celulose e o teor de lignina, que pode chegar a mais de 15% no bagaço (Karimi et al., 2006). Essas propriedades muitas vezes exigem que o bagaço seja submetido a tratamentos físicos, químicos ou

físico-químicos antes da hidrólise enzimática. Os tratamentos desorganizam a estrutura do material lignocelulósico e expõem a celulose e hemicelulose a ação das enzimas ou ainda de ácidos diluídos aumentando os rendimentos. Geralmente a hidrólise sem o pré tratamento apresenta um rendimento de menos de 20% enquanto que com o pré tratamento podem exceder 90% (Balat et al., 2008). Além disso, a facilitação da hidrólise pelos tratamentos permite condições mais brandas de operação (Hamelinck et al., 2005). Alguns exemplos de tratamentos descritos são: a explosão por vapor, amônia ou CO₂ (Martin et al., 2002; Martin et al., 2006; Sun; Cheng, 2002), água quente (Laser et al., 2002), peroxidação (Martin et al., 2006), tratamentos ácida com H₂SO₄ ou HCl (Sun; Cheng, 2002), com ácido peracético (Teixeira et al., 1999) ou tratamentos alcalinos com NaOH (Kurakake, et al., 2001) e solventes orgânicos (Demirbas, 1997). O tratamento do material lignocelulósico pode ainda ser feito por métodos com diferentes formas de energias de alta frequência como radiação ionizante, ultra-som e microondas (Martín et al., 2006).

A ação das microondas sobre moléculas de água provoca um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento. Os choques provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo ligno-hemicelulósico (Banik et al., 2003). O tratamento com microondas tem apresentado resultado positivo na digestão da biomassa para liberação de açúcares redutores, principalmente quando são associados a tratamentos químicos, em meios ácidos e alcalinos (Gray et al., 2006).

O presente estudo avaliou a aplicação do tratamento com microondas sobre o bagaço de cana de açúcar em diferentes soluções químicas, visando a desestruturação do mesmo e facilitação da hidrólise enzimática subsequente. Para a hidrólise enzimática

foram usadas soluções enzimáticas brutas obtidas pelos cultivos de *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora sp* M.7.7 em fermentação em estado sólido tendo misturas de palha de milho e farelo de trigo, e bagaço de cana e farelo de trigo como substratos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos e produção das enzimas

As linhagens *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora sp.* M.7.7, isoladas de pilhas de bagaço de cana de açúcar (Moretti et al., 2009), foram usadas no presente estudo. Os estoques das culturas foram mantidos em agar Saboroud, sob água e óleo mineral, a temperatura ambiente e em 20% de glicerol a -80 °C.

Para obtenção dos extratos enzimáticos brutos os fungos *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora sp.* M.7.7 foram cultivados em palha de milho e farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo (9:1 p/p) por 240 e 192 h a 45 °C, em fermentação em estado sólido (FES) conforme descrito em Moretti (2009).

2.2. Medida das atividades enzimáticas

Todos os ensaios das enzimas foram realizados a 55 °C por 10 min (exceto ferruloil esterase). As enzimas endoglucanase, endoxilanase e pectinase foram determinadas quantificando-se o açúcar redutor liberado após a hidrólise do substrato, aplicando-se o método DNS (Miller, 1959). As misturas de reação continham 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo carboximetilcelulose (CMC) 4 %, xilana (birchwood) 2 %, pectina Citrus 1%, respectivamente e 0,1 mL de solução enzimática bruta. A atividade enzimática foi expressa em Unidades Internacional (U), como a

quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por 1 min. As atividades de β -glucosidase e β -xilosidase foram determinadas a 410 nm, usando-se 0,05 mL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo e 4-nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo (PNPG e PNPX -4 mM), como substratos, respectivamente, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. As reações foram interrompidas pela adição de 2,0 mL de Na_2CO_3 2 M. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

A atividade de feruloil esterase (FE) foi determinada pela medida de produção de 4-Nitrofenol de 4- Nitrofenol ferulato. A solução de substrato foi preparada pela mistura contendo 90% de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, contendo 2,5% de Triton X-100 com 10% de 4- Nitrofenol ferulato 10,5 mM em DMSO. A mistura de reação foi composta de 0,1 mL de enzima e 2,0 mL da solução de substrato, a mesma foi mantida a 25 °C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm de acordo com o método proposto por Mastihuba (2002). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de 4- Nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio.

A atividade de lacase foi determinada a 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), usando solução ABTS 5 mM como substrato (Bourbonnais; Paice, 1988). As medidas foram feitas em tampão acetato de sódio a 0,1 M, pH 5,0. A atividade de manganês peroxidase (MnP) foi determinada usando MnSO_4 400 mM como substrato. O produto da reação foi medido a 240 nm ($\epsilon_{240} = 8,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Glenn et al.,1986; Aitken; Irvine, 1990). A mistura de reação continha tampão lactato de sódio 50 mM, pH 4,5. A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada a 310 nm ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) usando álcool veratrílico 40 mM como substrato (Tien; Kirk, 1988). A mistura de

reação era composta por tampão tartarato de sódio 50 mM, pH 5,0. A adição de H₂O₂ (concentração final 40 µM e 0,2 mM) deu início à reação de MnP e LiP, respectivamente.

2.3. Tratamento do bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana triturado e retido em peneiras de 1 a 3 mm foi submetido à radiação de microondas (2450 MHz) a pressão atmosférica. O forno foi programado em 50 % da potência e o tempo reacional foi de 5 min. Os ensaios foram feitos em balão de fundo redondo de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana de açúcar, adicionando-se 30 mL de diferentes diluentes; H₂O (controle), ácido fosfórico pH 3,0 e glicerol (100%). Após o tratamento, foram acrescentados 30 mL de água destilada ao balão para a retirada do material pré-tratado, o mesmo foi filtrado a vácuo, onde o filtrado foi utilizado para análise de açúcares redutores e compostos fenólicos e o bagaço foi lavado em água destilada e seco a 60°C.

2.4. Hidrólise enzimática do bagaço de cana

A hidrólise enzimática das amostras foi realizada em frascos de 20 mL contendo 2 mL de tampão acetato (pH 5,0, 0,1 M), 0,1 g de diferentes amostras de bagaço de cana de açúcar e volumes de 0 (controle), 2,5 e 5,0 mL de solução enzimática bruta que apresentavam 8,1 U/mL de endoglucanase, 581,9 U/mL de endoxilanase, 0,1 U/mL de β-glucosidase, 0,8 U/mL de pectinase e 0,1 U/mL de β-xilosidase (*Aspergillus fumigatus* M.7.1) e 9,4, 43,5, 0,24, 0,7 U/mL, respectivamente, (exceto β-xilosidase) para enzima de *Myceliophthora* sp. M.7.7. A mistura foi incubada a 55 °C em shaker a 150 rpm por períodos de 0, 1, 3, 10 e 24h. As amostras, após os respectivos períodos de

hidrólise, foram filtradas a vácuo. O filtrado foi usado para dosagem de açúcares redutores e compostos fenólicos e o material retido no filtro foi lavado com 30 mL de água destilada e incubado a 60 °C para realização de peso seco.

