

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA
PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE**

Ilha Solteira – SP

2016

WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA
PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
do Campus de Ilha Solteira - UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Agronomia. Especialidade:
Sistemas de Produção

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Orientadora

Ilha Solteira – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S237i Santos, Wanderléia Rodrigues.
Isolamento de fungos do bioma pantanal e estudos da produção de xilanase e celulase / Wanderléia Rodrigues Santos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
133 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2016

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Inclui bibliografia

1. Xilanase. 2. Endoglucanase. 3. Fermentação sólida. 4. Resíduos lignocelulósicos.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Isolamento de fungos do Bioma Pantanal e estudo da produção de xilanase e celulase

AUTORA: WANDERLÉIA RODRIGUES DOS SANTOS

ORIENTADORA: HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sôcio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



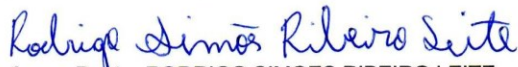
Profa. Dra. ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. ROSEMEIRE DA SILVA FILARDI

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Professor Doutor RODRIGO SIMOES RIBEIRO LEITE

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS



Profa. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI MARTINS

Departamento de Bioquímica / Instituto de Química de Araraquara

Ilha Solteira, 29 de agosto de 2016

Dedico

Aos meus queridos avós,
Otacílio Pereira dos Santos (*in memoriam*) e Marisete Rodrigues dos Santos,
pelo amor, carinho, compreensão, pelo imensurável apoio e confiança depositados
em todos esses anos de estudos e dedicação para alcançar os meus objetivos.

Ofereço

A minha mãezinha linda Antônia de Fátima R. dos S. Dias,
A minha Tata querida Léia Carla R. dos S. Larson,
E aos meus ídolos Adão Bento Gregório e
Maria José Rodrigues dos Santos Gregório
Que Me deram força para concretizar este trabalho,
Amo vocês.

“Sou filha orgulhosa do avô mais inteligente que existe...

Meu avô foi roceiro, plantava café, feijão, arroz, mandioca, batata, verduras e muito mais. As vezes achava que ele era Agrônomo ou algo parecido.

Depois foi açougueiro, fazia linguiça, charque e um saboroso salame. Depois charreteiro e por último guarda noturno.

Veio de Minas e conheceu aqui no estado, a mulher mais inteligente e sensata que conheço.

Eles, depois de criarem 6 filhos, ainda criou eu e minha irmã, e ajudou mais 3 netos.

Eles me deram além de casa e comida, a educação que a escola não é passível a dar a qualquer ser humano.

O momento que mais me marcou, foi quando me levava, logo tão cedo, de bicicleta no ponto de ônibus, para onde eu seguia para escola agrícola de turno integral.

Mesmo ele fazendo todo ano minha matrícula, apenas quando entrei na faculdade, que descobri que ele não sabia ler e nem escrever....

Mas isso não cabia em minha mente... Como? Ele fazia tudo e sabia muito mais que eu...

Até eu perceber, que o que ele havia me ensinado, era muito mais que eu havia aprendido na frente de quadro negro da escola.

Que nem a UEMS, UNESP ou USP ou qualquer outra melhor universidade do mundo poderia me ensinar.

Por causa dele, hoje eu sou mestre em Agronomia, e quase uma doutora na vida!”

Obrigada Vozão!

Otacílio Pereira dos Santos

In memorian

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças Deus não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Agradecimentos

A Deus, todo poderoso, pela saúde, graça, força, coragem, minhas alegrias e a certeza da vitória.

A professora Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela maravilhosa orientação e dedicação, assim como, pela paciência, incentivo, compreensão e confiança que teve comigo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade da realização deste curso de doutorado.

Aos professores da Graduação e Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica.

A pesquisadora Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, agradeço pela co-orientação na fase inicial deste trabalho.

A pesquisadora Dr^a. Glacia Amorim Faria, pela realização das estatísticas que muito contribuiu neste trabalho.

Aos professores componentes da banca examinadora desse trabalho, pelas sugestões e por atenderem prontamente ao nosso convite à banca.

A todos do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Semente e Sócio-Economia desta unidade, agradeço pelo apoio.

A Agropecuária Santana do Deserto, pela oportunidade e apoio nas coletas de solo.

Aos funcionários “Zé Hernandez”, Mirian e Alvino, pelo apoio técnico e prático durante a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Sirlene Senna, Aline Reis, Lumena Besson, Cíntia, Érica, Fábio, Islaine pela amizade e contribuição durante o doutorado.

Aos colegas da pós-graduação Simone Hiraki, Barbara, Cecília, Priscila, Tiago, pela amizade durante o doutorado.

Ao meu querido Tiago Pasquetti pelo carinho, amor, compreensão, pela sua companhia nos momentos mais difíceis e de grandes alegrias.

As minhas amigas, Valquíria, Selma, Gabriela, que por mais que nos afastamos, sabemos que somos as mesmas.

Aos amigos “Chiquinho”, Arthur, Sr. Maurício (*in memorian*), pela atenção mesmo quando eu estava ausente.

Aos amigos que encontrei em Ilha Solteira, a Sr^a. Maria de Lourdes, Eloiza, Luciana, Luciano e toda sua família que me acolheu.

Aos meus anjos Gaby, Izabela, Anna, Phablo, Maria Eduarda, João Lúcio, Yanni, Eduardo, Maria Valentina, Ruan, Luan, Jheniffer e Victor.

Aos meus irmãos Léia Carla, Vivian Mayara, Aline Muriel, Adalto Junior e Gabriela, pelas palavras de incentivo.

Aos cunhados Luciano Larson, Erik Pronti, e James e Aline Perinelli por estarem sempre na torcida.

A minha família que é o pilar de minha vida e sem o qual a mesma não teria sentido.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira – SP, pela oportunidade na realização do curso de doutorado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e me apoiaram, tornando possível a realização deste trabalho.

MEU SINCERO AGRADECIMENTO!!!

ISOLAMENTO DE FUNGOS DO BIOMA PANTANAL E ESTUDOS DA PRODUÇÃO DE XILANASE E CELULASE

RESUMO

Diante do recente interesse em valorizar os fungos degradadores da biomassa lignocelulósica oriunda das atividades agrícolas, agroindustriais e de florestas plantadas, torna-se necessário a prospecção de novos micro-organismos e a partir destes estudar seu potencial, bem como fatores que afetam o seu desenvolvimento, a produção de enzimas, e o rendimento como um todo. Após uma breve introdução e revisão de literatura, tem-se o **Capítulo I** expondo parte do projeto, onde o objetivo de estudo foi isolar e selecionar fungos da região do Pantanal Sul-mato-grossense, e testar sua eficiência na produção das enzimas xilanase, carboximetilcelulase (CMCase) e avicelase tendo 1% de palha de milho e papelão como substratos indutores no meio líquido de isolamento testados na temperatura de 35 e 45 °C. Neste processo, um total de 111 fungos foram obtidos, onde 80,7% dos isolados em meio contendo palha de milho, cresceram a temperatura de 35 °C e os isolados induzidos meio contendo papelão, 63,0% se manifestaram a 45 °C. O isolado WPPM 922 obteve as maiores atividades enzimáticas com 614,5 U g⁻¹, e 107,3 U g⁻¹ e 5,37 U g⁻¹ para atividade de xilanase, CMCase e avicelase respectivamente, fermentado em farelo de trigo em 96 h a 35 °C. Oito isolados e o *Trichoderma asperelloides* F22, foram selecionados para avaliação do seu potencial na produção enzimática utilizando 6 tipos de resíduos agrícolas e agroindustriais. A casca de arroz foi o substrato que mais induziu as enzimas xilanase e CMCase pelos isolados testados. A maior produção de xilanase foi obtida pelo isolado WPPM 421A com 931,95 U g⁻¹ em casca de arroz e por *T. asperelloides* F22 cerca de 876,48 U g⁻¹ tendo o farelo de trigo como substrato. O isolado WPPM 622 apresentou a maior atividade da enzima CMCase, com atividade de 155,73 U g⁻¹ na mistura bagaço de cana-de-açúcar, seguido pelo isolado WPPM 151 e o fungo *T. asperelloides* F22, com atividade de 60,52 U g⁻¹ e 57,29 U g⁻¹ respectivamente, fermentados em casca de arroz. No **Capítulo II**, descreve-se a importância das condições bioquímicas das enzimas xilanase e CMCase produzidas pelos isolados WPPM 421A e WPPM 622, e por *T. asperelloides* F22 quanto a temperatura e pH ótimos e estabilidade e a meia vida. O *Trichoderma asperelloides* F22 obteve seu pico de produção de xilanase em 72 h (606,23 U g⁻¹), e o isolado WPPM 421A que obteve pico de produção de xilanase e CMCase em 96 h (547,27 U g⁻¹ e 55,53 U g⁻¹, respectivamente). O pH ótimo e

estabilidade foi diferente para os isolados avaliados, no entanto, o isolado WPPM 421A, cultivado em farelo de trigo, demonstrou pH ótimo de 5,5, mas manteve sua atividade acima de 50% na faixa de pH 5-11. Quanto a termoestabilidade, o isolado WPPM 421A quando cultivado em sabugo de milho produziu xilanase mais termoestável, mantendo 67,4% da atividade a 90 °C. Essa xilanase conservou 60% de sua atividade após 12h de incubação a 60 °C, e manteve 50% de sua atividade após incubada 1h a 70 °C. As propriedades estudadas colocam estas enzimas como promissoras para aplicações biotecnológicas.

Palavras chaves: Xilanase. Endoglucanase. Fermentação sólida. Resíduos lignocelulósicos.

ISOLATION OF FUNGI OF WETLAND BIOMA AND PRODUCTION STUDIES XYLANASE AND CELLULASE

ABSTRACT

Before the recent interest in valuing the degrading fungi lignocellulosic biomass derived from agricultural, agroindustrial and planted forests, it is necessary to prospect for new microorganisms and from these study their potential as well as factors affecting their development the production of enzymes, and performance as a whole. After a brief introduction and review of the literature, there is Chapter I exposing part of the project, where the objective of the study was to isolate and select fungi from the Sul-mato-grossese Pantanal region, and test their efficiency in the production of xylanase enzymes, carboxymethylcellulase (CMCase) and avicelase having 1% corn straw and cardboard as an inducer substrate in the liquid isolation medium tested at 35 and 45 °C. In this process, a total of 111 fungi were obtained where 80.7% of the isolates were grown in medium with corn stover at 35 °C and induced in medium containing isolated cardboard, they are expressed in greater numbers at 45 °C, about 63.0%. Isolated WPPM 922 had the highest enzymatic activities 614.5 U g⁻¹, and 107.3 U g⁻¹ and 5.37 U g⁻¹ xylanase, CMCase and avicelase respectively, fermented wheat bran at 96 h at 35 °C. Also in this chapter, eight isolates and the *Trichoderma asperelloides* F22, were tested for their potential to hydrolyze 6 types of agricultural and agro-industrial waste. Rice husk was the substrate that more induced the xylanase enzymes and CMCase the isolates tested. The highest xylanase production was obtained with the isolated WPPM 421A activity 931.95 U g⁻¹ in rice husk, and *T. asperelloides* F22 with 876.48 U g⁻¹ with wheat bran as substrate. The isolate WPPM 622 was the fungus that showed the highest activity of CMCase enzyme with activity 155.73 U g⁻¹ in the mixture of sugar cane bagasse and wheat bran, followed by isolated WPPM 151 and the *T. asperelloides* F22 with activity 60.52 U g⁻¹ and 57.29 U g⁻¹ respectively, fermented rice husk. In Chapter II, reports the importance of the minimum conditions for the fungi to express their potential to secrete degradative enzymes of cell wall, it aimed to with this process to obtain a kinetic production of xylanase enzymes and CMCase by isolated WPPM 421A and WPPM 622, and *T. asperelloides* F22 and after characterize the xylanase of these materials with the optimum temperature and pH, thermal and pH stability and half life of the enzyme. *Trichoderma asperelloides* F22 obtained its peak xylanase production at 72 h (606.23 U g⁻¹) and isolated WPPM 421A that obtained peak xylanase production and CMCase at 96 h

(547.27 U g⁻¹ and 55.53 U g⁻¹, respectively). There was a difference in optimum pH and stability of the tested isolates, however, isolated WPPM 421A, cultivated in wheat bran showed optimum pH of 5.5, but maintained its activity above 50% in the pH 5-11 range. The thermostability, isolated WPPM 421A when grown on corn cobs produced more thermostable xylanase activity keeping in 67.4% when the reaction occurred at 90 °C, and also retained its activity by 60%, 12 h incubation at 60 °C, and retained 50% of its activity after incubated 1h at 70 °C. The properties studied enzymes make them promising for biotechnological applications. The region of Sul-mato-grossense has shown promise for the study of fungal microbiota for the production of enzymes, where 99% demonstrated ability to express cellulases and hemicellulases, with activity up to 900 U g⁻¹.

Key words: Xylanase. Endoglucanase. Solid fermentation.. Lignocellulosic waste

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos resíduos e subprodutos agrícolas utilizados para produção de enzimas microbianas.....	27
Tabela I.1. Georreferenciamento dos locais amostrados no bioma Pantanal de Miranda-MS e Aquidauana-MS.....	61
Tabela I.2. Composição da solução de micronutrientes utilizada na fermentação sólida com farelo de trigo por linhagens isoladas na Região do Pantanal Sul-mato-grossense.....	63
Tabela I.3. Composição da solução de tampão acetato a 0,2 mol L ⁻¹ utilizada para determinação do açúcar redutor total.....	64
Tabela I.4. Composição dos reagentes para a solução de Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) utilizada para determinação do açúcar redutor.....	64
Tabela I.5. Composição das soluções utilizadas no método Hartree-Lowry para determinação do teor de proteína total.....	66
Tabela I.6. Origem e dimensões dos substratos utilizados no processo de fermentação para cultivo dos isolados fúngicos.....	66
Tabela I.7. Local de coleta temperatura de cultivo e isolados fúngicos selecionados a partir do solo da região do Pantanal Sul-mato-grossense.....	69
Tabela I.8. Atividades xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas por linhagens isoladas em áreas do Pantanal Sul-mato-grossense, tendo a palha de milho como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.....	73
Tabela I.9. Atividades xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas isolados da áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, tendo papelão triturado como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.....	74
Tabela I.10. Comparação de dados da literatura, sobre as produções de xilanase e carboximetilcelulase, obtidas por fungos cultivados em farelo de trigo sob fermentação em estado sólido.....	78
Tabela I.11. Atividade xilanase, teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicas cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.....	81
Tabela I.12. Atividade carboximetilcelulase (CMCCase), teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicas cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.....	87

Tabela II.1. Relação dos isolados da região do Pantanal, selecionadas para análise do perfil de produção enzimática, e da atividade de xilanase e CMCase obtida na fase de teste com diferentes substratos.....	105
Tabela II.2. Perfil de produção dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22 em fermentação em estado sólido a 35°C.....	112
Tabela II.3. Perfil de produção de carboximetilcelulase (CMCase) dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22 em FES a 35 °C nos substratos farelo de trigo, sabugo de milho e a mistura sabugo de milho de farelo de trigo.....	114
Tabela II.4. Perfil de produção dos isolados da região do Pantanal, selecionadas para análise do perfil de produção enzimática.....	115
Tabela II.5. pH ótimo para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e por <i>Trichoderma asperelloides</i> F22.....	116
Tabela II.6. Temperatura ótima para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A e WPPM 622 e por <i>Trichoderma asperelloides</i> F22.....	123
Tabela II.7. Atividade residual da enzima xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, e WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22, após 60 minutos de incubação em diferentes temperaturas, para determinação da temperatura de estabilidade.....	123
Tabela II.8. Meia vida da enzima xilanase (%), produzidas pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e <i>Trichoderma asperelloides</i> F22, em FES incubada a 60 °C.....	125
Tabela II.9. Caracterização das xilanases produzidas pelos isoados selecionados.....	126