2.5. Efeito da glicose e xilose sobre as atividades de endoglucanase, endoxilanase, β -glucosidase e β -xilosidase

As atividades de β -glucosidase e β -xilosidase foram quantificadas na presença de glicose e xilose, em concentrações de 2,0 a 20,0 mM, enquanto que nas atividades de endoglucanase e endoxilanase foram usados os respectivos carboidratos nas concentrações 2,0 a 8,0 mM na mistura de reação. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio contendo 0,1 M, pH 5,0, a 55 °C e PNPG e PNPX (4mM), CMC (4%) e xilana (2%) foram usados como substrato nas atividades de β -glucosidase, β -xilosidase, endoglucanase e endoxilanase, respectivamente.

2.6. Métodos analíticos

Os açúcares redutores liberados após o tratamento com microondas e hidrólise enzimática, foram analisados utilizando o método Somogy-Nelson (1952), a partir da curva padrão de glicose. Os compostos fenólicos liberados após o tratamento foram analisados utilizando o método de Singleton e colaboradores (1999), a partir da curva padrão de ácido vanílico. As análises dos carboidratos foram feitas usando HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation , EUA), equipado com amostrador automático AS40, coluna de troca aniônica CarboPac PA-1. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes pulsos potenciais e durações: $E_1= 0,10V$ ($t_1=0,40s$); $E_2= -2,00V$ ($t_2=0,02s$); $E_3= 0,60V$ ($t_3=0,01s$); $E_4= 0,10V$ ($t_4=0,06s$). Os

diluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18M Ω) e desgaseificada com N₂. O fluxo foi de 1mL/min com solvente A (200 mM de NaOH), solvente B (água ultra pura) e solvente C (500 mM de acetato de sódio com 150 mM de NaOH). Com eluição isocrática de 0 a 14 min com 5% de A, 95% de B e 0% de eluente C. Após 14 min a eluição foi gradiente até 30 min chegando a 90% de A, 0% de B e 10% de C. Para as análises dos açúcares foram usados padrões de glicose, xilose, galactose, arabinose, xilobiose e celobiose

3. Resultados e Discussão

3.1. Produção das enzimas por FES

As produções de xilanase, celulasas e ligninases por *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora sp.* M.7.7 foram avaliadas por fermentação em estado sólido (FES) em misturas de palha de milho e farelo de trigo, e bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente (Tab. 1).

O fungo *A. fumigatus* M.7.1 foi um ótimo produtor de xilanase, porém produziu endoglucanase em menor quantidade quando comparado a *Myceliophthora sp.* M.7.7. Nenhuma cepa produziu quantidades significativas de β -xilosidase ou β -glucosidase. Também não foram detectadas atividades de enzimas do complexo ligninolítico (Tab.1).

Tabela 1: Produção de xilanases, celulases e ligninases por *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7, após 240 e 192 h de cultivo em FES, respectivamente, usando misturas de palha de milho e farelo de trigo, e bagaço de cana e farelo de trigo.

Enzimas	Atividade Enzimática (U/mL)	
	<i>A. fumigatus</i> M.7.1	<i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7
Endoxilanase	582 ± 41	44 ± 4
Endoglucanase	8,1 ± 0,0	9,4 ± 0,4
β-xilosidase	0,1 ± 0,0	nd
β-glucosidase	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Pectinase	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Manganês Peroxidase	nd	nd
Lignina Peroxidase	nd	nd
Lacase	nd	nd
Ferruloil Esterase	nd	nd

nd= atividade não detectada

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo de fungos por fermentação em estado sólido é vantajosa, pois geralmente, induz a produção de várias enzimas de degradação de material lignocelulósico, permitindo sua obtenção em altas concentrações, além de reduzir os custos do processo (Pandey et al., 2000; Singhania et al., 2007).

Os gêneros *Aspergillus* sp. e *Myceliophthora* sp. pertencem a um grupo de microrganismos que produzem enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal (Vries; Visser, 2001, Badhan et al, 2007). Porém, ambos os gêneros não são citados como produtores de enzimas ligninolíticas. Segundo Martínez e colaboradores (2009), os microrganismos ascomicetos diferentemente do grupo basidiomiceto apresentam baixo potencial na produção de enzimas envolvidas na degradação da lignina. Já no caso da enzima ferruloil esterase há vários relatos de

produção destas enzimas por fungos desse grupo na literatura, (Xiros et al., 2009), (Shim; Chen, 2006) e (Panagiotou et al., 2007). É possível que as condições de fermentação e/ou de determinação das atividades de ligninases não tenham permitido a detecção da presença dessas enzimas no meio de cultivo dos fungos.

3.2. Tratamento do bagaço com microondas e hidrólise enzimática

O tratamento do bagaço de cana de açúcar com microondas (5 min, a 180 °C) promoveu uma liberação de 0,01 a 0,09 mg de açúcares redutores por 100 mg de peso seco de bagaço (Tab. 2). Esses valores foram bastante baixos quando comparados a dados da literatura com outros materiais lignocelulósicos. Dogaris e colaboradores (2009) trataram bagaço de sorgo com H₂O em microondas, sob diferentes condições (tempo e temperatura), e obtiveram um rendimento de 1% em açúcares redutores. Essas diferenças nos permitem inferir que a estrutura do bagaço de cana é mais recalcitrante a radiação de microondas mesmo em pH ácido e em presença de glicerol. Geddes e colaboradores (2010) submeteram bagaço de cana a explosão a vapor em meio acidificado com ácido fosfórico e obtiveram uma liberação de 30% de açúcares redutores. Lloyd e colaboradores (2005) obtiveram rendimentos de glicose e xilose de 33% após tratamento de talo de milho a 180 °C, por 10 min, a pH 2,5 (H₂SO₄). Li e colaboradores (2009) utilizaram solução ácido sulfúrico diluído (3%) para tratamento de grama em banho de óleo a 160 °C, por 2 h, e obtiveram rendimentos de açúcares de 30%.

A comparação dos dados do presente trabalho com os acima expostos indicam que, provavelmente, a radiação microondas leva a quebra insignificante dos polissacarídeos da parede celular, entretanto, promoveu uma solubilização da lignina.

Tabela 2: Liberação de açúcares redutores e fenóis do bagaço de cana de açúcar suspenso em diferentes soluções, após 5 min de tratamento em microondas.

Solução usada para tratamento com microondas	Porcentagem de açúcar liberado (%)	Porcentagem de fenol liberado (%)
H₂O	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00
H₃PO₄ (pH 3,0)	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Glicerol (100%)	0,09 ± 0,00	0,74 ± 0,00

% = mg de açúcar por 100 mg de peso seco de bagaço

Dos solventes escolhidos para os tratamentos, o que proporcionou maior liberação de açúcares (0,09 %) foi o glicerol. Esse composto foi usado por Sun e Chen (2008a) para hidrólise de palha de trigo, a 190 °C, por 2 horas, levando à liberação de 22% de açúcares. E a 240 °C, por 2 h, foram liberados 38% de açúcares. A grande diferença entre as quantidades de açúcares liberados nos experimentos realizados no presente trabalho e nos citados por Sun e Chen (2008) podem ser devidas às diversas composições dos substratos e condições de tratamento.

Solventes orgânicos, como o glicerol, são descritos como sendo muito eficientes na separação da biomassa em três principais frações: a hemicelulose, solúvel na fase aquosa; a lignina, solúvel na fase orgânica, e a celulose, a qual permanece sólida (Demirbas, 1997). Sun e Chen (2008a), quando trataram palha de trigo a 190 °C, por 2 h observaram uma remoção de 39% do conteúdo de lignina do material. Sun e Chen (2008b), em outro trabalho, testaram glicerol industrial, glicerol cru de produção e glicerol cru de produção de biodiesel, sendo que os experimentos realizados utilizando glicerol industrial a 220 °C, por 3 h, removeu 64 % da lignina original da palha de trigo. No presente estudo, utilizando-se glicerol sem a presença de água, houve liberação de 0,74% de compostos fenólicos, o que é indicativo da degradação da lignina.

Provavelmente, a ausência de água no tratamento com glicerol teria reduzido a quebra dos polissacarídeos. Esse pode ser um importante procedimento quando se visa desestruturar o material, reduzir o nível lignificação e manter a quantidade de polissacarídeos, para uma posterior hidrólise enzimática.

Com o propósito de se avaliar a influência da quantidade das enzimas na hidrólise, foram usados 2,5 e 5 mL do extrato enzimático (Tab..3).

Tabela 3: Preparado enzimático de *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7 utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço.

Microrganismo	Extrato enzimático (mL)	U totais				
		EG	EX	β-GL	β-XL	PC
<i>A. fumigatus</i> M.7.1	2,5	20,3	1455	0,3	0,3	2,0
	5,0	40,5	2910	0,5	0,5	4,0
<i>Myceliophthora</i> sp. M.7.7	2,5	23,5	110	0,5	nd	1,8
	5,0	47,0	220	1,0	nd	3,5

Onde: EG = endoglucanase; EX = endoxilanase; β-GL = β-glicosidase, β-XL = β-xilosidase; PC = pectinase e nd= atividade não detectada

As Figuras 1 e 2 apresentam os dados de hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado com microondas e do bagaço não tratado, utilizando-se as soluções enzimáticas brutas de *A. fumigatus* M.7.1 e de *Myceliophthora* sp. M.7.7. Os teores de açúcares liberados dos bagaços não tratados e daqueles submetidos a microondas em meio aquoso e em meio aquoso acidificado com H_3PO_4 , por ação das enzimas de *A. fumigatus* M.7.1 foram maiores do que os liberados por *Myceliophthora* sp M.7.7 (máximo 3 e 2 % respectivamente). Valores de até 5% foram obtidos quando o bagaço submetido a microondas em presença de glicerol foi hidrolisado por enzimas de *A. fumigatus* M.7.1 (Fig. 1d).

A quantidade de xilanase presente nas soluções enzimáticas pode ter influenciado na hidrólise, considerando-se que a solução enzimática de *A. fumigatus*

M.7.1 continha 582 U/mL dessa enzima contra 44 U/mL no preparado enzimático de *Myceliophthora sp.* M.7.7. Entretanto, se for considerada a quantidade de enzima usada (Tab. 3) e as quantidades de açúcares liberados (Fig. 1) é possível inferir que o preparado enzimático de *Myceliophthora sp.* M.7.7 foi mais eficiente na hidrólise do bagaço do que o de *A. fumigatus* M.7.1. Destaque-se que os teores de celulases foram muito semelhantes (8,1 e 9,4 U/mL, respectivamente). A maior velocidade de hidrólise ocorreu entre 1 e 10 h de incubação, com exceção do ensaio no qual o bagaço tratado com glicerol foi usado. Nesses ensaios houve um aumento linear dos açúcares redutores até 24 horas. Considerando que esse tratamento foi o que proporcionou maior perda de lignina, possivelmente tenha exposto as fibras facilitando o acesso das enzimas às mesmas.

Sun e Chen (2008), também obtiveram resultados positivos durante a sacarificação enzimática, após tratar a palha de milho com glicerol sob aquecimento. Dogaris e colaboradores (2009) obtiveram 15% de aumento na hidrólise do bagaço de sorgo tratado com microondas em relação ao bagaço não tratado. Poucas pesquisas têm explorado o uso de solventes orgânicos no pré tratamento de materiais lignocelulósicos (Demirbas, 1998), principalmente em relação à associação destes solventes a tratamentos físicos, como o microondas.

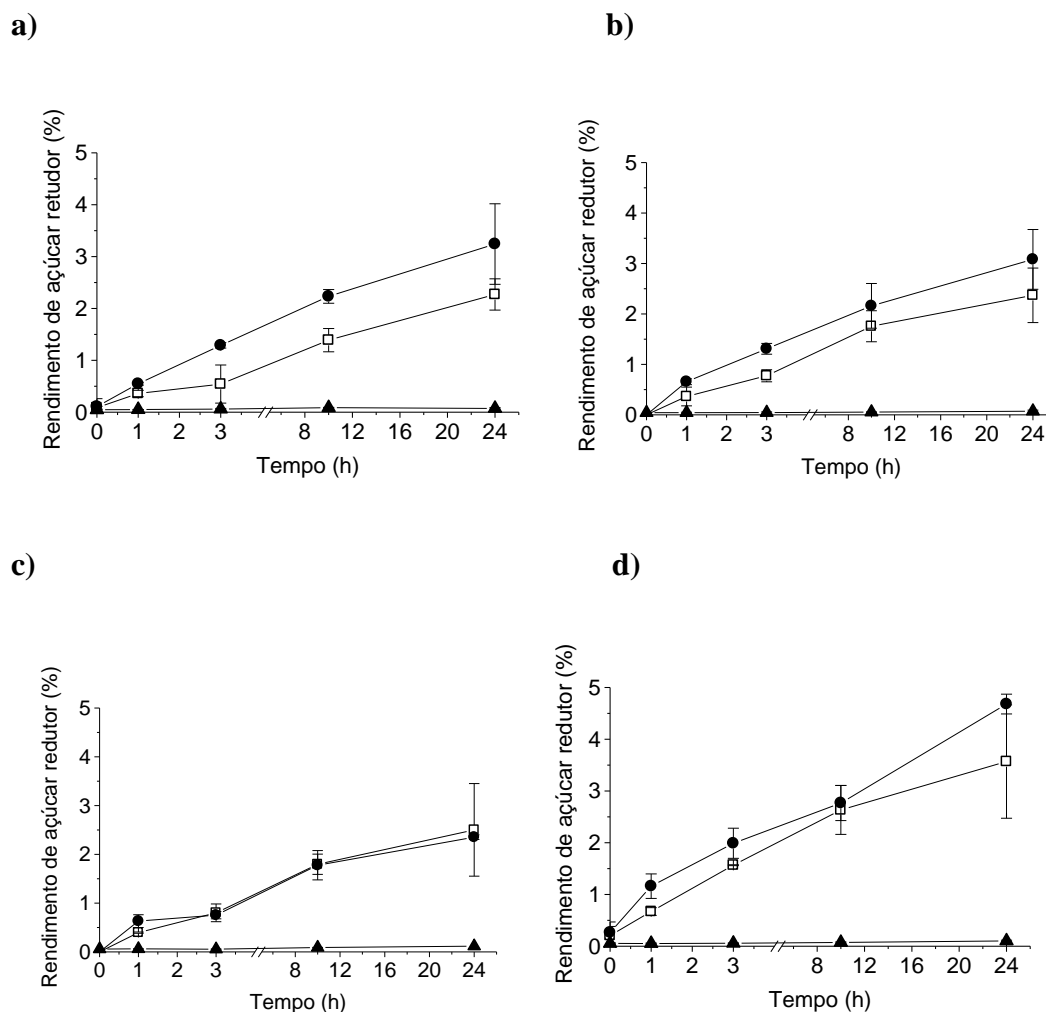


Figura 1: Liberação de açúcares redutores (mg/100 mg peso seco) a 55°C, utilizando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *Aspergillus fumigatus* M.7.1, em FES, a 45 °C, por 240 h sobre as amostras não tratado (a); bagaço tratado com água (b); bagaço tratado com ácido fosfórico (c) e bagaço tratado com glicerol (d).