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Sistema deposicional da bacia do Pantanal	20
Figura 2	Diversidade fitogeográfica do pantanal	21
Figura 3	Aumento do número de espécies registradas nos domínios fitogeográfico brasileiras 2010-2015	23
Figura 4	Bioma Pantanal. (a) Mapa de fragilidade; (b) Mapa de potencial agrícola estimado pelo IBGE em 2011	24
Figura 5	Bioma Pantanal. (a) Mapa de uso e cobertura da terra; (b) Modelo de ocupação e uso para o Bioma Pantanal estimado a partir das unidades morfométricas, geologia e solos	24
Figura 6	Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica	26
Figura 7	Seções longitudinal e transversal de um grão trigo	30
Figura 8	Açúcar que compõe a unidade de celulose.	32
Figura 9	Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses	33
Figura 10	Estrutura da lignina	34
Figura 11	Principais tipos de ligações entre unidades fenil-propanóides presentes na molécula de lignina.	35
Figura 12	Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina	35
Figura 13	Mecanismo de ação das celulases.	37
Figura 14	Estrutura do xilano, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas	38
Figura I.1	Foto da região da fazenda Caimam, no município de Miranda-MS, onde 10 amostras de solos foram coletadas para isolamento de fungos	60
Figura I.2	Tubos de ensaio contendo 0,5 g de solo em meio nutriente líquido contendo papelão triturado (< 2mm Ø) usado para indução e isolamento de culturas fúngicas.	62
Figura I.3	Monte de bagaço de cana-de-açúcar no pátio da Usina de açúcar e álcool Santa Adélia (à esquerda) e o bagaço lavado e seco em estufa (à direita).	67
Figura I.4	Fases do processo de extração do extrato enzimático produzido por isolados. Maceração, centrifugação e armazenamento em tubos de	68

vidro

- Figura I.5** Relação de isolados obtidos das amostras de solo da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando meio nutriente de isolamento o papelão triturado e palha de milho como substrato indutor de crescimento, nas temperaturas de 35 e 45 °C, por 96 horas. 72
- Figura I.6** Atividades médias geral para xilanase (XIL), CMCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) das soluções enzimáticas produzidas por isolados em áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, usando palha de milho papelão no 'screening'. Fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, à 35 °C e 45 °C, por 96 horas. 76
- Figura II.1** Fase de preparo da fermentação sólida em Erlenmeyer contendo substratos como fonte de carbono. 106
- Figura II.2** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo farelo de trigo (FT) e mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 118
- Figura II.3** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo a mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) e sabugo e milho como substrato, e o isolado WPPM 622 (FT), após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 119
- Figura II.4** Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 622, e *Trichoderma asperelloides* F22 em FES tendo farelo de trigo (FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente. 120
- Figura II.5** Atividade residual da xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22, incubadas em pH 3 a 11 por 24 horas em temperatura ambiente. 121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ART	Açúcar redutor total
ANOVA	Análise de Variância
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Batata dextrose ágar
BG	β -glucosidades (BG)
CBH	Celobiohidrolases
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Endoglucanase que hidrolisa carboximetilcelulose
cm	Centímetro
EC	Exoglucanases
EG	Endoglucanases
et al.	Termo latim “e colaboradores”
FPase	<i>Filter paper activities ou activity</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação submersa
FT	Farelo de Trigo
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por litro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
2G	Segunda geração (Álcool)
h	Hora/horas
mL	mililitro
mL mg ⁻¹ cm ⁻¹	Mililitro por miligrama por centímetro
mmol L ⁻¹	Milimol por litro
mol L ⁻¹	Mol por litro
nm	Nanômetros
DNS	Ácido dinitrossalicílico
Caz	Casca de arroz
PM	Palha de milho
PMf	Palha de milho fina
SM	Sabugo de milho
SMf	Sabugo de milho fino
U	Unidade de atividade enzimática (1 U é a quantidade de enzima que catalisa 1 μ mol de produto por minuto)
U mL ⁻¹	Unidade enzimática por mililitro de solução
U g ⁻¹	Unidade enzimática por grama de substrato
R ²	Coefficiente de Determinação
μ L	Microlitro
μ mol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Características do Écotono Cerrado-Pantanal	20
2.2	Biomassa lignocelulósica	25
2.2.1	<i>Produtos e subprodutos do bagaço de cana-de-açúcar</i>	27
2.2.2	<i>Produtos e subprodutos do Milho</i>	28
2.2.3	<i>Produtos e subprodutos do Trigo</i>	29
2.2.4	<i>Produtos e subprodutos do Arroz</i>	31
2.3	Componentes da parede celular vegetal	32
2.4	Enzimas degradadoras da parede celular vegetal	36
2.5	Micro-organismos produtores de enzimas e processos fermentativo	39
	REFERENCIAS	42
	CAPITULO I: RESÍDUOS AGRICOLAS E AGROINDUSTRIAIS NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE	53
1	INTRODUÇÃO	57
2	OBJETIVOS	60
3	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1	Local de coleta das amostras	60
3.2	Isolamento e manutenção de linhagens	61
3.3	Preparo dos reagentes	62
3.3.1	<i>Solução estoque de micronutrientes</i>	63
3.3.2	<i>Solução nutriente</i>	63
3.3.3	<i>Tampão Acetato</i>	64
3.3.4	<i>Solução de Ácido 3,5-dinitrossalicílico - DNS</i>	64
3.3.5	<i>Solução de carboximetilcelulose</i>	65
3.3.6	<i>Solução de avicel e xilana</i>	65
3.3.7	<i>Soluções para determinação de proteína total</i>	65
3.3.8	<i>Preparo dos substratos agrícolas e agroindustrias</i>	66
3.4	Fermentação em estado sólido	67
3.5	Efeito da fonte de carbono	68
3.6	Determinação de açúcar redutor total - ART	69
3.6.1	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	69
3.7	Determinação do teor de proteína total	70
3.7.1	<i>Determinação de atividade específica</i>	71
3.8	Análise dos dados	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Avaliação do substrato indutor	71
4.2	Atividade enzimática dos isolados	76
4.3	Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase	79
4.4	Efeito da fonte de carbono na produção de CMCase	85
5	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	92
	CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS	101

**PRODUZIDAS POR ISOLADOS FUNGICOS DO BIOMA
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E POR *Trichoderma
asperelloides* F22**

1	INTRODUÇÃO	103
2	OBJETIVOS	105
3	MATERIAL E MÉTODOS	105
3.1	Perfil de Produção	105
3.1.1	<i>Curva de calibração</i>	107
3.1.2	<i>Engoglucanase e Hemicelulase</i>	107
3.1.3	<i>Determinação de Proteína</i>	108
3.2	Caracterização bioquímica da Xilanase	108
3.2.1	<i>Efeito do pH e estabilidade das enzimas</i>	108
3.2.2	<i>Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas</i>	109
3.2.3	<i>Meia vida da enzima</i>	109
3.2	Análise estatística	110
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.1	Perfil de produção	110
4.1.1	<i>Perfil de Produção da Xilanase</i>	110
4.1.2	<i>Perfil de Produção da CMCase</i>	113
4.2	Efeito do pH e estabilidade da xilanase	116
4.3	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas	121
4.4	Meia vida da enzima xilanase	124
5	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS	128
	CONCLUSÕES GERAIS	133

1 INTRODUÇÃO

Considerado um ecossistema único no mundo, o Pantanal brasileiro apresenta uma biodiversidade pouco explorada (ALHO; GONÇALVES 2005; ALHO, 2008; ASSINE et al., 2015). Com características marcantes, o Pantanal é conhecido como uma zona úmida, com suscetibilidade a inundações periódicas, que exibem intensidade e duração alternadas, e obedecem a um ciclo que é responsável pelo equilíbrio do sistema ecológico de toda a região (JUNK et al., 2006; ALHO, 2008; MERCANTE et al., 2011).

A integridade da biodiversidade do bioma Pantanal pode estar ameaçada com as atividades que impulsionam a economia do país, como a agricultura, pecuária, expansão urbana e turismo que estão ligadas ao desenvolvimento socioeconômico. Valorizar e proteger a sua biodiversidade é um dos desafios traçados de conscientização, que caminham ao mesmo tempo em que avança a destruição dos recursos naturais. Estes são considerados como tesouros de valor ainda desconhecido, visto que podem conter princípios ativos fonte de novos medicamentos, produtos químicos com potencial industrial, alimentícios e, ainda, outros usos que podem ser esclarecidos e descobertos por meio de pesquisa científica (DURIGAN et al., 2011; MERCANTE et al., 2011).

A diversidade fitogeográfica pantaneira é peculiar devido a convergência de quatro grandes províncias da América do Sul: Amazônica, Cerrado, Florestas Meridionais e Chaquenha (PRANCE; SCHALLER, 1982; AB'SABER, 1988; ALHO; GONÇALVES, 2005). Nele encontra-se uma região de planície alagada, pouco explorado quanto a comunidade microbiana do solo (MAIA et al., 2015), onde tem-se uma boa expectativa quanto a sua diversidade e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas.

Alguns micro-organismos são responsáveis por conduzir a ciclagem de nutriente, devido sua habilidade de produzir um complexo de enzimas altamente específicas capazes de degradar a parede celular da biomassa lignocelulósica (LOPES et al., 2013). Vários estudos têm se direcionado à prospecção de micro-organismos, que produzem um complexo enzimático capaz de hidrolisar materiais lignocelulósicos. Os fungos filamentosos são potenciais produtores enzimas a partir de substratos orgânicos, as quais são secretadas extracelularmente. A secreção extracelular de enzimas reduz custos nos sistemas de produção como a dispensar etapas de rompimento celular que pode ocorrer em fungos leveduriformes e bactérias (PANDEY et al., 2000; COUTO; SANROMÁN, 2006; JIANG et al., 2011). Entretanto, é necessária a identificação de micro-organismos isolados para este fim, assim

como a otimização das condições de cultivo para obter enzimas eficientes, e da mesma forma facilitar o processo de purificação de cada enzima. Dentre as características enzimáticas interessantes à serem analisadas estão a funcionalidade, estabilidade, características bioquímicas, assim como as condições reacionais em diferentes faixas de pH e de temperatura, com a finalidade de a partir destes parâmetros, inferir as reais potencialidades de sua aplicação biotecnológica (POLIZELLI et al., 2005).

Um dos motivos no uso de enzimas em processos industriais está a especificidade da mesma e redução do custo final do processo. Há também aumento da qualidade do produto com a utilização de processos limpos que reduzem os impactos ambientais. As enzimas microbianas são utilizadas por décadas em várias aplicações industriais resultando no aumento da demanda e, principalmente, na busca de enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas. O Brasil, no período de 2003 a 2005, houve 334 empresas que importaram enzimas ou produtos que possuem compostos enzimáticos, e 114 empresas às exportam (COUTO; SANROMÁN, 2006; MONTEIRO; SILVA, 2009; MAYRINK, 2010; POLITZER; BON, 2016).

A biomassa lignocelulósica possui uma resistência ao ataque químico ou bioquímico devido a sua composição físico-químico complexa, dificultando, assim, sua conversão em materiais com alto valor agregado. A biomassa lignocelulósica possui uma composição com proporção que varia de acordo com a espécie, clima e condução da cultura, apresentando uma composição média de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (KUHAD et al., 2011; DEUTSCHMAN; DEKKER, 2012).

As celulasas e hemicelulasas são enzimas aplicadas em processos biotecnológicos de diversas indústrias (COUTO; SANROMÁN, 2006). As xilanases são hemicelulasas responsáveis por hidrolisar a cadeia de xilana contida na parede celular vegetal, e são aplicadas principalmente na conversão de matérias lignocelulósicas em produtos químicos e combustíveis, no branqueamento do papel e celulose, nas indústrias têxteis, de alimentos e ração animal, etc. (POLIZELLI et al. 2005). As celulasas catalisam as reações de hidrólise da celulose contida na biomassa em glicose e outros açúcares, podendo ser convertida em produtos com valor agregado e energia, entre outros usos na preparação de alimentos e sucos, produtos dermatológicos e rações animais, etc. (PANDEY, 2005; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

O cultivo de fungos filamentosos se dá geralmente sob a técnica de fermentação em estado sólido, que consiste na utilização de meio de cultura composto por substratos sólidos, atuando como fonte de carbono. Esta técnica é vista como uma alternativa de baixo custo para

a produção de enzimas, quando utiliza-se no processo resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais como fonte de carbono. Os substratos selecionados para o processo fermentativo devem conter carboidratos que induzam a produção das enzimas de interesse, a exemplo de xilanases, celulasas (PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; DIAS et al., 2012a).

Diante do exposto, a seleção e o isolamento de fungos filamentosos do solo do bioma Pantanal, com potencial em degradar a biomassa lignocelulósica, e o estudo da produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas utilizando substratos agrícolas e agroindústrias foram a base desse estudo.

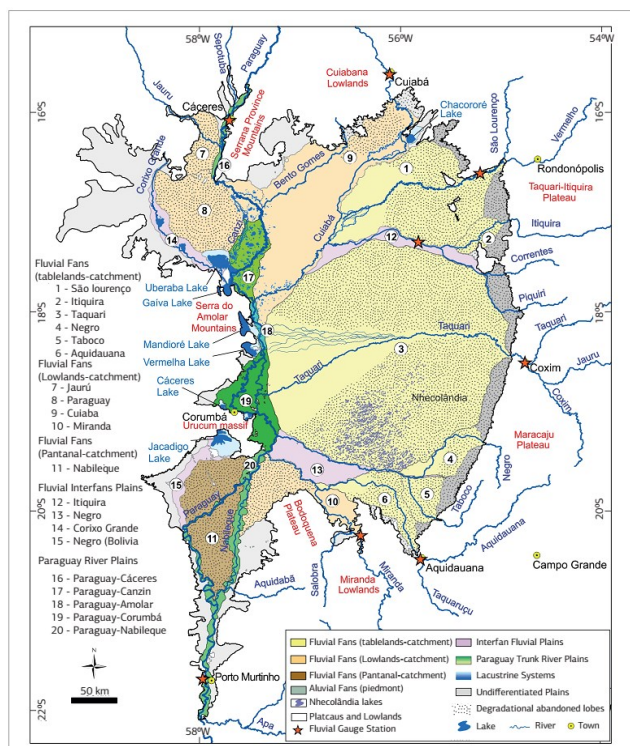
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Écotono Cerrado-Pantanal

O Pantanal, visto como um ecossistema único no mundo suporta uma biodiversidade pouco explorada (ALHO; GONÇALVES 2005; ALHO, 2008). É caracterizado como uma zona úmida, suscetível a inundações periódicas, os quais apresentam intensidade e duração alternada. São responsáveis pelo equilíbrio do sistema ecológico de toda a região, ou seja, pelas interações e padrões de diversidade biológica (ALHO, 2008; JUNK et al., 2006; JUNK; CUNHA, 2005; MERCANTE et al., 2011).

O Pantanal brasileiro possui a maior planície inundável do mundo, com mais de 110.000 km², reúne um mosaico de diferentes ambientes e abriga uma rica biota terrestre e aquática. Está localizado na região central da América do Sul, principalmente nas áreas dos Estados brasileiros do Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%), na Bolívia e no Paraguai (**Figura 1**) (RIBEIRO; DIAS, 2007), e aproximadamente 83% da área possui plana a baixa declividade (0 – 2,5%) e altitude entre 50 - 150 metros (**Figura 2**) (PEREIRA et al., 2010; ASSINE et al., 2015).

Figura 1: Sistema deposicional da bacia do Pantanal.

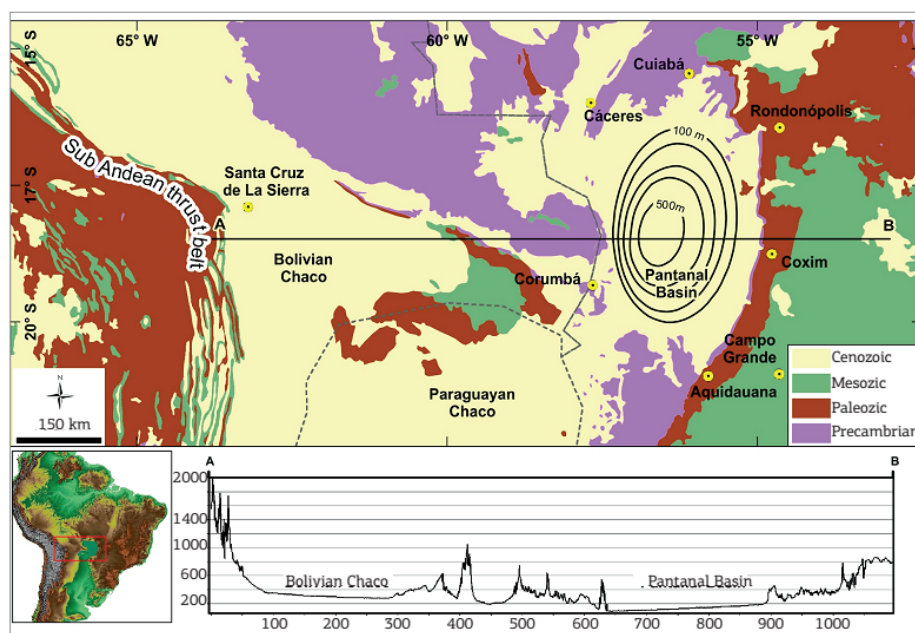


Fonte: Assine et al. (2015).

O desenvolvimento econômico e social desafia a integridade da biodiversidade do bioma Pantanal, que é impulsionada principalmente pela agricultura, pecuária expansão urbana e pelo turismo. Valorizar e proteger a sua biodiversidade é um dos desafios traçados de conscientização, que caminham ao mesmo tempo em que avança a destruição dos recursos naturais. Toda esta biodiversidade é considerada um tesouro de valor ainda desconhecido, visto que nesta pode conter princípios ativos como fonte de novos medicamentos, produtos químicos com potencial industrial e alimentícios, e ainda outros compostos que podem ser esclarecidos e descoberto através da pesquisa científica (DURIGAN et al., 2011; MERCANTE et al., 2011).

O bioma pantaneiro apresenta uma diversidade fitogeográfica peculiar devido à convergência de quatro grandes províncias da América do Sul: Amazônica, Cerrado, Florestas Meridionais e Chaquenha (**Figura 2**). Cerca de 70% da região pantaneira é ocupado pelo Bioma Cerrado, seguido pelo Bioma da Floresta Amazônica, encontrado principalmente no Pantanal do Paraguai, representando 21% da vegetação da área (ADAMOLI, 1982; SILVA et al., 2000; ASSINE et al., 2015).

Figura 2: Diversidade fitogeográfica do pantanal.



Fonte: Assine et al. (2015).

O Pantanal caracterizado por ser uma região de planície alagadas é um bioma pouco explorado quanto a comunidade microbiana do solo (BONONI et al., 2008; MAIA et al., 2015), e espera-se que exista uma diversidade com potencial biotecnológico para produção de enzimas (PRANCE; SCHALLER, 1982; AB'SABER, 1988; ALHO; GONÇALVES, 2005).

O clima é considerado tropical, com classificação AW, de Köppen (clima de savana), com médias de 23 a 25 °C e máximas e mínimas extremamente altas: de setembro a novembro, a máxima ultrapassa 40 °C; nos meses de maio, junho e julho, as médias ficam abaixo de 20 °C. O inverno pantaneiro é seco, de maio a setembro, e verão com 80% das chuvas concentradas entre novembro e março, com pluviosidade de 1.000 a 1.400 mm por ano (BONONI et al., 2008).

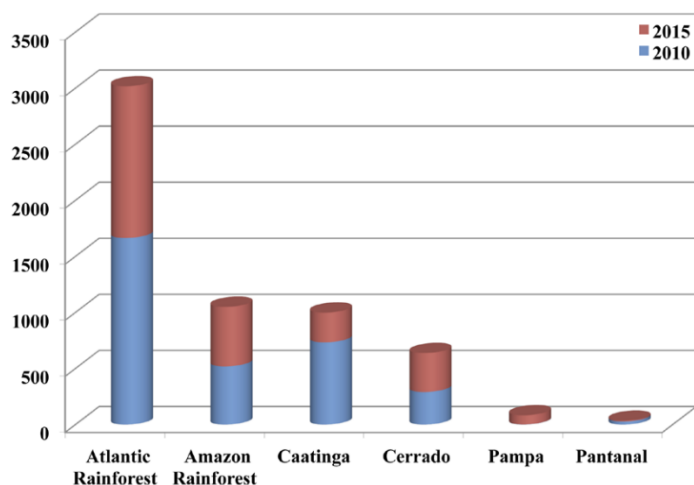
Estima-se que o Pantanal teve faunas bastantes diferenciadas ao longo de sua história geológica influenciada pela sua evolução natural e principalmente pelo clima. Alguns estudos relatam que a cerca de 18 mil anos atrás, o clima era mais frio e seco, 10 mil anos atrás, quente e úmido, e a 4 mil anos uma fase mais fria e seca, fazendo com que processos de extinção e recolonização ocorressem através de biomas vizinhos. O trecho do continente Sul-americano, que isolava a Amazônia e Paraguai do resto do continente, formava um mar raso, de água límpida e hipersalinas, onde se propiciou um cenário de fossilização, com presença de uma esteira esverdeada de cianobactérias (HAHN et al., 1982; KERBER et al., 2013).

No ano de 2015 houve um aumento gradual do número de espécies de fungos registrados até 2013 no país, que foi inserido no conjunto de dados encontrado na Lista Brasileira de Fungos *Lato Sensu*, passando de 3.608 em 2010 para 5.719 em 2015 (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010; MAIA et al., 2015). Toda esta diversidade microbiana é crucial para incremento dos recursos genéticos para avanço da Biotecnologia e da Biologia (BON et al., 2008). As espécies que mais predominam na lista atual de fungos são dos filos Basidiomycota (2.714 espécies) e Ascomycota (1.881 espécies), e possuem mais de 30 e 60 mil espécies registradas (KRIS et al., 2008; MAIA et al., 2015).

O Bioma Pantanal conta com a menor quantidade de espécies de fungos registrados, cerca de 40 espécies de fungos, seguindo pelo Pampa, atualmente com 84 espécies. O Cerrado conta atualmente com registro de 638 espécies, na qual o registro de 347 espécies ocorreu a partir 2010. O bioma mais pesquisado e conhecido é a Mata Atlântica, que aumentou de 1.353 espécies em 2010 para 3.017 em 2015. A floresta Amazônica passou de 531 espécies em 2010 para 1.050 espécies, superando o total de espécies registradas na Caatinga, que tem 999 espécies (**Figura 3**) (MAIA et al., 2015).

Mesmo observando um expressivo aumento do número de registro de espécies identificadas e sua ocorrência no país nos últimos 6 anos, ainda pode-se dizer que a diversidade ainda não reflete a totalidade real da capacidade existente no Brasil. Para que esta identificação ocorra, é necessário um empenho de taxonomistas e micologistas dispostos a mapear áreas ainda pouco estudadas (MAIA et al., 2015).

Figura 3. Aumento do número de espécies registradas nos domínios fitogeográficos brasileiros 2010-2015.

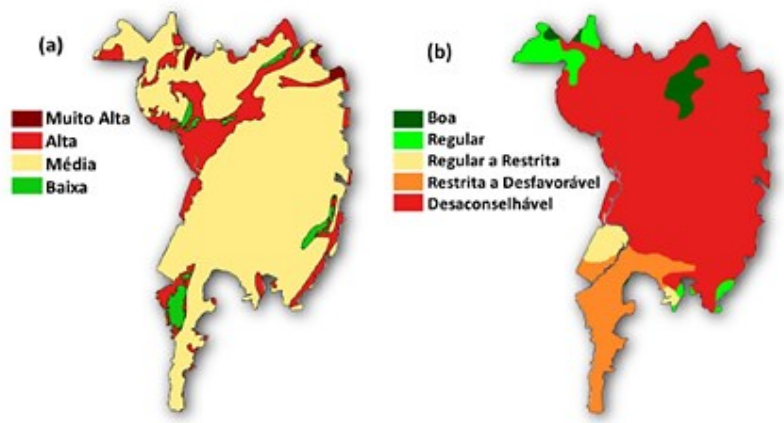


Fonte: MAIA et al. (2015).

Possíveis ameaças às dinâmicas de inundações periódicas, entrelaçada ao desenvolvimento econômico, evidenciam a fragilidade do ecossistema pantaneiro, e uma possível alteração e extinção à sua biodiversidade. A intensiva exploração da pesca e pecuária, acompanhados com desmatamento e alteração da paisagem natural, são os principais protagonistas desta ameaça (BAZZO et al., 2012; PEREIRA et al., 2012). De acordo com as potencialidades para usos agrícolas, o IBGE (2011) apresentou dados utilizando alguns fatores ambientais da região pantaneira como fertilidade, topografia, principais limitações e características físicas e morfológicas (**Figura 4**; PEREIRA et al., 2012).

Por meio do mapa do Bioma Pantanal, pode-se observar que cerca de 76% da área é desaconselhável para atividade agrícola, e tem como principal limitação a alta salinidade, os horizontes A e B do solo estreitos, a presença de pedregosidade ou rochosidade, e a textura arenosa, característica de solos planos e alagáveis. A porção do solo que apresenta aptidão agrícola, cerca de 12%, é caracterizada como restrita a desfavorável, devido ao excesso de sódio, e possuem inundações cíclicas e drenagem limitada. Dos 8% caracterizado como regular a restrita, possuem declive acentuado, pouca profundidade nos horizontes A e B, alto teor de alumínio e baixa disponibilidade de nutrientes. Apenas 4% do Bioma Pantanal possui alta fertilidade e condições físicas e morfológicas para cultivo e sem limitações, e está localizada na região Norte, e nas extremidades do Bioma (PEREIRA et al., 2012).

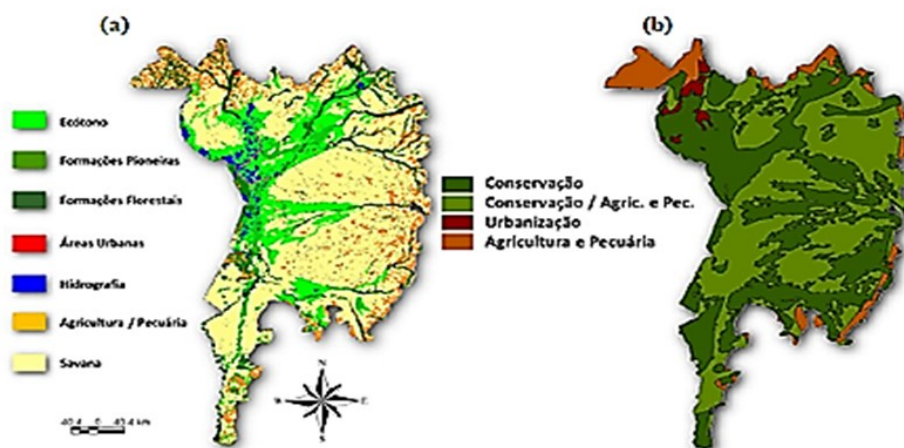
Figura 4. Bioma Pantanal. (a) Mapa de fragilidade; (b) Mapa de potencial agrícola estimado pelo IBGE em 2011.



Fonte: IBGE (2011).

De acordo com a EMBRAPA (2004), a região do Pantanal possui a Savana como a classe de maior ocorrência, cerca de 81.773 km², seguida da classe Ecótono, com 26.000 km² (Erro! Fonte de referência não encontrada.). Logo a classe Pecuária que corresponde a 16.922 km², seguida pela Savana estépica com 12.762 km². As classes de menor ocorrência na região são compostas por floresta estacional semi-decidual (6.453 km²), formações pioneiras (6.230 km²), hidrografia (2.620 km²), floresta estacional decidual (1.518 km²) e encrave (1.310 km²).

Figura 5. Bioma Pantanal. (a) Mapa de uso e cobertura da terra; (b) Modelo de ocupação e uso para o Bioma Pantanal estimado a partir das unidades morfométricas, geologia e solos.



Fonte: EMBRAPA (2004), PEREIRA et al., (2012).

Um modelo de ocupação proposto pela EMBRAPA (2004) segue exposto no mapa da **Figura 5**, com os patamares sugeridos para o uso e cobertura da terra, mostrando sua extensa área de vegetação nativa, e sua área urbana com 115 km², ou seja, aproximadamente 0,07% da área

total do bioma e, mesmo assim, entende-se que o avanço da agricultura nessa região requer criteriosas medidas para prevenir os impactos que podem advir no bioma, com estratégias de manejo mais flexíveis e definidas, uma vez que se trata de um sistema biológico complexo.

2.2 Biomassa lignocelulósica

Os resíduos compostos por materiais lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo, e esta biomassa apresenta potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteína, enzimas, compostos de aroma, entre outros (LEATHERS, 2003; BADHAN et al., 2007).

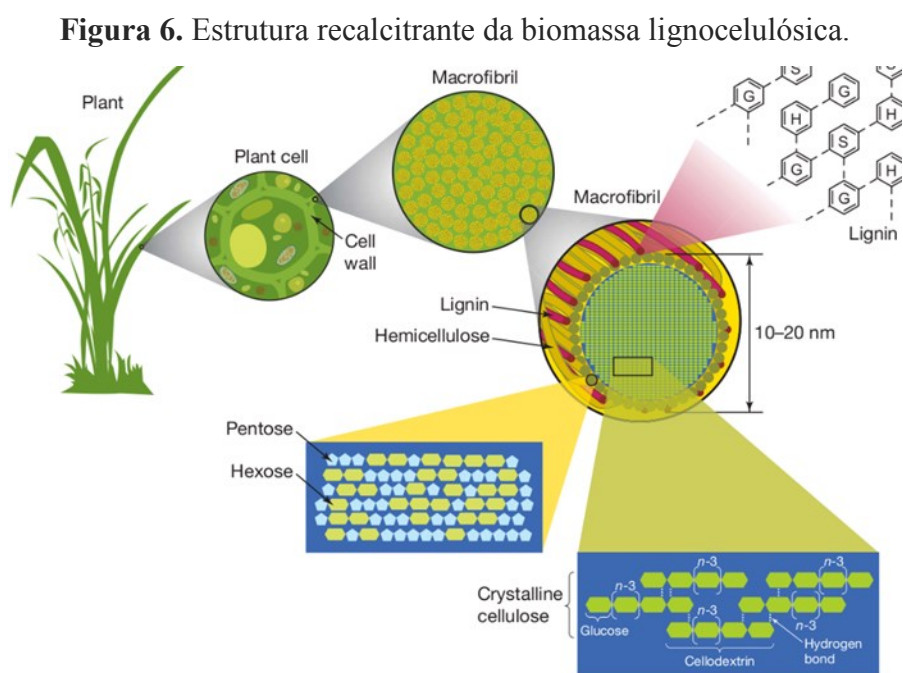
Na maioria das atividades agrícolas ocorre geração de resíduos ou subprodutos, que são conhecidos como materiais lignocelulósicos, que muitas vezes são subutilizados ou descartados de forma insustentável no meio ambiente. De acordo com Vale e Gentil (2008), o resíduo pode ser definido como qualquer material descartado das atividades relativas a um processo de produção, sendo um risco em potencial para o ambiente e, por conseguinte, para a sociedade. Em contraste, os resíduos podem deixar de ser uma ameaça para se tornarem geradores de produto de valor agregado quando estes são transformados em matérias-primas para outros processos, reduzindo tanto o preço como a demanda para o produto principal.