controle usando água (▲), hidrólise usando 2,5 mL de enzima (□); hidrólise usando 5,0 mL de enzima (●). em 2,5 mL enzima: endoglucanase 20,3 U/mL, endoxilanase 1455 U/mL, β -glucosidase 0,3 U/mL, β -xilosidase 0,3 U/mL, pectinase 2,0 U/mL; em 5,0 mL enzima: endoglucanase 40,5 U/mL, endoxilanase 2910 U/mL, β -glucosidase 0,5 U/mL, β -xilosidase 0,5 U/mL, pectinase 4,0 U/mL.

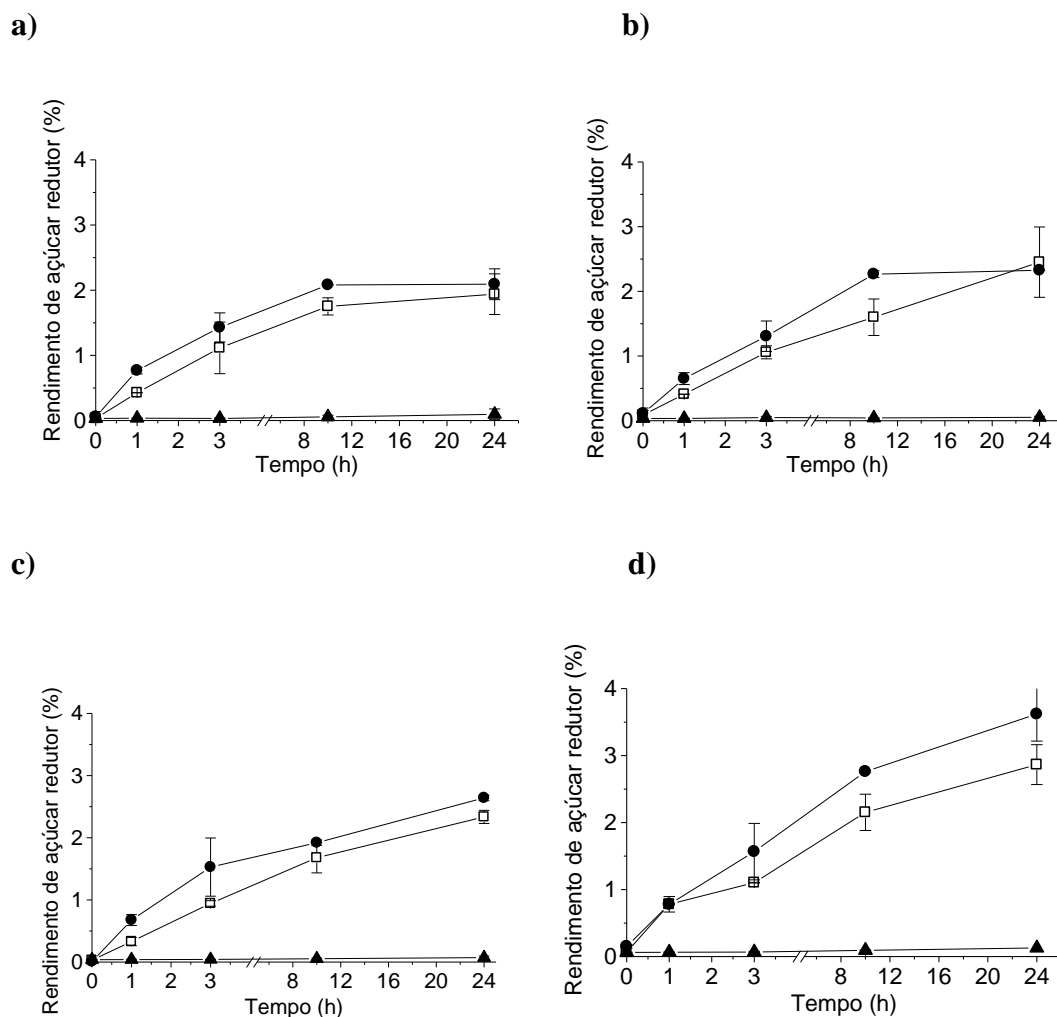


Figura 2: Liberação de açúcares redutores (mg/100 mg peso seco), a 55°C, utilizando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *Myceliophthora* sp. M.7.7 em FES, a 45 °C, por 192 h sobre as amostras bagaço não tratado (a); bagaço tratado com água (b); bagaço tratado com ácido fosfórico (c) e bagaço tratado com glicerol (d).

controle usando água (▲), hidrólise usando 2,5 mL de enzima (□); hidrólise usando 5,0 mL de enzima (●). em 2,5 mL enzima: endoglucanase 23,5 U/mL, endoxilanase 110 U/mL, β-glucosidase 0,5 U/mL, pectinase 1,8 U/mL; em 5,0 mL enzima: endoglucanase 47,0 U/mL, endoxilanase 220 U/mL, β-glucosidase 1, U/mL, pectinase 3,5 U/mL.

3.3. Análises de peso seco do bagaço e identificação dos carboidratos liberados após a hidrólise enzimática

Os pesos secos das amostras de bagaço tratado e não tratado submetidos às ações das enzimas de ambos os fungos não variaram significativamente (Fig. 3 e 4). Nota-se que houve uma perda de até 10% no peso seco durante o processo de incubação por 24 h em meio aquoso, independente da presença da enzima. Nos ensaios nos quais foi usado o preparado enzimático de *A. fumigatus* M.7.1 observou-se que houve perda maior dos pesos secos pela ação das enzimas de sobre o bagaço tratado com microondas e glicerol (Fig. 3d),

A perda de massa do material lignocelulósico tem sido uma referência para avaliação da ação das enzimas sobre materiais lignocelulósicos (Geddes et al., 2010), entretanto, no presente trabalho os dados não permitiram uma inferência sobre o potencial das enzimas testadas em levar a perda de massa do material.