Os resíduos ou subprodutos agrícolas são utilizados após a colheita como cobertura do solo na forma de palhada, como adubo para a próxima safra, na formulação de ração animal ou mesmo são usados na geração de energia. O uso de biomassa como fontes de energias alternativas tem muitas vantagens, entre elas destaca-se: contribuição para a redução da emissão de CO₂; novas oportunidades de empregos e desenvolvimento das comunidades rurais; disponibilidade de diversos tipos de biomassa; biodegradabilidade e contribuição para a sustentabilidade (FREITAS, 2011).

Um dos destinos para os produtos de origem vegetal está na utilização de micro-organismos ou enzimas capazes de degradar totalmente ou parcialmente estes materiais. Sendo uma alternativa viável e ambientalmente sustentável que pode agregar valor aos produtos e subprodutos e beneficiar muitos setores das cadeias produtivas envolvidas, como os aqueles responsáveis pela produção de biocombustíveis, produtos para alimentação animal e entre outros produtos de interesse agroindustrial.

A biomassa vegetal tem como composição média 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Nas árvores, em média, a lignocelulose consiste de 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina. A quantidade de cada um dos polímeros

varia com a espécie, clima e a idade da planta, bem como entre as partes de uma planta e condução da cultura onde podemos visualizar na **Tabela 1**, esta variação. Composta por uma classe heterogênea de polissacarídeos não celulósicos (**Figura 6**), a hemicelulose pode conter pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ou ácidos urônicos (ácidos α -D-glucurônico, α -D-4-O-metil-galacturônico e α -D-galacturônico). As hemiceluloses possuem como principais constituintes o xilana, manana, galactana e arabinana, que são polissacarídeos responsáveis por sua classificação (GLAZER; NIKAIDO, 1995; SILVA, 2010; KUHAD et al., 2011; DEUTSCHMAN; DEKKER, 2012).



Fonte: Santos et al. (2012).

Estes componentes da parede celular das plantas representam mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal, e se organizam formando uma malha de polímeros conectados por interações covalentes e não covalentes. A pectina, outro componente, é um polissacarídeo altamente hidrofílico que proporciona maior hidratação à estrutura, pois atravessa a rede de celulose e hemicelulose. Componentes não estruturais também são observados, como os extrativos polares (fenóis e taninos), extrativos apolares (óleos e esteróis) e constituintes solúveis como açúcares, amido e proteínas (GUILLÉN, 2005).

Tabela 1. Composição química dos resíduos e subprodutos agrícolas utilizados para produção de enzimas microbianas.

Substratos	Celulose	Lignina	Hemicelulose	Cinzas	C/N	Proteína	Referencia*
	-----%-----						
Casca de Arroz	32,7	4,5	35,5	10,7	44,2		1
Sabugo de Milho	34,0	4,0	49,1	3,0	70,7		1
Bagaço de Cana	39	24	26			1,52	2
Farelo de Trigo	10,86	4,89	28,88			17,61	3
Palha de cana	40-44	22-25	30-32				4
Forragem de milho	38-40	7-21	28				4

Fonte: adaptada de FIGUEIRO; GRACIOLLI, (2011)¹; LASER et al. (2002)²; RODRIGUES-ZUNICA et al. (2011)³; SANTOS et al. (2012)⁴

2.2.1 *Produtos e subprodutos do bagaço de cana-de-açúcar*

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar e o setor sucroalcooleiro nacional é referência para os demais países produtores. A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o País, sendo que 60% é produzido no Estado de São Paulo, e as demais zonas produtoras são Paraná, Triângulo Mineiro e Zona da Mata Nordestina (BRASIL, 2016).

No mercado externo, apesar da queda nos valores do açúcar, em meio ao avanço da produção no Brasil combinado à ação especulativa de agentes, os preços continuaram em patamares altos, devido a perspectivas de déficit global. No estado de São Paulo, na parcial da safra (do início de abril até 15 de julho de 2016), foram produzidas 9,397 milhões de toneladas de açúcar, indicando forte aumento de 29,4% em relação ao mesmo período da temporada anterior, de acordo com dados da União da Indústria da Cana-de-açúcar (CEPEA, 2016).

O Brasil possui disponibilidade de terras cultiváveis para o plantio da cana, sem prejuízo dos outros alimentos, tecnologia de produção e estrutura para sua distribuição (BRASIL, 2016). Atualmente o açúcar passa por um período positivo com as altas dos preços, tornando-se uma atividade no foco do agronegócio brasileiro (CEPEA, 2016).

No processamento da cana-de-açúcar o bagaço é um dos subprodutos mais gerados, cerca de 280 kg ton⁻¹ de cana moída, estimado em 30% do total de cana-de-açúcar processada (PAVARINA, 1997; AGUIAR FILHO et al., 2010). Aproximadamente 90% deste resíduo resultante do processamento da cana é utilizado e empregado como combustível primário na geração de vapor e energia elétrica em usinas de açúcar e álcool, restando um excedente de 7 a 10% disponível para hidrólise e outros usos na forma de substratos (JARDINE et al., 2009;

DIAS et al., 2012b). Seu baixo valor nutricional restringe seu uso na alimentação animal por necessitar de algum tipo de tratamento físico ou químico (JUNIOR et al., 2010).

O uso do bagaço e da palha de cana-de-açúcar é aperfeiçoado na produção de bioetanol. Este subproduto é constituído por 40-60% de celulose (polímero de glicose), 20-40% de hemicelulose (heteropolímero formado por pentoses, açúcares de cinco carbonos) e 10-25% de lignina que é responsável pela formação de uma estrutura complexa e compacta nos vegetais. Uma outra forma de utilização do bagaço de cana e na composição de substrato para produção de mudas que, também, se constitui em alternativa barata e de fácil disponibilidade, sendo um destino final sustentável no meio ambiente, gerando renda para produtor agrícola nas regiões produtoras de cana-de-açúcar (FREITAS et al., 2006; DUTRA et al., 2013).

A diversidade de subprodutos gerados pela agroindústria sucroalcooleira permite uma gama de alternativas, como por exemplo, seu uso na alimentação animal, minimizando custos para o produtor, principalmente de bovinos confinados. Devido à alta dos preços dos grãos, o bagaço de cana-de-açúcar tem sido uma alternativa para diminuir os custos de produção na cadeia produtiva da carne bovina (MAGALHÃES et al., 1999). Entretanto, o uso do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação animal requer cuidados indispensáveis para atingir resultados satisfatórios, pois o mesmo apresenta baixa digestibilidade, é pobre em proteína, minerais e vitaminas, além de apresentar a parede celular fortemente lignificada. Desta forma, a celulose, fonte básica de energia para os ruminantes é pouco aproveitada por ocasião de sua lignificação (SOUZA; SANTOS, 2002).

2.2.2 *Produtos e subprodutos do Milho*

Zea mays var. *saccharata* Sturt, com nome vulgar de “milho doce”, é uma gramínea de elevada importância econômica a nível mundial, sendo um dos principais grãos produzidos no Brasil. Em 2016 houve um acréscimo na área de cultivo de 0,4%, e uma redução na produção de 19,1%, chegando a 68,5 milhões de toneladas, devido às adversidades climáticas. Essa redução na produção e os preços recordes do mercado atingiram principalmente as empresas compradoras que dependem do milho para a ração animal (CONAB, 2016). O Conselho Internacional de Grãos elevou suas previsões para a produção global de milho em 2016/17, para 1,017 bilhão de toneladas, ante uma projeção anterior de 1,003 bilhão de toneladas e ante as 968 milhões de toneladas da safra anterior (REUTERS, 2016). Os maiores

produtores mundiais de milho são Estados Unidos, México, Nigéria, Indonésia, Hungria, França, África do Sul e Peru (FAO, 2013).

As expectativas para essa safra do milho são otimistas, com o aumento da demanda (interna e externa). O consumo de milho está aumentando e os preços são os mais altos ao longo de vários anos (CEPEA, 2016). Com aumento da produção, maiores serão os resíduos gerados e a necessidade de implementação no sistema de logística industrial para seu uso sustentável, juntamente com pesquisas para avaliar as possibilidades e destinos.

O milho é utilizado na alimentação humana e animal, entretanto, possui resíduos e subprodutos advindos tanto do processo de colheita como do beneficiamento. Na colheita quatro tipos de resíduos são gerados: o caule, a folha, o sabugo e a palha da espiga que, comumente, são deixados no campo na forma de palhada para cobertura do solo. O sabugo e a palha da espiga são resíduos que podem ser gerados no processamento industrial quando a finalidade é a produção de milho verde em conserva e, nesse caso, com melhores possibilidades de serem utilizados para a geração de energia ou produção de adubos (SILVEIRA, 2010), evidenciando o seu potencial energético e de reposição mineral e orgânica do solo (VALE et al., 2013).

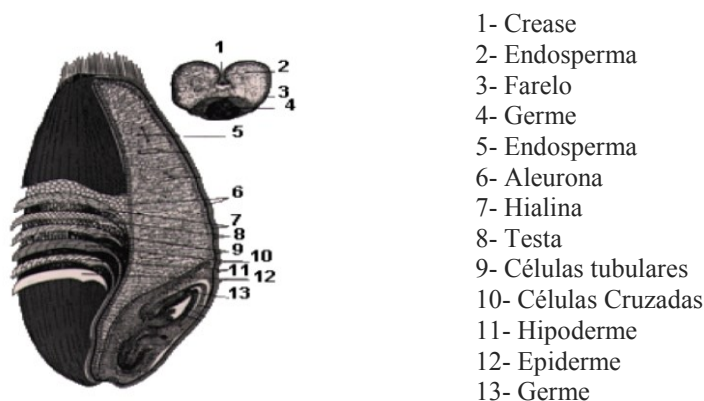
Em ambas as situações, as caracterizações energéticas dos subprodutos são indispensáveis para a análise do potencial na geração de energia (VALE et al., 2013), e como sua composição química pode variar entre os cultivares de milho, é importante um planejamento da produção para que o produtor possa gerar renda, com sustentabilidade (SILVEIRA, 2010).

2.2.3 Produtos e subprodutos do Trigo

O trigo (*Triticum sp.*) é um dos cereais mais diversificado pois é composto por 30 tipos, dos quais metade é cultivado e o restante é considerado silvestre (EMBRAPA, 2001). O *Triticum aestivum* L. trigo comum é um dos cereais mais cultivados no mundo e é considerado a principal cultura de inverno do Brasil, que obteve na safra em 2016 um crescimento na produção de 12,1%, chegando a 6,2 milhões de toneladas, mesmo com redução de 13,9% da área e produtividade de 5,26 t ha⁻¹ (CONAB, 2016). A região Sul é responsável por 90% da produção desta gramínea, sendo a maior área plantada no Paraná, que juntamente com o Rio Grande do Sul são responsáveis pela metade de toda área plantada no país (EMBRAPA, 2010; CONAB, 2016).

Após a moagem do grão de trigo para obtenção da farinha, o principal subproduto gerado é o farelo de trigo, bastante utilizado em dietas de animais, principalmente nas dietas de aves e suínos (COSTA et al., 2008). O grão de trigo é formado por tecidos distintos, exteriores ao núcleo do trigo (**Figura 7**). O pericarpo é película que recobre o grão (5% do peso do grão), rico em pentosanas, celulose, cinzas e proteína; a testa é uma película que recobre a semente, a camada hialina e a aleurona (7%) que é uma camada rica em cinza (fósforo e fitato), proteína, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina) e enzimas. O endosperma, equivale 82% do grão, é composto basicamente de amido, mas externamente (sub-aleurona) apresenta um teor elevado de proteína. O germe, cerca de 3% do grão, tem alto teor de proteína, lipídio, açúcares, e cinzas (EMBRAPA, 2010).

Figura 7. Seções longitudinal e transversal de um grão trigo



Fonte: Embrapa - Trigo (2010).

A composição química do farelo de trigo contém uma quantidade considerável de açúcares solúveis, tais como glucose (42,5%), xilose (15,4%), arabiose (3,1%), galactose (2,7%) (LEQUART et al., 1999). Com 15,52% de proteína, sua adição na dieta de aves é limitada pela alta concentração de fibra (9,66%, com base na massa seca) (ROSTAGNO et al., 2005). Os principais polissacarídeos não-amídicos (PNA) presentes no farelo são as arabinoxilanas (36,5%), mas contêm também celulose (11%), lignina (3 a 10%) e ácidos urônicos (3 a 6%) (MAES et al., 2004; SINGHANIA et al., 2007; SUKUMARAN et al., 2009; FALKOSKI et al., 2013). Segundo Schooneveld-Bergmans et al. (1999), as arabinoxilanas do farelo de trigo apresentam conhecida propriedade de reter água e promover a viscosidade em soluções.

Segundo Sabalsagaray (1998), o farelo é classificado em semitin e germen de trigo, sendo que o primeiro é utilizado como alimentação animal nas rações balanceadas, e o

gérmen aplicado na alimentação humana, inseridos principalmente em produtos dietéticos e integrais. O autor enfatiza que devido a isto a denominação resíduo deve ser desconsiderada para este subproduto do processamento do grão de trigo. Outro subproduto deste processo, o triguilho, é citado por Brum et al. (1998) e Teixeira (1998), como sendo grãos pequenos, chochos e quebrados durante sua limpeza, e possuem utilidade de compor rações e alimentos humanos como farinha para quibes e saladas.

Os triguilhos tem um bom teor de energia metabolizável (EM), em torno de 2.760 kcal de EM kg⁻¹ e de 14,7% de proteína bruta, podendo variar de acordo com o processamento e classificação do grão. Elevados teores de proteína bruta, cálcio, fósforo, fibra bruta e aminoácidos, são encontrados neste subproduto. A limitação no uso do triguilho em substituição ao milho nas rações para frangos de corte, se deve a seu baixo valor de energia metabolizável e alto teor de fibra bruta (BRUM et al., 1998; SABALSAGARAY, 1998).

2.2.4 Produtos e subprodutos do Arroz

Em relação a 2015, houve uma redução em 7,9% na área plantada de arroz no país, e a produção em 7,8%, com produtividade de 5,5 t ha⁻¹ em 2016, totalizando 11,1 milhões de toneladas. Considerado um dos cereais mais cultivados do mundo, ele é responsável pela base alimentar de grandes contingentes humanos, consumido na forma de grãos inteiros, como arroz integral (descascado), arroz branco (polido) e o arroz parabolizado. Ambos são oriundos do arroz em casca e obtidos por diferentes processos de pós-colheita que geram mudanças físicas, químicas e estruturais nos grãos (CASTRO et al., 1999; VIEIRA; CARVALHO, 1999; SAIDELLES et al., 2012; CONAB, 2016).