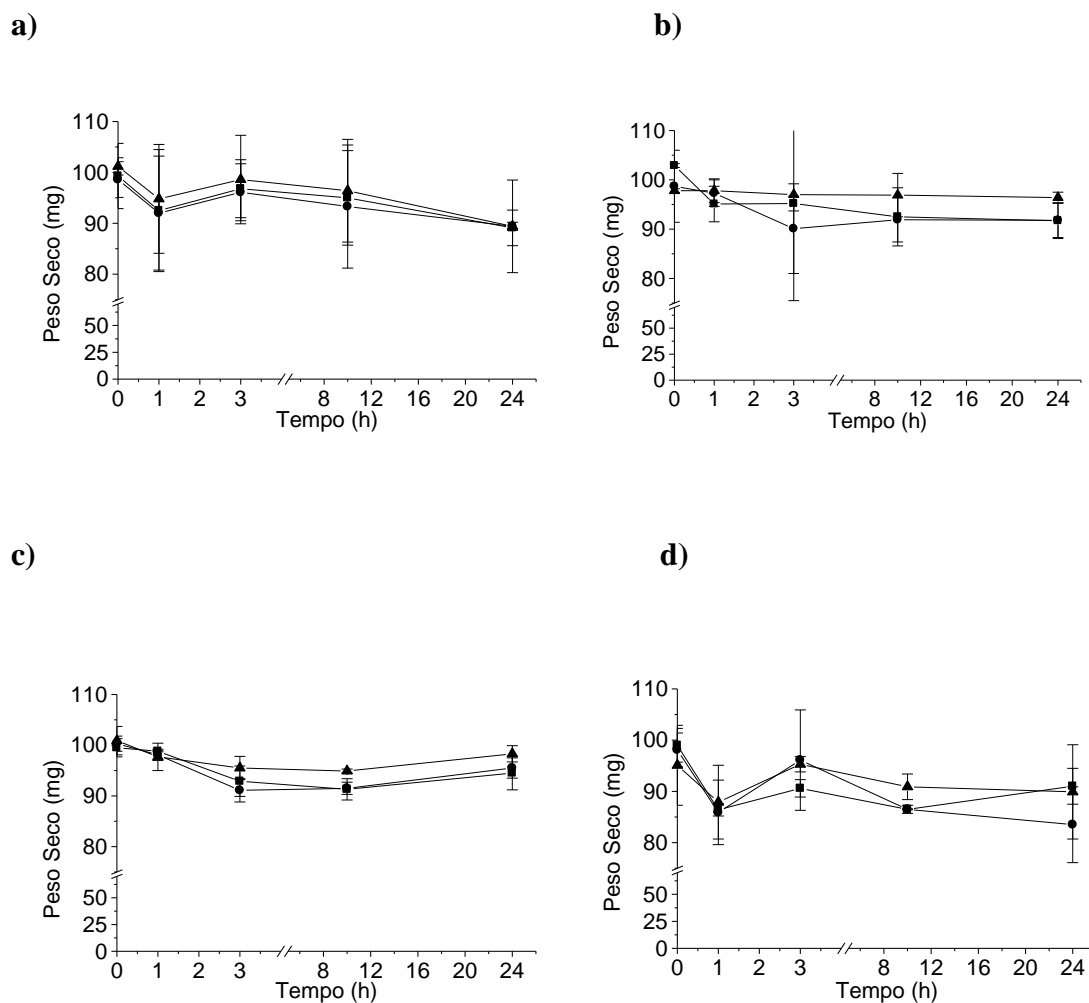


Figura 3: Peso seco do bagaço de cana após hidrólise enzimática utilizando as enzimas produzidas por *Aspergillus fumigatus* M.7.1, por FES a 45 °C em 240 h de cultivo; bagaço não tratado (a) bagaço tratado com água (b) bagaço tratado com ácido fosfórico (c) e bagaço tratado com glicerol (d); (■) hidrólise usando 2,5 mL de enzima, (●) hidrólise usando 5,0 mL de enzima (▲) hidrólise usando água destilada, nos tempos 0, 1, 3, 10, e 24 h a 55 °C.

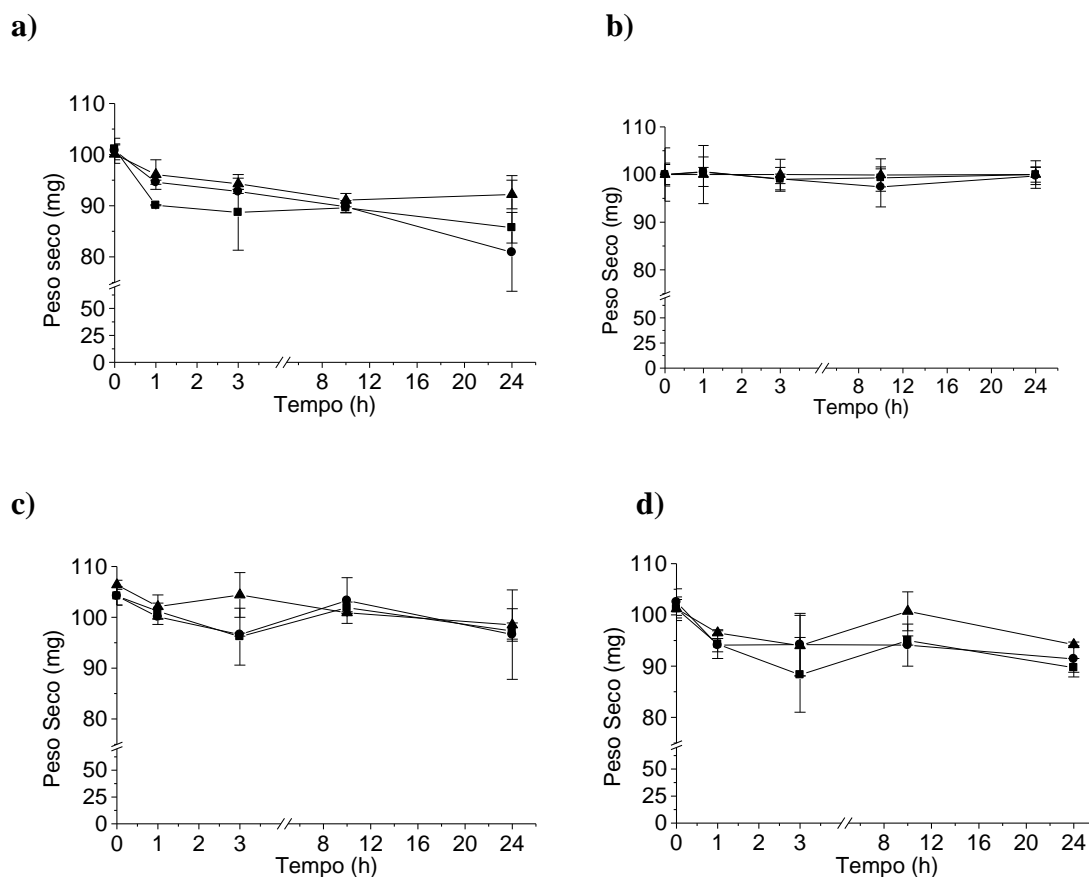


Figura 4: Peso seco do bagaço de cana após hidrólise enzimática utilizando as enzimas produzidas por *Myceliophthora* sp. M.7.7, por FES a 45 °C em 192 h de cultivo; bagaço não tratado (a) bagaço tratado com água (b) bagaço tratado com ácido fosfórico (c) e bagaço tratado com glicerol (d); (■) hidrólise usando 2,5 ML de enzima, (●) hidrólise usando 5,0 mL de enzima (▲) hidrólise usando água destilada, nos tempos 0, 1, 3, 10, e 24 h a 55 °C.