A casca representa, aproximadamente, entre 20 e 22% do peso total, resultante do processo para obtenção do produto beneficiado polido, por meio do descascamento do grão, em seguida, o grão descascado integral passa pelas etapas de brunição e polimento, quando são retirados o embrião (total ou parcialmente) e a maior parte da película que recobre o grão (SAIDELLES et al., 2012). Grande parte da casca de arroz é reutilizada na agroindústria como combustível em caldeiras e na geração de energia elétrica. Este subproduto também é destinado para compostagem ou reutilizados por especialistas na obtenção de um filme polimérico usado como protetor em aparelhos óticos e semicondutores, e ainda na produção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* (MANUKOVSKY et al., 1997; PELIZER, 1997; FERREIRA, 2005; DIAS et al., 2011).

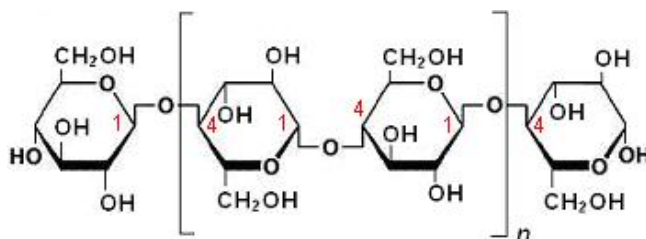
A cinza, principal resíduo do processo de combustão da casca de arroz em fornalhas para a geração de energia, é destinada para lavouras na forma de adubos antes de um pré-tratamento, e também para a indústria cerâmica, principalmente como matéria prima na fabricação de vidros, refratários, tubos cerâmicos, isolantes térmicos, abrasivos e na construção civil como componente em cimentos, concretos e argamassas (SILVA et al., 2005; DELLA et al., 2006; DIAS et al., 2011).

O sistema de gestão ambiental de uma indústria de beneficiamento de arroz deve conter todo um mapeamento dos resíduos sólidos gerados no processo, e quais dos resíduos serão reaproveitados na produção de subprodutos, resultando em uma redução do impacto ambiental causado pelo seu acúmulo na natureza, além de incorporar valor no produto antes considerado apenas resíduo do processo produtivo (SAIDELLES et al., 2012). Conforme evidenciado nos dados anteriormente, existe um esperado aumento de crescimento na produção de todas as culturas anteriormente citadas e, conseqüentemente, das biomassas estudadas neste trabalho.

2.3 Componentes da parede celular vegetal

A celulose é o componente mais abundante da biomassa das plantas, sendo encontrada, quase que exclusivamente, na parede celular e corresponde a aproximadamente 35-50% do peso seco da planta (**Figura 8**). Uma característica importante desta matriz cristalina é de que as moléculas componentes das microfibrilas individuais são empacotadas suficientemente compactadas para prevenir a penetração de enzimas e pequenas moléculas, como por exemplo a água (LYND et al., 2002). Estas microfibrilas são organizadas em finas camadas (lamela) para formar a estrutura de várias camadas da parede celular da planta. As fibrilas da celulose possuem regiões de alta ordem (regiões cristalinas) e regiões menos ordenadas, as chamadas regiões amorfas, sendo esta última mais suscetível à ação das enzimas celulolíticas (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Figura 8. Açúcar que compõe a unidade de celulose.

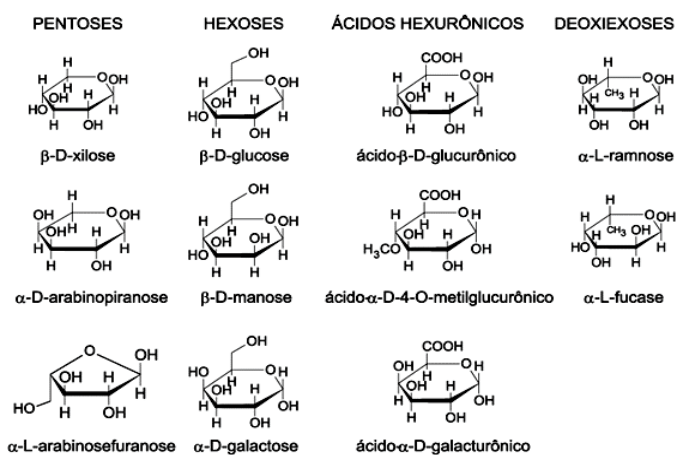


Fonte: Morais (2005).

Cada uma das fibrilas que compõe a estrutura da celulose é formada pela agregação de cerca de 250 microfibrilas, sendo que cada microfibrila é formada por um pequeno número de feixes de molécula de celulose (fibrilas elementares), onde cada molécula de celulose é formada por mais de mil unidades de glicose, as quais se interligam por ligações de hidrogênio. Em alguns pontos das fibrilas elementares as moléculas de celulose estão dispostas de maneira desordenada, em outras elas se dispõem ordenadamente, formando as micelas de estrutura cristalina. Entre as fibrilas, microfibrilas e fibrilas elementares, ocorrem outros componentes da parede celular como a hemicelulose, lignina, etc. (SAITO, 2005).

A hemicelulose apresenta como componentes, complexos polissacarídeos que são estruturalmente homólogos à celulose porque tem um esqueleto formado por ligações 1,4 β -D-piranosil. Ao passo que a celulose é um homopolímero linear com pouca variação em sua estrutura, de uma espécie para outra, a hemicelulose é altamente ramificada, geralmente com heteropolissacarídeos não cristalinos, incluindo pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-galactose, a L-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), e ácidos urônicos (D-ácido glucurônico). No grupo das hemiceluloses podemos citar o xilano, manano, galactano e arabiano como os principais (**Figura 9**) (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Figura 9. Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.



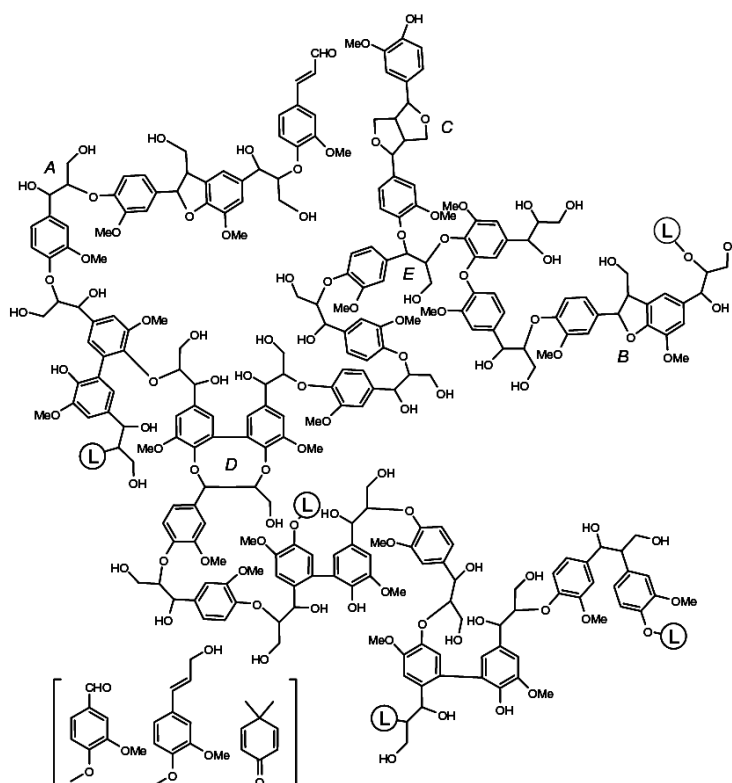
Fonte: Morais (2005).

A parede celular vegetal apresenta grande porção de xilano, que é a principal classe de hemicelulose, e que representa de 5 a 15% da biomassa de madeira de folhosas, e pode representar até 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais. O xilano apresenta-se homopolimérico em sua cadeia principal, contendo resíduos de D-xilose unidos

por ligações β -1,4 ou por grupos de O-acetil que podem ser alternativos nas posições O-2 e/ou O-3 (COLLINS et al.; 2005; DEUTSCHMAN, DEKKER, 2012).

A lignina é a principal porção não polissacarídica presente na parede celular vegetal em plantas lignificadas, representando 1/3 da biomassa lenhosa terrestre (**Figura 10**). A lignina é encontrada nas paredes celulares das plantas superiores (gimnospermas e angiospermas) e samambaias predominantemente nos tecidos vasculares especializados para o transporte de líquidos. Não é encontrada em musgos, líquens, algas que não possuem traqueídeos (células em forma de longos tubos peculiares para o xilema). A lignificação é o processo pelo qual crescem as moléculas de lignina para encher os espaços entre as fibrilas pré-formadas de celulose e as cadeias de hemicelulose da parede celular (GLAZER; NIKAIDO, 1995; BURANOV et al. 2008).

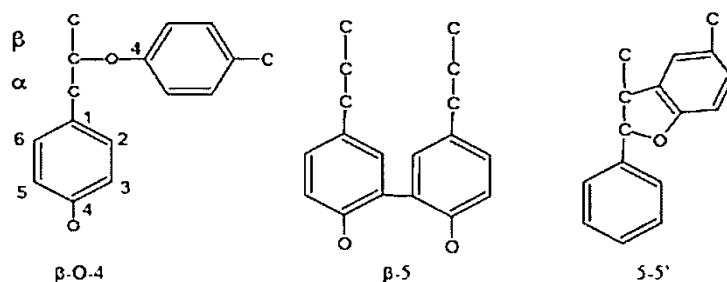
Figura 10. Estrutura da lignina.



Fonte: Buranov et al., (2008).

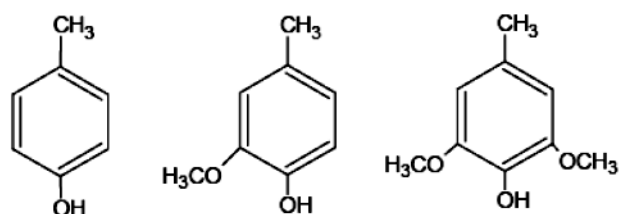
A **Figura 11** ilustra principais tipos de ligações entre unidades de fenil-propanóides presentes na molécula de lignina. As principais unidades aromáticas que compõe a molécula de lignina são *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (**Figura 12**).

Figura 11. Principais tipos de ligações entre unidades fenil-propanóides presentes na molécula de lignina.



Fonte: Camargo (2003).

Figura 12. Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina.



Fonte: Camargo (2003).

A lignina é hidrofóbica e possui uma distribuição topoquímica no interior da parede celular que confere um efeito protetor, capaz de limitar e até mesmo impedir a atuação microbiana sobre os materiais lignocelulósicos. Esta complexidade estrutural tem sido um obstáculo técnico para a produção de biocombustíveis e outros insumos, a partir de materiais lignocelulósicos (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al. 2010; DONG et al., 2011). A lignificação dos vegetais se inicia nas regiões da lamela média e parede celular (S₁), e em seguida se espalha por toda parede celular secundária (S₂), sempre no sentido da luz. Este processo finaliza o processo de diferenciação das células do xilema, onde há o depósito intralamelar da lignina sobre os carboidratos na matriz da parede celular e, concomitantemente ocorrem as ligações com os carboidratos não celulósicos (DONALDSON, 2001).

A lignina é um subproduto residual do processo de produção de etanol utilizando materiais lignocelulósico, e também possui potencial para uso como combustível e para a produção de matérias primas, dentre outros. Deste modo, a utilização de fungos produtores de enzimas capazes de degradar essa biomassa tem sido uma estratégia interessante. No entanto, a lignina, assim como a celulose e hemicelulose, são componentes da biomassa com potencial

para seu uso como combustível e produção de matérias primas, dentre outros (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al. 2010; DONG et al., 2011).

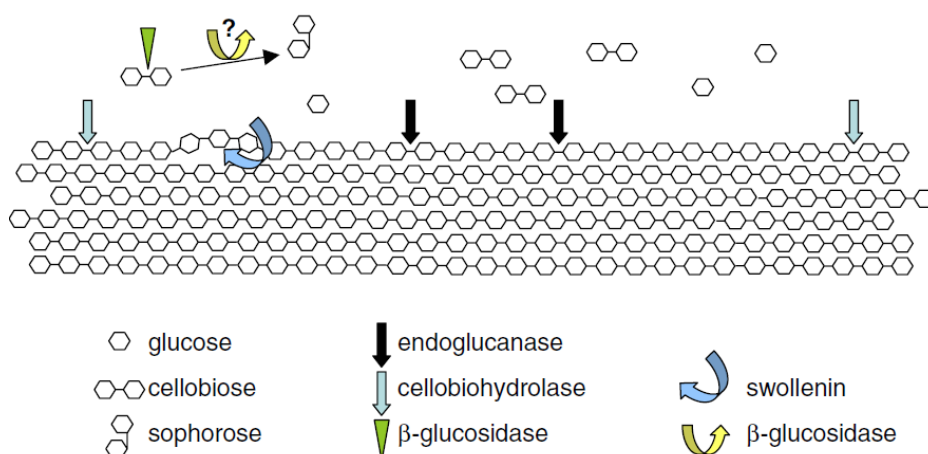
Altas temperaturas (210 e 225 °C) têm sido utilizadas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos para separação da lignina por evitar mudanças em suas características. As ligninas podem ser obtidas em grande quantidade, boa qualidade, pouco alterada e menos condensada nos processos de pré-tratamento da madeira (ZHANG et al., 2007). Sendo assim, é possível sua aplicação em diversos solventes orgânicos, devido sua solubilidade, podendo ser aplicada em diversas áreas como adesivos, fibras, filmes, polímeros biodegradáveis, dentre outros (PEREIRA et al., 2007). As ligninas e as lignanas tem sido estudada para aplicação à saúde humana, por terem se demonstrando como antioxidantes, atuando como varredores de radicais livres, podendo ser utilizadas para as formulações e aplicações em cosméticos e em formulações tópicas para olhos (BHAT et al., 2009). Dong et al. (2011) analisaram a atividade antimicrobiana e antioxidante de lignina, onde observaram a presença de leveduras quando as ligninas foram removidas da palha do milho.

2.4 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal

As celulasas e as hemicelulasas são grupos de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular da biomassa. As celulasas (**Figura 13**) constituem-se um complexo enzimas biocatalizadoras específicas que atuam sinergicamente para a liberação de açúcares, que atualmente é de grande interesse industrial, como a glicose. As principais enzimas secretadas por fungos e que são responsáveis pela clivagem das ligações β -1,4 da celulose são as endoglucanases (EG), as exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1 - CBH) e as β -glicosidades (BG) (LYND et al., 2002; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

As endoglicanases (endo-1,4- β -D-glicanases (EG) (EC 3.2.1.4) – são enzimas responsáveis por iniciar o processo de hidrólise do complexo celulolítico, atuando em regiões mais internas da cadeia da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diferente polimerização, e como resultado, novos terminais são gerados. A endoglucanase possui seu sítio ativo na forma de uma chave que permite a ação da enzima por toda cadeia da celulose o que reduz o seu grau de polimerização. Os terminais podem ser redutores quando a molécula de glicose possuir uma hidroxila heterosídica livre, e podem ser não redutores, quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa ligando-se com a glicose adjacente (LYND et al., 2002).

Figura 13. Mecanismo de ação das celulases.



Fonte: Aro et al. (2005).

As exoglucanases ou celobiohidrolases agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras (CBHI – EC 3.2.1) ou não redutoras (CBHII – EC 3.2.1.91) da celulose, apresentando maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina. Liberam glicose do processo, principalmente celobiose como produto, que geralmente é responsável pela sua própria inibição (LYND et al., 2002).