Os hidrolisados enzimáticos do bagaço de cana tratado em microondas e do bagaço não tratado (*in natura*), usando as enzimas de *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7 foram analisadas por HPAEC-PAD. Nestas análises, foram identificados e quantificados os carboidratos glicose, xilose, arabinose, galactose celobiose e xilobiose (Fig. 5), através de suas respectivas curvas de calibração ($R = 0,984; 0,998; 0,997; 0,997; 0,999; 0,999$).

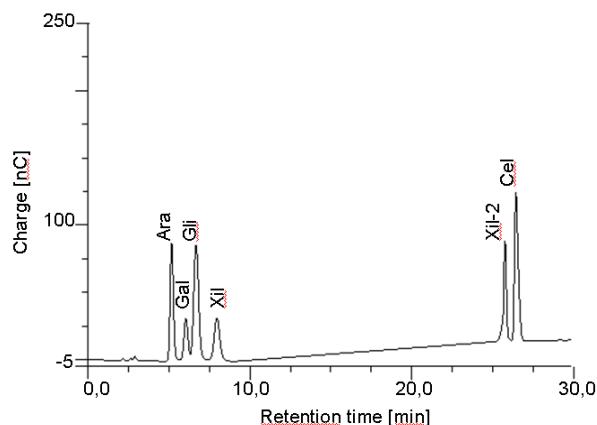


Figura 5: Padrões usados na identificação dos carboidratos identificados nas análises feitas por HPAEC-PAD; Ara (arabinose), Gal (galactose), Gli (glucose), Xil (xilose), Xil-2 (xilobiose) e Cel (celobiose).

A Tabela 4 apresenta os resultados da identificação dos carboidratos nos filtrados de bagaço de cana após 24 h de incubação, a 55 °C sob a ação de 2,5 e 5,0 mL dos preparados enzimáticos produzidos por *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7. Os resultados obtidos são consistentes com aqueles da Figura 1. As quantidades de glicose obtidas no hidrolisado de bagaço incubado com 2,5 mL de enzima de ambos microrganismos foram similares (Tab. 4).

A. fumigatus M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7. produziram pequenas quantidades de β -glucosidase, porém no extrato enzimático de *Myceliophthora* sp. M.7.7 esta enzima foi levemente maior (Tab. 3). Apesar da baixa quantidade desta enzima no extrato enzimático de *Myceliophthora* sp. M.7.7, a mesma foi eficiente na hidrólise, considerando-se a diminuição da quantidade de celobiose, seguida do aumento na quantidade de glicose, nos hidrolisados durante o experimento (Tab. 4)

enquanto nas hidrólises utilizando-se o extrato enzimático de *A. fumigatus* M.7.1, houve acúmulo de celobiose (Tab. 4).

Pelos dados mostrados na Tabela 4, observa-se que o aumento na quantidade de enzima utilizada nos experimentos de hidrólise não levou a um aumento significativo na quantidade de açúcares liberados. Resultados similares foram apresentados por Damaso e colaboradores (2004) quando hidrolisaram o bagaço de cana com 1000 e 2000 U de enzima, após 24 h.

Cabe ressaltar ainda que, no presente trabalho, a diminuição na taxa de liberação de açúcares pode estar relacionada com a inibição da atividade enzimática pelos produtos de hidrólise. Sabe-se que a atividade da endoglucanase é inibida pela celobiose e, menos extensivamente, pela glicose, enquanto que as enzimas β -glucosidases são geralmente inibidas pela glicose e em alguns casos pelo seu substrato, celobiose (Phlipidis et al., 1993; Ladisch et al., 1983).

Apesar dos preparados enzimáticos de *A. fumigatus* M.7.1 apresentarem atividade de endoxilanase 13 vezes superior à observada no extrato enzimático de *Myceliophthora* sp. M.7.7 (Tab. 3), sua ação sobre a hemicelulose não foi mais eficiente considerando-se a quantidade de xilobiose liberada (Tab. 4). O alto teor de xilobiose nos hidrolisados pode ser devido ao fato dos extratos enzimáticos produzidos por *A. fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora* sp. M.7.7 apresentarem pouco e nenhuma atividade, respectivamente, da enzima β -xilosidase. Entretanto, a hidrólise com o extrato enzimático *A. fumigatus* M.7.1 liberou o dobro de xilose quando a maior quantidade de enzima (5,0 mL) foi utilizada (Tab. 4). Este fato pode ser devido a β -xilosidase do mesmo não ser inibida por xilose (Fig. 6 c). Durante a hidrólise enzimática também houve a liberação de arabinose. Contudo, a concentração de galactose presente nos

extratos enzimáticos (ver controle) diminuiu durante a hidrólise, chegando a não ser detectada em alguns experimentos o que indica que este monossacarídeo possa ter sido polimerizado em algum outro carboidrato através da ligação com os açúcares presentes no meio.

Os resultados obtidos pelas análises por HPAEC-PAD condizem com os resultados das (Fig. 1, 2), onde se conclui que o tratamento que proporcionou maior liberação de carboidratos durante a hidrólise enzimática foi o glicerol. Provavelmente, o glicerol, sob a ação de microondas, agiu sobre a fração hemicelulose das fibras do bagaço deixando-o mais acessível a subsequente hidrólise. Isto pode ser confirmado considerando que a hidrólise usando bagaço em glicerol liberou maiores concentrações de xilobiose e xilose em relação aos outros tratamentos. Estes resultados estão de acordo com a literatura mostrando que o uso de solventes orgânicos atua sobre as ligações internas da hemicelulose (Araque et al., 2008).

Pelos dados apresentados na da Tabela 4, é possível concluir que o preparado enzimático de *Myceliophthora* sp. M.7.7 foi mais eficiente na hidrólise da fração de hemicelulose do bagaço, uma vez que proporcionou a liberação de quantidades de xilobiose e xilose próximas às observadas pelo uso do extrato enzimático de *A. fumigatus* M.7.1., apesar da menor atividade de endoxilanase e ausência de atividade de β -xilosidase.

Tabela 4: Análises por HPAEC-PAD dos carboidratos liberados do bagaço cana de açúcar após 24 h de hidrólise enzimática.

Amostras Bagaço	Carboidratos (µg/mL)					
	Arabinose	Galactose	Celobiose	Glicose	Xilobiose	Xilose
2, 5 mL <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1						
Glicerol ^a	38,6	1,3	42,6	359,0	119,7	75,5
H ₃ PO ₄ ^b	35,9	0,5	24,3	303,6	66,3	36,6
H ₂ O ^c	27,4	0,48	21,2	289,9	65,0	36,6
<i>in Natura</i> ^d	32,0	0,7	15,5	297,0	62,9	39,4
Controle*	12 ± 3	8 ± 3	1,5 ± 0,3	48 ± 13	18 ± 3	34 ± 4
5,0 mL <i>Aspergillus fumigatus</i> M.7.1						
Glicerol	65,4	5,62	27,4	462,1	191,8	132,3
H ₃ PO ₄	41,9	4,7	25,0	321,4	52,8	94,7
H ₂ O	44,0	4,6	18,0	389,7	84,6	91,5
<i>in Natura</i>	55,6	6,7	25,9	387,4	85,1	98,1
Controle	27 ± 1	25 ± 1	1,5 ± 0,2	105 ± 1	47 ± 4	38 ± 2
2,5 mL <i>Myceliophthora</i> sp M.7.7						
Glicerol	34,6	nd	3,3	334,4	106,2	62,8
H ₃ PO ₄	26,5	0,1	9,4	252,4	61,9	46,4
H ₂ O	27,6	nd	8,4	300,6	69,9	32,3
<i>in Natura</i>	19,4	nd	3,3	228,0	53,4	27,6
Controle	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,4	20 ± 0	58 ± 11	13,5 ± 0,6	4,2 ± 0,7
5,0 mL <i>Myceliophthora</i> sp M.7.7						
Glicerol	34,5	nd	8,6	334,6	153,3	73,1
H ₃ PO ₄	31,8	2,7	7,6	297,3	129,7	62,4
H ₂ O	33,2	1,8	9,4	269,8	100,5	48,6
<i>in Natura</i>	27,3	0,6	7,1	255,5	95,8	50,8
Controle	15 ± 1	17 ± 1	40 ± 2,4	89 ± 3	31,8 ± 0,9	9,2 ± 0,3

a- bagaço tratado em microondas com 100% de glicerol .

b- bagaço tratado em microondas com H₃PO₄ pH 3,0.

c- bagaço tratado em microondas com H₂O.

d- bagaço não tratado- *in natura*.

*- controle da hidrólise (ausência de bagaço).

3.4. Efeitos de glicose e xilose sobre as atividades de endoglucanase, endoxilanase, β-glucosidase e β-xilosidase

Com o intuito de se avaliar um possível efeito inibitório dos açúcares liberados na hidrólise do bagaço sobre as enzimas dos preparados enzimáticos usados, as atividades das enzimas foram determinadas em presença de variadas concentrações de glicose e xilose. A atividade endoglucanase e xilanase de *A. fumigatus* M.7.1 não foram inibidas

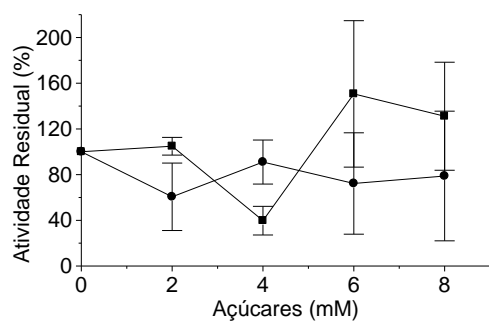
por glicose ou xilose, entretanto, a atividade de β -glucosidase foi inibida em 60% de sua atividade inicial com 4 mM de glicose. A atividade de β -xilosidase desse fungo não foi inibida por glicose ou xilose (Fig. 6 a, c).

A CMCase de *Myceliophthora* sp. M.7.7 não foi inibida por ambos os açúcares, entretanto, a atividade de xilanase foi reduzida em 40% na presença de 6 mM de xilose. (Fig. 7a, b). A β -glucosidase desse fungo foi fortemente inibida por glicose com perda 40% da atividade em presença de 8 mM de glicose e 60% quando a concentração do açúcar foi de 20 mM.

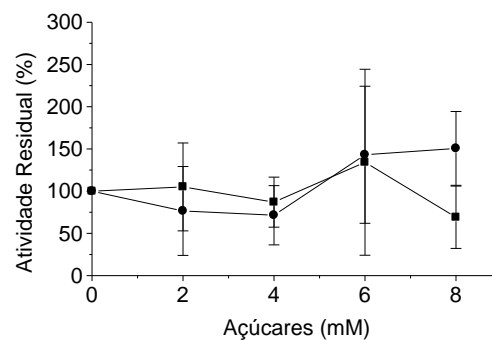
A inibição das β -glucosidases pelo seu produto de hidrólise é comum entre os microrganismos (Sun; Cheng, 2002; Zanoelo et al., 2004). Leite e colaboradores (2008) descrevem as β -glucosidases de *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans*, como sendo fortemente inibidas pela glicose.

Um dado interessante obtido foi a inibição da xilanase de *Myceliophthora* sp M.7.7 pelos monômeros glicose e xilose. Embora o amplo desvio dos dados reduza a confiabilidade dos dados é claramente evidenciado que em concentrações de 8 mM de xilose e glicose a enzima permanece com apenas 60% da atividade e 80% da atividade inicial, respectivamente.

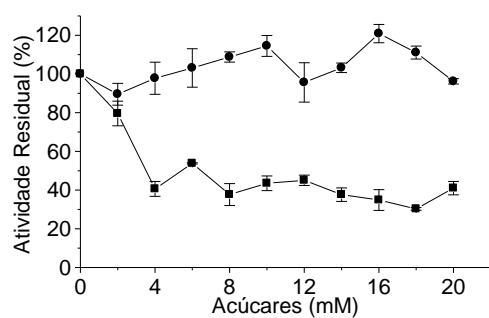
a)



b)



c)



d)

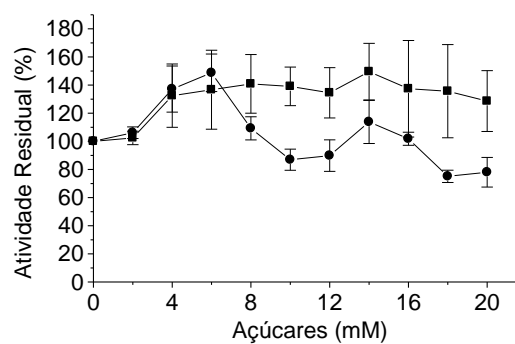


Figura 6: Efeito da (■) glicose e (●) xilose sobre as atividades de endoglucanase (a), endoxilanase (b), β -glucosidase (c) e β -xilosidase (d) de *Aspergillus fumigatus* M.7.1.