As β-glicosidades atuam nas moléculas de celooligosacarídeos e celobiose liberados pela ação das endo e exoglicanases, formando a glicose. Essas enzimas são induzidas pela presença de celobiose, mas são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, a glicose (LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006; BON et al., 2008).

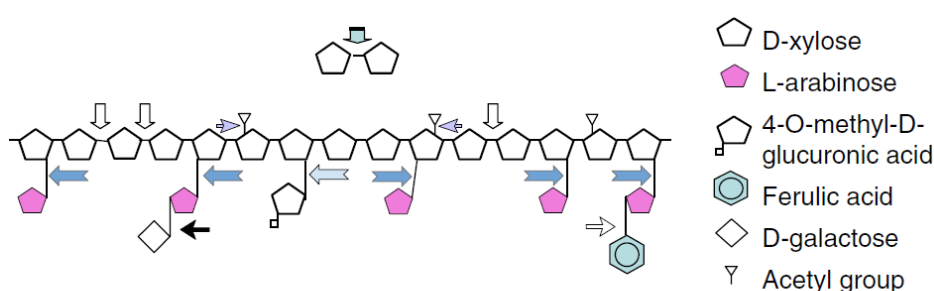
As hemicelulases hidrolisam a hemicelulose e, é composta por um grupo muito grande de polissacarídeos heterogêneos de alta massa molecular, insolúveis em água, mas solúvel em soluções alcalinas. Os fungos produzem enzimas que estão presentes em 20 das 100 famílias de Glicosil hidrolases (GH), que são conhecidas por hidrolisar polissacarídeos da biomassa celulósica em ligações glicosídicas, ou carboidrato estereases (CE), que hidrolisam ligações ester de grupos acetato ou grupos laterais de ácido ferrulico.

A xilana é o principal carboidrato encontrado nas hemicelulose. As principais xilanases podem ser classificadas como endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8) gera oligossacarídeos a partir da clivagem do xilano e 1,4-β-xylosidase (EC 3.2.1.37) produz xilose de oligossacarídeos mostrada na **Figura 14** (ARO et al., 2005; COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005).

O complexo xilanolítico pode ser clivado pela ação de diferentes enzimas que atuam no xilano. Assim, têm-se:

Endo-β-1,4-xilanases (1,4-β-D-xilana xilanohidrolase; E.C. 3.2.1.8): clivam as ligações glicosídicas β-1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos e conseqüentemente reduzindo o grau de polimerização do substrato. É uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. De acordo com Wong et al (1992) as endoxilanases podem ser de dois tipos, de acordo com o produto final da reação. Assim podem ser endoxilanases não desramificantes as quais não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação 1,3-α-L-arabinofuranosil da arabinoxilana e as endoxilanases desramificantes as quais conseguem clivar essa ligação liberando arabinose.

Figura 14. Estrutura do xilano, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.



SYMBOL	ENZYME	EC-NUMBER	LINKAGE HYDROLYSED
↓	Endo-1,4-β-xylanase	3.2.1.8	β-1,4
⬇	β-D-xylosidase	3.2.1.37	β-1,4
→	α-L-arabinofuranosidase Arabinoxylan arabinofuranohydrolases	3.2.1.55	α-L-1,2; α-L-1,3 and α-L-1,5
⇒	α-D-glucuronidase	3.2.1	α-1,2
⇒	feruloyl esterase	3.2.1	ester bond
→	α-D-galactosidase	3.2.1.22	α-1,6
⇒	asetylxylylan esterase	3.1.1.6	ester bond

Fonte: Aro et al. (2005).

Arabinases: as quais removem resíduos de L-arabinose na posição do C2 e C3 de β-D-xilopiranosil. Elas podem apresentar dois modos de ação: *exo-α-L-arabinofuranosidase* (E.C. 3.2.1.55) a qual degrada arabinanas ramificadas e o p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo; e a *endo-1,5-α-L-arabinase* (E.C. 3.2.1.99) a qual hidrolisa as arabinanas lineares (WONG et al., 1992);

α-Glicuronosidase (E.C. 3.2.1.-): hidrolisa as ligações α-1,2 entre o ácido glicurônico e o β-D-xilopiranosil removendo os resíduos de α-4-O-metil (WONG et al, 1992);

β-D-xilosidase (1,4-β-D-xilana xilohidrolase; E.C. 3.2.1.37): liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos curtos e xilobiose. São capazes de clivar substratos artificiais como p-nitrofenil e o-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (WONG et al, 1992)

Acetilxilana esterase (E.C. 3.1.1.6): que remove os grupos O-acetil na posição do C2 e\ou C3 do resíduo β-D-xilopiranosil da acetil xilano (WONG et al., 1992);

Ácido ferúlico esterase (E.C.3.1.1.-) e a *Ácido p-cumaril esterase* (E.C.3.1.1.-) as quais clivam as ligações ésteres do xilano, sendo que a primeira cliva entre a arabinose e o ácido ferúlico e a segunda entre a arabinose e o ácido p-cumarico (WONG et al., 1992).

Enfim, os principais fatores que limitam a hidrólise enzimática são principalmente os teores de lignina; superfície de contato; cristalinidade e grau de polimerização da celulose; porosidade; aspereza e espessura da parede celular (WONG et al., 1988; NAKUMURA, 2003). São aplicadas principalmente na conversão de matérias lignocelulósicas em produtos químicos e combustíveis, no branqueamento do papel e celulose, nas indústrias têxteis, de alimentos e ração animal, etc. (POLIZELI et al., 2005).

2.5 Micro-organismos produtores de enzimas e processos fermentativos

Os micro-organismos são os que mais prevalecem na produção de enzimas industriais, embora ocorra a extração de biocatalizadores de tecidos vegetais e animais. Alguns micro-organismos produzem enzimas capazes de degradar a parede celular da biomassa lignocelulósica, e conduzir o processo de decurso de nutrientes e minerais no solo (LOPES et al., 2013). Para obtenção eficiente de biocatalizadores, é importante um controle dinâmico de parâmetros operacionais para otimização do processo.

Alguns fungos mesófilos são conhecidos por sua capacidade de produzir celulasas, como *Aspergillus* e *Trichoderma*, e houve um aumento considerável de pesquisa direcionado a sua produção e aplicação biotecnológica (JIANG et al., 2011). O uso de espécies de fungos conhecidas por sua capacidade antagonista, como por exemplo, os do gênero *Trichoderma* (SAMUELS, 2006; SAMUELS et al., 2010; SRIRAM et al., 2013) foram utilizados por pesquisadores e relatados na literatura (BARBOSA et al., 2001; SRIRAM; RAY, 2005; IRSHAD et al., 2013), onde examinaram as atividades das enzimas secretadas por este gênero. Este é o um dos principais gêneros capazes de produzir enzimas de interesse industrial (FANG; XIA, 2013), seguindo pelo gênero *Aspergillus*, sendo o *A. niger* e *A. oryzae* os dois mais importantes a nível mundial para aplicações tecnológicas (BHAT, 2000; HU et al., 2011).

Do gênero *Trichoderma*, o *Trichoderma reesei* se destaca como produtor de enzima (SRIRAM et al., 2009), e outras espécies como *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. viride* e *T. asperelloides* além de serem espécies do agente de biocontrole de plantas (SAMUELS, 2006; MORANDI; BETTIOL, 2009) são testadas quanto ao seu potencial na produção de celulases (SRIRAM; RAY, 2005; TIAN-QING et al., 2013).

A redução nos custos do processo industrial é um dos motivos para uso de enzimas microbianas produzidas por fungos (COUTO; SANROMÁN, 2006). As principais vantagens referidas as enzimas microbianas para a aplicação industrial são devido ao menor tempo de geração para a produção, facilidade de manipulação genética, incremento de escala e purificação, especificidade e estabilidade (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009), e estas são produzidas principalmente por meio de fermentação submersas, usando culturas de fungos filamentosos (PANDEY et al., 2000).

Processos fermentativos em estado sólido (FES) e em fermentação submersa (FSm) são as técnicas existentes para a produção de enzimas microbianas de interesse biotecnológico. A fermentação submersa, estando o substrato e a célula produtora em meio líquido em biorreatores automatizados é a técnica mais utilizada para obtenção de enzimas microbianas. Neste processo, há a possibilidade de controlar os parâmetros físicos e químicos, como pH, temperatura e consumo de oxigênio, sendo estes, as principais vantagens deste processo, além da maior eficiência da absorção e excreção de metabólitos pela célula. Como desvantagens podemos citar os custos com aeração e agitação, e a formação de espumas durante o processo (BON et al., 2008).

A FES tem se sobressaído por simular condições próximas ao habitat natural deste micro-organismos, e é utilizado amplamente em países orientais (HOLKER et al., 2004; BON et al., 2008). As vantagens que mais se destacam no ponto de vista ambiental estão relacionadas ao menor volume de efluente produzido, e a opção de utilizar resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais como fonte de carbono, justificando que matéria-prima é um dos componentes mais relevantes do custo de produção, podendo representar, até 75% do custo total do processo (VINIEGRA-GONZALEZ et al., 2003). Os fatores limitantes que se destacam no processo de FES é a baixa acessibilidade ao substrato, dificuldade de controle de variáveis bioquímicas, restrição no aumento de escala (BON et al., 2008).

A fermentação em estado sólido é uma alternativa de baixo custo para a produção de enzimas, que fornece enzimas com propriedades funcionais industriais. Esses resíduos devem ser apropriados, a ponto de induzir a produção de xilanases, celulases, amilases, proteases,

pectinases, entre outras enzimas de interesse (PANDEY et al., 2000; MONTEIRO; SILVA, 2009; DIAS et al., 2012a).

Para Haltrich et al. (1996), Polizelli et al. (2005), Baratto et al. (2011) e Alves-Prado et al. (2011) a escolha do substrato indutor apropriado é um fator importante para a obtenção de xilanase, pois os fungos podem produzir concomitantemente outras enzimas celulolíticas, que sofrem influência de parâmetros mínimos no bioprocessamento. Entendido como um processo facilitador da seleção de organismos promissores na produção de enzimas, a simulação do habitat natural do fungo, onde estes fungos degradam a biomassa do solo para suprir suas necessidades essenciais, pode ser importante, quando seu cultivo ocorre em substratos lignocelulósicos que incluem resíduos agroindustriais, tais como, palha de milho, arroz, trigo, bagaço de cana-de-açúcar, além da adição de outras fontes de carbono para a indução de diversas enzimas, como xilanases, celulasas, amilases, entre outras (PANDEY, 2003; ZHANG et al., 2006; TAO et al., 2010).

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. O Pantanal Mato-Grossense e a teoria dos refúgios. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 9-57, 1988.
- ADAMOLI, J. O pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito de "Complexo do Pantanal". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. **ANAIS... UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**, 32., 1992, Teresina. **Anais...** Teresina: [s.n.], 1982. , p. 109-119.
- AGUIAR FILHO, M. M.; ROMANHOLO FERREIRA, L. F.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Carlos, v. 68, n. 4, p. 957-966, 2008.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. Biodiversidade do Pantanal. **Ecologia e conservação**. Campo Grande-MS: UNIDERP, 2005. 142 p.
- ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Cellulolytic Enzymes Isolated From Brazilian Areas: Characterization and Applications. In: GOLAN, A. E. (Org.). **Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses**, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. Cap. 6, p. 183-210.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 719-739, 2005.
- ASSINE, M. L.; MERINO, E. R.; PUPIM, F. N.; MACEDO, H. A.; SANTOS, M. G. M. The Quaternary alluvial systems tract of the Pantanal Basin, Brazil. **Brazilian Journal of Geology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 475-489, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL - BRACELPA. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/170>>. Acesso em: 07 mar. 2016.
- 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. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 504-510, 2007.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 98-104, 2001.

BAZZO, J. C.; FREITAS, D. A. F.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; SANTOS, S. A. Aspectos geofísicos e ambientais do Pantanal da Nhecolândia. **Revista de Geografia**, Recife, v. 29, n. 1, 2012.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHAT, R.; KHALIL, H. P. S. A.; KARIM; A. A. Exploring the antioxidant potential of lignin isolated from black liquor of oil palm waste. **Comptes Rendus Biologies**, Issy les Moulineaux, v. 332, p. 827-831, 2009.

BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.

BONONI, V. L. R.; OLIVEIRA, A. K. M.; QUEVEDO, J. R.; GULIOTTA, A. M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, Sao Paulo, v. 35, n. 4, p. 489-511, 2008.

BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA Trigo, 2010. Publicações On-line. Disponível em: <<http://cnpt.embrapa.br/i-mecan.htm>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Introdução do trigo no Brasil. Embrapa Trigo, Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do126_2.htm>. Acesso em 14 jul. 2016.

BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Levantamento e mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Pantanal, período de 2002 na escala de 1:250.000**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2004. p. 43.

BRUM, P. A. R. et al. **Utilização do** BRUM, P. A. R. et al. **Utilização do triguilho em rações para frango de corte**. Concórdia: Embrapa, 1998. 2 p. (Instrução técnica para o avicultor, 3). Disponível em: <<https://docsagencia.cnptia.embrapa.br/suino/instecev/itav003.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

BURANOV, A. U., MAZZA G. Review: lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237-259, 2008.

CAMARGO, F. A. de. **Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli (3-hidroxibutirato-co-valerato) / (PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2011.

DONALDSON, L. A. Review: lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v.57, p.859-873, 2001.

CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30 p. (Circular Técnica, 34).

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA, ESSALQ. Milho agromensal: informações de mercado, julho 2016. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/agromensal/2016/07_julho/Milho.htm#_III_%E2%80%93_Gr%C3%A1ficos>. Acesso em: 02. Jun. 2016

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA, ESSALQ. Açúcar e etanol agromensal: informações de mercado, julho 2016. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/agromensal/2016/07_julho/AcucarAlcool.htm>. Acesso em: 13 mai. 2016.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, Hoboken, n. 27, p. 51-57, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 3-23, 2005.
CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO.

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS. **Safra 2015/16**, Brasília, DF, n. 6, p. 1-138, março 2016. ISSN 2318-6852. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

COSTA, M. G. et al. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados - **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 220-225, jan.-mar. 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/30.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal Food Engineering**, London, v. 76, p. 291-302, 2006.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRA, A. P. N. Estudos comparativos entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, p. 6065–6072, 2011.

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DIAS, J. M. C. de S.; SOUZA, D. T. de S.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M. O.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. **Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais**. Brasília, DF:

Embrapa Agroenergia, 2012a. 130 p. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/78690/1/DOC-13.pdf>>. Acesso em:
10 jun. 2016.

DIAS, M. F. P.; PEDROZO, E. A.; ANICET, C. N. Desafios e respostas inovadoras sustentáveis da agroindústria arrozeira brasileira. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 57-77, 2011.

DIAS, M. O. S.; JUBQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 103, n.1, p.152-161, 2012b.

DONG, X.; DONG, M.; LU, Y.; TURLEY, A.; JIN, T.; WU, C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1629-1634, 2011.

DURIGAN, G.; MELO, A. C. G.; MAX, J. C. M.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de Cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.

DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; SARMENTO, M. F. Q.; OLIVEIRA, J. C. Substratos alternativos e métodos de quebra de dormência para produção de mudas de canafístula. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n.1, p. 072-078, jan/fev, 2013.

FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 296-305, 2013.

FANG, H. E.; XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 44, p. 69, 2013.