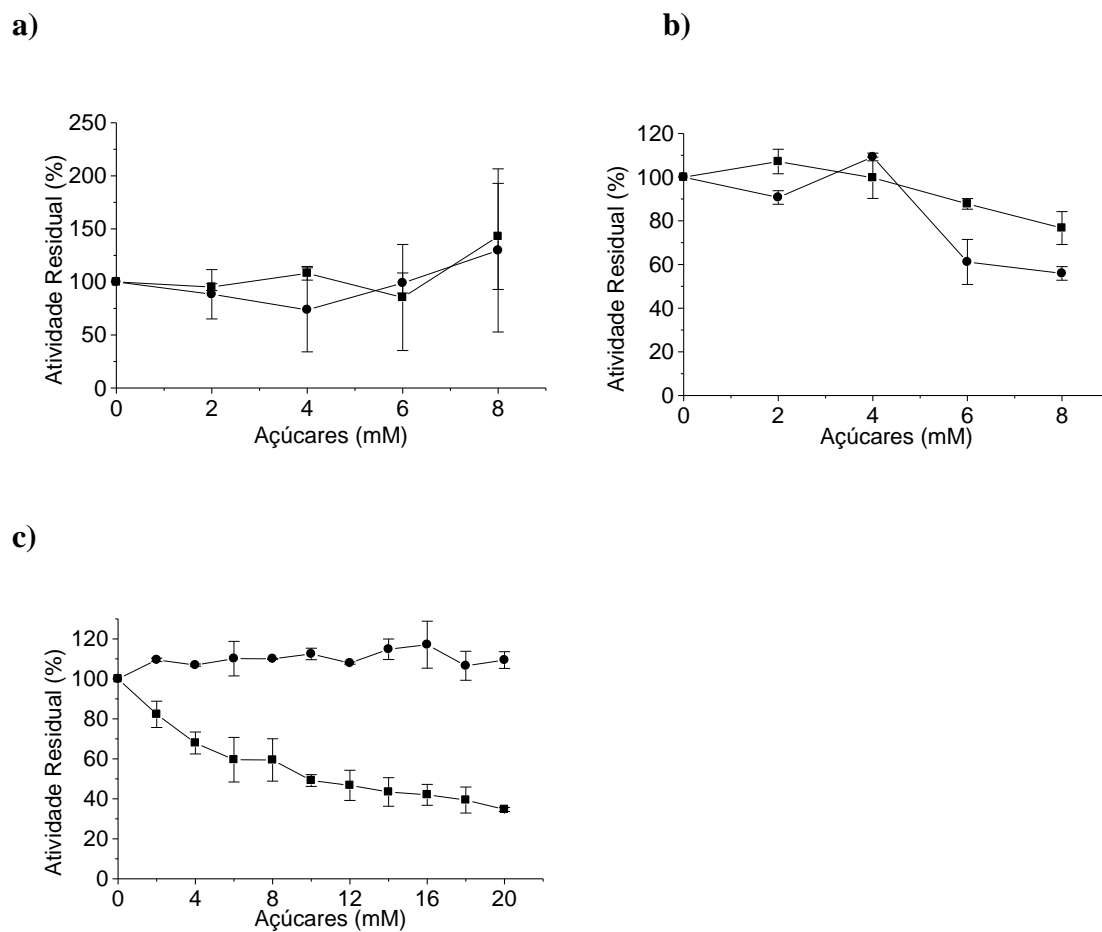


Figura 7: Efeito da (■) glicose e (●) xilose sobre as atividades de, endoglucanase (a), endoxilanase (b) e β -glucosidase (c) de *Myceliophthora* sp. M.7.7.

4. Conclusões

Os resultados apresentados permitem concluir que o fungo *Myceliophthora* sp M.7.7 produziu menores quantidades de enzimas hemicelulolíticas em comparação ao *A. fumigatus* M.7.1 nas condições estudadas, porém, suas enzimas apresentaram maior eficiência na hidrólise do bagaço de cana. O tratamento prévio do bagaço com glicerol e microondas levou à maior solubilização da lignina e facilitou a hidrólise do bagaço pelas enzimas fibrolíticas.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) por seu supor financeiro.

6. Referências Bibliográficas

- Aitken, M.D., Irvine, R.L., 1990. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporum*. Arch. Biochem. Biophys.. 276, 405-414.
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodríguez, J., Mendonça, R., Baeza, J., (2008). Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. Enz. Microb. Technol., v. 43, p. 214–219.
- Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S., Bhat, M.K., 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. Bioresour. Technol. 98, 504-510.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. Prog. Energy Combust. Scien. 34, 551-573.
- Banik, S., Bandyopadhyay, S., Ganguly, S. Bioeffects of microwave-a brief review. Bioresour. Technol. v. 87, p. 155-159, 2003.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1988. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. J. Biochem. 225, 445-450.
- Damaso, M.C.T., Castro, A.M., Castro, R.M., Andrade, C.M.M.C., Pereira Jr, N., 2004. Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic xydrolysis of corncob and sugarcane bagasse Appl. Biochem. Biotechnol. 103, 1003-1012.
- Demirbas, A., 1997. Aqueous glycerol delignification of wood chips and ground wood. Bioresour. Technol. 63, 179-185.

Dogaris, I., Karapati, S., Mamma, D., Kalogeris, E., Kekos, D., 2009. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. *Bioresour. Technol.* 100, 6543-6549.

Geddes, C.C., Peterson, J.J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M.T., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2010. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresour. Technol.*, 101, 1851-1857.

Glenn, J.K., Akileswarean, L., Gold, M.H., 1986. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 688-696.

Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M., 2006. Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141-146.

Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biom. Bioener.* 28, 384-410.

Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M.J., 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. and Microbiol. Technol.* 40, 138-144.

Kurakake, M., Kisaka, W., Komaki, T., 2001. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90, 251-259.

Ladisich, M.R.; Lin, K.W.; Voloch, M. and Tsao, G.T., 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.*, 5-82.

Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal Jr, M.J., Lynd, L.R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 81, 33-44.

Leite, R.S.R., Alves-Prado, H.F., Cabral, H., Pagnocca, F.C., Gomes, E. Da-Silva, R., 2008. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enz. Microbial Technol.* 43, 391–395.

Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H.V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A., Singh, S., 2009. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* (disponível on line: <http://www.sciencedirect.com>).

Lloyd, T.A., Wyman, C.E., 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour. Technol.* 96, 1967-1977.

Martín, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B., Jönsson, L.J., 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microbiol Technol.* 31, 274- 282.

Martin, C., Marcet, M., Almazán, O., Jönsson, L.J., 2006. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* (disponível on line: <http://www.sciencedirect.com>).

Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Río, J.C., Gutiérrez, A., 2002. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 348-357.

Mastihuba, V., Kremnický, L., Mastihubová, M., Willett, J.L., Côté, G.L., 2002. A spectrophotometric assay for feruloil esterases. *Anal. Biochem.* 309, 96-101.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

Moretti, M.M.S., Bocchini-Martins, D.A., Da Silva, R., Bonugli-Santos, R.C., Rodrigues, A., Sette, L.D., Gomes, E., Selection of thermophilic and thermotolerant fungi and production of cellulases and xylanase by solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol.*(submitted).

Panagiotou, G., Olavarria, R., Olsson, L., 2007. *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *J. Biotechnol.* 130, 219-228.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process. Biochem.* 35, 1153-1169.

Philippidis, G.P., Smith, T.K., Wyman, C.E., 1993. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioengin.*, 41, 846-853.

Singhania, R.R., Sukumaram, R.K., Pandey, A., 2007. Improve cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 under SSF through process optimization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142, 60-70.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. enzymol.* 299, 152-178.

Shin, H.D., Chen, R.R., 2006. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enz. Microbial Technol.* 38, 478-485.

Somogy, N., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19.

Sun, F., Chen, H., 2008a. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99, 6156-6161.

Sun, F., Chen, H. 2008b. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.*, v. 99, 5474-5479.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1-11.

Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C., Su, Y.Q., 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carboh. Polym.* 56, 195-204.

Teixeira, L.C., Linden, J.C., Schroeder, H.A., 1999. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol fuel. *Ren. Energ.* 16, 1070-1073.

Tien, M., Kirk, K.T., 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth. Enzymol.* 161, 238-249.

Vries, R.P., Visser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 497-522.

Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2009. Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresour. Technol.*, 100, 5917-5921.

Yan, Q.J., Wang, L., Jiang, Z.Q., Yang, S.Q., Zhu, H.F., Li, L.T. A Xylose-tolerant b-xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. *Bioresour. Technol.*, 99, 5402-5410.

Zanoelo, F.F., Polizeli, M.L.T.M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., 2004. Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 137-143.