FAO STAT. **On-line database**. Rome: FAO, 2013 Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

FERREIRA, C. S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir da cinza da casca de arroz**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FIGUEIRO, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 924-930, 2011.

FREITAS, S. S. **Avaliação de pré-tratamentos em resíduo oriundo do cultivo do milho**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

- FREITAS, T. A. S.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; PENCHEL, R. M.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. Mudanças de eucalipto produzidas a partir de miniestacas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, p. 519-528, 2006.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GLAZER, A. N.; NIKAIIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: Ed. W.H. Freeman and Company, 1995. p. 335-357.
- GUILLÉN, F. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Madrid, v. 8, n. 19, p. 187-204, 2005.
- HAHN, G.; HAHN, R.; LEONARDOS, O. H.; PFLUG, H. D.; WALDE, D. H. G. Kfrperlich erhaltene Scyphozoen-Reste aus dem Jungprekambrium Brasiliens. **Geologica et Paleontologica**, Madrid, v. 16, p. 1-18, 1982.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.
- HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004. ISSN 0175-7598.
- HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 65, p. 248-252, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Mapas interativos**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 02 abr. 2016.
- IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-Industrial and municipal paper wastes. **BioResources**, Raleigh, v. 8, p. 145-157, 2013.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósicos para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore de conhecimento Agroenergia. **Embrapa Informática Agropecuária**, Campinas, p.11-12, 2009.
- JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Suita, v. 111, p.121-127, 2011.

JUNIOR, D. M. L.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O. Cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 13-20, 2010.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 24, p. 391-401, 2005.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Science**, Basel, v. 69, n. 3, p. 278-309, 2006.

KERBER, B. B.; ROSA, A. L. Z.; GABAS, S. G.; LEME, J. M.; PACHECO, M. L. A. O registro fossilífero de metazoários ediacaranos na América do Sul e suas implicações nos estudos sobre origem e complexificação da vida. **Geologia USP**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 5-64, set. 2013.

KIRK, P.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dicionário dos Fungos**. 10. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2008. 771 p.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems – Na Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 25, p.1-30, 2005.

KUHAD, R. C.; GRUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 1-10, 2011. Article ID 280696. doi:10.4061/2011/280696

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to valueadded coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v.3, n.2, p.133-140, 2003.

LEQUART, C.; NUZILLARD, J. M; KUREK, B.; DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 319, p. 102–111, 1999.

LI, X.; WENG, J. K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **Plant Journal**, Chichester, v. 54, p. 569-581, 2008.

LOPES, R. B.; BRITO, M. A. V. P. MELLO, S. C. M.; SAGGIN, O. J.; WENDLAND, A. Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade. In: SIMPÓSIO MICRO-ORGANISMOS EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.161 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95339/1/DOC15-19-12-2013.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 506, 2002. ISSN 1092-2172.

MAES, C.; VANGENEUGDEN, B.; DELCOUR, J. A. Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, p.181-186, 2004.

- MAGALHÃES, L. R. G.; VASQUEZ, H. M.; COELHO, S. J. F. Bagaço hidrolisado e ponta de cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum*), associados a duas fontes proteicas, na engorda de bovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vicosa, MG, v. 28, n. 4, p. 822-830, 1999.
- MAIA, L. C. et al. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1033-1045, 2015.
- MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Fungos do Brasil. In: FORZZA, R.C. et al. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio /Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, 2010. v. 1, p. 43-48, 2010.
- MANUKOVSKY, N. S.; KOVALEV, V. S.; YERYGALOV, V.; ZOLOTUKHIN I. G. Waste bioregeneration in life support CES: development of soil organic substrate. **Advances in Space Research**, Kidlington, v. 20, p. 1827–1832, 1997.
- MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulasas na sacarificação da celulose**. 2010. 94 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais – Brasil.
- MERCANTE, M. A.; RODRIGUES, S. C.; ROSS, J. L. S. Geomorphology and habitat diversity in the Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, supl. 1, p. 233-240, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of Pinusocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, viçosa, MG, v. 29, n. 3, p.461-470, 2005.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 07-14.
- NAKUMURA, S. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**, New York, v. 7, p. 157-164, 2003.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: 1-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology*. **New Delhi: Asiatech Publishers**, p. 760, 2005.

PAVARINA, E. C. **Estudo dos Sistemas celulolítico e fermentativo de fungos macroaeróbios facultativos**. 1997. 82 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Unicamp, Campinas, 1997.

PELIZER, L. H. **Estudo da influência da atividade de água na fermentação em estado sólido de *Bacillus thuringiensis***. 1997. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1997.

PEREIRA, A. A.; MARTINS, G. F.; ANTUNES, P. A.; CONRADO, R.; PASQUINI, D.; JOB, A. E. Lignin from sugar cane bagasse: extraction, fabrication of nanostructured films, and application. **Langmuir**, Washington, v. 23, p. 6652–6659, 2007.

PEREIRA, G.; CHÁVEZ, E. S.; SILVA, M. E. S. O estudo das unidades de paisagem do bioma Pantanal. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 7, n. 1, p. 89-103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.826>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

PEREIRA, L. O.; CARDOZO, F. S.; MOURA, Y. M.; FONSECA, L. M. G.; PEREIRA, G.; MORAES, E. C. Delimitação das áreas alagadas do Pantanal a partir da análise por Componentes Principais e Transformada Wavelet. In: SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, 3. 2010, Cáceres. **Anais...** Cáceres: [s. n.] 2010. p. 200-209. Disponível em: <<http://www.geopantanal2009.cnptia.embrapa.br/2010/cd/geopantanal.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e Especiais. Visão Geral e área de enzimas, conclusões e recomendações**. CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

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

PRANCE, G. T.; SCHALLER, G. B. Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato grosso, Brazil. **Brittonia**, New York, v. 34, n. 2, p. 228-251, 1982.

REUTERS – THOMPSON REUTERS BRASIL, 2016. Disponível em: <<http://br.reuters.com>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. Diversidade e conservação da vegetação e da flora. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação**. Brasília, DF: MMA, 2007. P. 21-139. (Série Biodiversidade 17).

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. et al. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 141 p.

- SABALSAGARAY, B. S. **Levantamento de Produção de Resíduos Agro-Industriais e seu Potencial de Utilização na Indústria da Construção**. 1998. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- SAIDELLES, A. P. F.; SENNA, A. J. T.; BITENCOURT, G. Gestão de Resíduos Sólidos na Indústria de Beneficiamento de arroz. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 5, n. 5, p. 904 - 916, 2012. ISSN: 2236-1170.
- SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico**. 2005. 97f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101732>>. Acesso em: 18 mai. 2016.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, London, v. 100, p. 923-935, 2006.
- SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BON, M.; RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, p. 944-966, 2010.
- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, [S. l.], v. 25, p. 188-193, 2012.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural features of (glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. **Journal of Cereal Science**, London, v. 29, p. 63-75, 1999.
- SILVA, M. P.; MAURO, R.; MOURÃO, G.; COUTINHO, M. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, p. 143-152, 2000.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicas e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede, **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 235-241, 2005.
- SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SOUZA, O.; SANTOS I. E.; **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 3p. (Comunicado Técnico, 7).

SRIRAM, S.; MANASA, S. B.; SAVITHA, M. J. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. **Journal Biological Control**, Bangalore, v. 23, n. 4, p. 449-456, 2009.

SRIRAM, S.; RAY, R. C. *Trichoderma*: systematic and molecular taxonomy and application in agriculture and industry. In: Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture, (ed. RAY, R. C.), **Science Publishers**, New Hampshire, v. 1, p. 333–370, 2005.

SRIRAM, S; SAVITHA, M. J.; ROHINI, H. S.; JALALI, S. K. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oli, n.4, p.gonucleotide barcode and morphological characters. **Current Science**, Jodhpur, v. 104, p. 1332-1340, 2013.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Schenectady, v. 32, p. 421-424, 2009.

TAO, Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, X. B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and properties of endoglucanase from a sugarcane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 10, p. 6126-6130, 2010.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais**. Lavras: UFLA - FAEPE, 1998. 402 p.

TIAN-QING, L.; DONG, W.; SHANG-TIAN, Y.; XIAO GUANG, L. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.133, p.175–182, 2013.

ÚNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar. Estimativa da safra 2010/2011 na região Centro-Sul**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em: 21 abr. 2016.

VALE, A. T.; DANTAS, V. F. S.; ZAMBRZYCKI, G. C. Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays*). **Evidência**, Joaçaba, v. 13, n. 2, p. 153-164, jul./dez. 2013.

VALE, A. T.; GENTIL, L. V. Produção e uso energético de biomassa e resíduos agroflorestais. In: _____. **Tecnologias aplicadas ao setor madeireiro III**. Rio Branco: Suprema, 2008. p. 195-241.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L.V. Qualidade tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANTANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 1999. p. 582-604.

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; ROMEROGOMEZ, S.; DIAZ-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 157-167, 2003.

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

ZHANG, M. A.; QI, W.; LIU, R.; SU, R. X.; WU, S.; HE, Z. Fractionating lignocellulose by formic acid: Characterization of major components. **Biomass & Bioenergy** v.34, p.525-532, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, J. R.; CUI, J. B.; ELANDER, R. T.; LASER, M.; HIMMEL, M. E.; McMILLAN, J. R.; LYND, L. R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology Bioengineering**, Hoboken, v. 97, p. 214–223, 2007. doi:10.1002/bit.21386

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p.452-481, 2006.

CAPÍTULO I - RESÍDUOS AGRÍCOLAS E AGROINDUSTRIAIS NA INDUÇÃO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE

RESUMO

Explorar o potencial biotecnológico de comunidades fúngicas mesofílicas e termofílicas do solo da região do Pantanal, e o aproveitamento da biomassa oriunda da colheita e do processamento de produtos agrícolas são fatores importantes no estudo das enzimas. Foi realizado isolamento microbiano empregando resíduos agrícolas e agroindustriais como indutores para crescimento e produção das enzimas xilanase, avicelase e carboximetilcelulase, utilizando meio nutriente com papelão e palha de milho triturado como substratos indutores para o crescimento microbiano de micro-organismos com potencial na degradação desses substratos. Após o isolamento, as culturas puras isoladas foram cultivadas sob fermentação em estado sólido (FES) utilizando, tendo o farelo de trigo como substrato. Os frascos para crescimento foram incubados em estufas de crescimento a 35 e 45 °C por 96 horas. A solução enzimática bruta foi obtida a partir do material fermentado e utilizada para determinação das atividades enzimáticas pela quantificação de açúcares redutores e determinação de proteína total. Foram selecionadas culturas para o estudo de produção enzimática em diferentes substratos. Os substratos analisados foram farelo de trigo (FT), palha de cana-de-açúcar (PC), bagaço de cana-de-açúcar (BC), palha de milho (PM), casca de arroz (CAz), sabugo de milho (SM), e as misturas de SM + FT, BC+ FT na proporção de 1:1. O fungo *Trichoderma asperelloides* F22 foi utilizado como cultura padrão. Foram obtidos 111 isolados fúngicos, os quais tiveram seu potencial enzimático analisado utilizando farelo de trigo como substrato. A palha de milho foi o substrato que mais favoreceu o crescimento das culturas em placas, com 51,4% dos isolados. Dos fungos isolados em palha de milho, 80,7% cresceram à 35 °C. O isolado WPPM 922 apresentou a maior atividade enzimática para xilanase, CMCase e avicelase de 614,5 U g⁻¹, 107,3 U g⁻¹ e 5,37 U g⁻¹, respectivamente, quando cultivado em farelo de trigo, em 96 h a 35 °C. Os oito isolados selecionados foram cultivados em diferentes substratos e a maior produção de xilanase foi obtida pelo isolado WPPM 421A, cultivado com casca de arroz, com atividade de 931,95 U g⁻¹, que foi superior ao *T. asperelloides* F22 (876,48 U g⁻¹). O isolado WPPM 622 foi superior às demais linhagens na produção da enzima CMCase, com atividade de 155,73 U g⁻¹. Os isolados foram considerados eficientes na

produção das enzimas xilanases e CMCase, quando comparadas com o *T. asperelloides* F22, onde 99% demonstraram habilidade em expressar celulasas e hemicelulasas.

Palavras-chave: Celulasas. Xilanase. Fermentação em estado sólido.

AGRICULTURAL AND AGROINDUSTRIAL WASTE AS INDUCER OF GROWTH AND ENZYME PRODUCTION BY FUNGI ISOLATED FROM SOIL OF PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL STATE

ABSTRACT

Explore the biotechnological potential of mesophilic and thermophilic fungal on soil communities of the Pantanal, and the use of biomass coming from the harvesting and processing of agricultural products are important factors in the study of enzymes. It was carried out using agricultural and agro-industrial waste as inducers for microbial isolation and to growth and production of enzymes as xylanase, avicelase and carboxymethylcellulase. The isolation was carried out in nutrient medium using crushed paperboard and corn stover as inducers substrates for microbial growth of the micro-organisms with the potential degradation of these substrates. After isolation, the isolated pure cultures were grown under solid state fermentation (SSF) and wheat bran as substrate. The flasks were incubated for growth in greenhouses of growth at 35 and 45 ° C for 96 hours. The crude enzyme solution was obtained from the fermented material and it was used for determination of enzymatic activity by quantification of reducing sugars and total protein determination. Studied cultures with high enzyme production were selected for cultivate on different substrates. The analyzed substrates were wheat bran (WB), sugarcane straw (SS), sugarcane bagasse (SB), corn stover (CS), rice husk (RH), corn cobs (CC) and mixtures WB + CC and WB+ SB in the ratio 1: 1. The fungus *Trichoderma asperelloides* F22 was used as the standard culture. They obtained 111 fungal isolates, which had their enzyme potential analyzed using wheat bran as substrate. Corn stover was the inducer substrate that most favored crop growth on plates, with 51.4% of the isolates. Fungal isolates in corn stover, 80.7% grown up at 35 °C. Isolated WPPM 922 had the highest enzyme activity to xylanase, CMCCase and avicelase of 614.5 U g⁻¹, 107.3 U g⁻¹ and 5.37 U g⁻¹, respectively, when grown on wheat bran in 96 h at 35 °C. The eight selected isolates were grown on different substrates and the high production of xylanase was obtained by isolated WPPM 421A, cultivated with rice husk, with activity of 931.95 U g⁻¹, which was higher than the *T. asperelloides* F22 (876.48 U g⁻¹). The isolated WPPM 622 was superior to the other strains in the enzymatic production of CMCCase with activity 155,73 U g⁻¹. Isolates were considered efficient in the production of xylanase and CMCases enzymes when

compared with *T. asperelloides* F22, where 99% demonstrated ability to express cellulases and hemicellulases.

Keywords: Xylanase. Cellulase. Solid state fermentation.

1 INTRODUÇÃO

O pantanal, visto como um ecossistema único no mundo, suporta uma biodiversidade pouco explorada (ALHO; GONÇALVES 2005; ALHO, 2008). É caracterizado como uma zona úmida, sua suscetibilidade a inundações periódicas apresenta intensidade e duração alternadas, que são cíclicas e responsável pelo equilíbrio do sistema ecológico de toda a região, ou seja, as interações e os padrões de diversidade biológica (JUNK et al., 2006; JUNK; CUNHA, 2005; ALHO, 2008; MERCANTE et al., 2011).

O desenvolvimento econômico e social desafia a integridade da biodiversidade do bioma Pantanal, que é impulsionado principalmente pela agricultura, pecuária, expansão urbana e pelo turismo. Valorizar e proteger a sua biodiversidade é um dos desafios traçados de conscientização, que caminham ao mesmo tempo que avança a destruição dos recursos naturais, pois são considerados como tesouros de valor ainda desconhecido, visto que nestes podem conter princípios ativos fonte de novos medicamentos, produtos químicos com potencial industrial, alimentícios e, ainda, outros usos que podem ser esclarecidos e descoberto por meio da pesquisa científica (DURIGAN et al., 2011; MERCANTE et al., 2011).

Prance e Schaller (1982), Ab'saber (1988) e Alho e Gonçalves (2005) relatam a biodiversidade do Pantanal Mato-grossense. Sua diversidade fitogeográfica é peculiar devido a convergência de quatro grandes províncias da América do Sul: Amazônica, Cerrado, Florestas Meridionais e Chaquenha. O Pantanal, caracterizado por ser uma região de planície alagadas, é um bioma pouco explorado quanto a comunidade microbiana do solo, e espera-se que exista uma diversidade com alto potencial biotecnológico para produção de enzimas e biocombustíveis.

Os resíduos compostos por materiais lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo, e esta biomassa apresenta potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas, compostos de aroma, entre outros (LEATHERS, 2003; BADHAN et al., 2007). Estudos que explorem o potencial biotecnológico de comunidades microbianas do solo do Cerrado foram realizados em pesquisas por Castro et al. (2008), tanto para a produção de bioetanol de segunda geração, quanto para a produção de enzimas lignocelulolíticas.

A ciclagem de nutrientes é altamente comandada por alguns micro-organismos que produzem enzimas altamente específicas capazes de degradar a parede celular da biomassa lignocelulósica (LOPES et al., 2013). Vários estudos são direcionados para identificar micro-

organismos, que produzem um complexo enzimático capaz de hidrolisar materiais lignocelulósicos. Os fungos são organismos heterotróficos, pertencentes ao grupo de microorganismos responsáveis por atuar na ciclagem de nutrientes, são encontrados na água e na terra, desenvolvendo-se em substratos orgânicos, são os mais apropriados para fins industriais, que produzem suas enzimas no componente extracelular, reduzindo assim custos no processo de rompimento celular (PANDEY et al., 2000; COUTO; SANROMÁN, 2006; JIANG et al., 2011).

As principais vantagens referidas as enzimas microbianas para a aplicação industrial são devido ao menor tempo de geração para a produção, facilidade de manipulação genética, incremento de escala e purificação, especificidade e estabilidade (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009), e estas são produzidas principalmente por meio de fermentação submersas, usando culturas de fungos filamentosos (PANDEY et al., 2000). A fermentação em estado sólido é uma alternativa de baixo custo para a produção de enzimas, utilizando no processo resíduos agroindustriais e agrícolas como fonte de carbono, que fornece enzimas com propriedades funcionais industriais, como a estabilidade térmica e a alteração ao pH do meio. Esses resíduos devem ser apropriados a ponto de induzir ou potencializar a produção de xilanases, celulasas, ou outras enzimas e subprodutos de interesse (PANDEY et al., 2000; DIAS et al., 2012a). Assim, uma forma de explorar o potencial biotecnológico de comunidades fúngicas mesofílicas e termofílica é através do isolamento e identificação de novas linhagens eficientes na produção de enzimas ou outros produtos de interesse.

As celulasas produzidas pelas espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, ultimamente têm sido foco em experimentos (JIANG et al., 2011). Um processo facilitador da seleção de organismos promissores na produção de enzimas é a simulação do habitat natural do fungo através da fermentação, onde estes fungos degradam a biomassa do solo para suprir suas necessidades essenciais. Esse processo pode ser importante quando seu cultivo ocorre em substratos lignocelulósicos que incluem resíduos agroindustriais, tais como, palha de milho, arroz, trigo, bagaço de cana-de-açúcar, além da adição de outras fontes de carbono para a indução de diversas enzimas, como xilanases, celulasas, amilases, entre outras (PANDEY, 2003; ZHANG et al., 2006; TAO et al., 2010).

Conhecidas por seu potencial de hidrolisar polissacarídeos da biomassa celulósica, as Glicosil hidrolases (GH), possuem cerca de 100 famílias onde 20 são produzidas por fungos. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações 1,4-β-D-xilosídicas da principal cadeia da xilana e, por estarem agrupadas na mesma família, apresentam mecanismos moleculares similares e estrutura tridimensional (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005). A

hemicelulose é constituída por um grande grupo de polissacarídeos heterogêneos de alta massa molecular, com insolubilidade em água e solubilidade em soluções alcalinas. Estruturas de glicana, xilana e glicomana compõe os polímeros, tornando mais complexo o processo de hidrolise deste grupo de polissacarídeos. (WONG et al., 1988; NAKUMURA, 2003).

2 OBJETIVOS

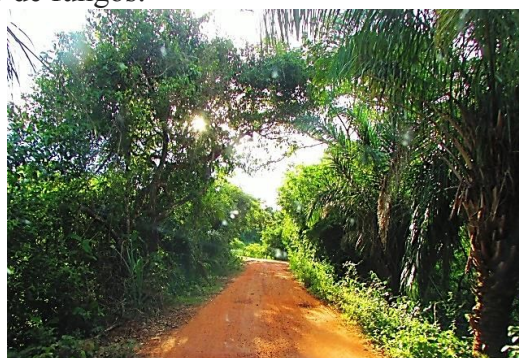
Com base na produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas, esta pesquisa teve como objetivo isolar culturas fungicas da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando resíduos e subprodutos agrícolas como indutores de crescimento. O estudo de diferentes fontes de substratos foi realizado a fim de avaliar o melhor substrato para produção de enzimas, empregando o *Trichoderma asperelloides* F22 como cultura controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta das amostras

As amostras de solos para isolamento das culturas fúngicas foram coletadas em área do Pantanal Sul-Mato-Grossense, nas fazendas Caimam, Joazeiro e Rio Negro, ambas propriedades particulares, situadas nos municípios de Miranda e Aquidauana-MS. Na fazenda Caimam foram amostrados 10 pontos de coleta devidamente georreferenciadas (**Tabela I.1**), no dia 10 outubro de 2012 e na fazenda Joazeiro e fazenda Rio Negro foram coletadas apenas uma amostra em cada local, sendo realizadas nos dias 12 e 13 de novembro de 2012. A vegetação característica dos solos amostrados (**Figura I.1**) era heterogêneas e alagáveis.

Figura I.1. Foto da região da fazenda Caimam, no município de Miranda-MS, onde 10 amostras de solos foram coletadas para isolamento de fungos.



Fonte: Próprio autor

Tabela I.1. Georreferenciamento dos locais amostrados no bioma Pantanal de Miranda-MS e Aquidauana-MS.

Ponto	S	W	Data	Hora	Temperatura
Fazenda Rio Negro					
1	S 19° 57' 10.1"	W 56° 20' 02.2"	10/07/2012	8h 00 m	26,6 °C
Fazenda Joazeiro					
2	S 19° 01' 8"	W 56° 40' 02"	11/07/2012	6h 30 m	22,1 °C
Fazenda Caimam					
3	S 19° 57' 10,5"	W 56° 17' 42,1"		7 h 00 m	23,4 °C
4	S 19° 53' 54.8"	W 56° 18' 1.16"		7 h 10 m	23,4 °C
5	S 19° 53' 58"	W 56° 17' 42.1"		7 h 15 m	23,5 °C
6	S 19° 53' 04.1"	W 56° 17' 58.7"		7 h 30 m	23,8 °C
7	S 19° 50' 50.8"	W 56° 16' 17.3"	10/10/2012	7 h 35 m	24,0 °C
8	S 19° 56' 58.2"	W 56° 17' 22.1"		7 h 50 m	24,5 °C
9	S 19° 57' 092"	W 56° 18' 30.4"		7 h 55 m	24,5 °C
10	S 19° 57' 18.2"	W 56° 18' 49.3"		8 h 05 m	25,0 °C
11	S 19° 57' 36.7"	W 56° 18' 55.1"		8 h 10 m	25,2 °C
12	S 19° 57' 24.3"	W 56° 18' 36.3"		8 h 15 m	25,2 °C

Fonte: Próprio autor

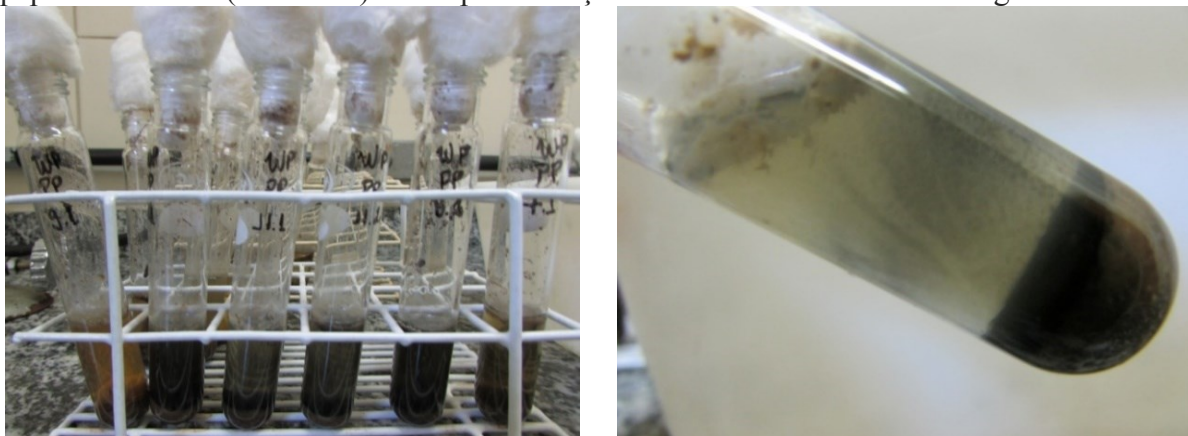
3.2 Isolamento e manutenção dos isolados

Para a coleta do solo foram utilizados sacos plásticos e caixas de isopor para armazenamento das amostras de cada um dos pontos, até o deslocamento ao laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos da UNESP, Campus de Ilha Solteira-SP, para proceder ao isolamento microbiano.

De cada amostra de solo (com restos vegetais visíveis < 5mm Ø) 0,5 g do solo coletado em campo foram, em triplicata, transferidos para tubos de ensaio, contendo 4 mL de meio nutriente proposto por (Gomes et al, 2005), cujos constituintes são 0,2% peptona; 0,14% (NH₄)₂SO₄; 0,20% K₂HPO₄; 0,02% MgSO₄.7H₂O; 0,03% uréia; 1,60 mg L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 1,40 mg L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 2,0 mg L⁻¹ CoCl₂; 5 mg L⁻¹ FeSO₄.7H₂O para 100 mL de meio de cultura. Foram preparados tubos contendo 1% de papelão triturado a 2 mm como fonte de carbono e tubos contendo 2 tiras de palha de milho na dimensão de 3,0 cm x 0,5 cm. Os tubos contendo o meio nutriente foram esterilizados com calor úmido, por meio de uma autoclave a 121 °C durante 20 minutos (**Figura I.2**). Após a esterilização do meio, adicionou-se uma solução de streptomina (0,5%) e cloranfenicol (0,05 g L⁻¹), com o objetivo de inibir o crescimento bacteriano e favorecer o isolamento de culturas fungicas. Os tubos foram mantidos em BOD durante 24 h nas temperaturas de 35 e 45 °C.

Após 24 horas de incubação, o material líquido foi transferido por esgotamento em estria, para as placas de Petri contendo o meio nutriente correspondente (±20 mL de meio por placa), acrescido de 1,0% de palha de milho triturado (< 1 mm Ø), ou 1,0% de papelão triturado (< 1 mm Ø) e 1,5% de Agar.

Figura I.2. Tubos de ensaio contendo 0,5 g de solo em meio nutriente líquido contendo papelão triturado (< 2mm Ø) usado para indução e isolamento de culturas fúngicas.



Fonte: Próprio autor

As placas foram incubadas em BOD nas mesmas temperaturas de isolamento. As avaliações para verificar o surgimento de colônias fúngicas se deu até com 7 dias de incubação. As culturas puras foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio nutriente e Agar Saboraund Dextrose (ADS) comercial composto por $10,0 \text{ g L}^{-1}$ peptona microbiológica, $40,0 \text{ g L}^{-1}$ g dextrose e $15,0 \text{ g L}^{-1}$ ágar. O meio ADS foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante, aquecido para homogeneização do Agar, distribuído em tubos de ensaio que foram autoclavados em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Após esterilização os tubos foram inclinados em um suporte até a completa solidificação do gel. Após o desenvolvimento das culturas fúngicas no tubo, estes foram armazenados em temperatura ambiente para serem usados nos ensaios de produção enzimática.

3.3 Preparo dos reagentes

3.3.1 Solução estoque de micronutrientes

A solução de micronutriente foi utilizada para compor o meio nutriente, para manutenção das culturas no repique das culturas. Esta solução foi preparada na concentração de 100 vezes, e foi composta por 5 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 mg L^{-1} de CaCl_2 . Estes nutrientes foram diluídos em 10 mL de água destilada, e a solução resultante armazenada em recipientes de vidro com capacidade de 50 mL, esterilizada e armazenada em geladeira. Um mililitro da solução foi utilizado para cada 100 mL de meio de cultivo de forma a manter as mesmas concentrações.

3.3.2 Solução nutriente

A solução nutriente utilizada no processo de fermentação em estado sólido para fornecer micronutrientes para o micro-organismo e manter a umidade inicial no frasco de cultivo em torno de 75%. A solução foi preparada com os constituintes apresentados na 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,03% uréia, e ajustou-se o pH a 5,0 (**Tabela I.2**). Os nutrientes foram pesados em balança analítica e diluídos em 100 mL de água destilada. A solução foi transfrida para frascos Erlenmeyers, esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos, e armazenada em geladeira. Essa solução foi preparada somente quando do procedimento de cultivo.

Tabela I.2. Composição da solução nutriente utilizada no processo de fermentação em estado sólido, para cultivo dos isolados da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense.

Componentes da solução nutriente	Concentração (g 100 mL ⁻¹)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,14
K_2HPO_4	0,20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
Uréia	0,03

pH = 5,5

Fonte: Próprio autor.

3.3.3 Tampão Acetato

Para obter cerca de 100 mL de solução de tampão acetato, preparou-se solução de ácido acético a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, adicionando-se sob agitação constante 0,350 mL de ácido acético em 30 mL de água e reservou. Para preparar a solução de acetato de sódio anidro a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pesou-se 1,64 g de acetato de sódio anidro, dissolvendo-o em 100 mL de água com apoio de um bastão de vidro, até sua completa dissolução (**Tabela I.3**). Para o ajuste em pH 5,5 foi utilizado medidor de pH digital, onde o ácido acético foi adicionado lentamente e sob agitação constante sobre a solução de acetato de sódio, até atingir o pH desejado. A solução tampão acetato pH 5,5 foi mantida em geladeira e frasco âmbar.

Tabela I.3. Composição da solução de tampão acetato a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada para determinação do açúcar redutor total.

Componentes da solução de tampão acetato	Concentração
Ácido Acético ou ácido etanoico (CH_3COOH) – 99%	$11,5 \text{ mL L}^{-1}$
Acetato de sódio anidro (CH_3COONa)	$16,4 \text{ g L}^{-1}$
pH 5,5	

Fonte: Próprio autor

3.3.4 Solução de Ácido 3,5-dinitrossalicílico - DNS

Para o preparo da solução de DNS (MILLER, 1959; **Tabela I.4**), o tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em metade da água deionizada com agitação, em uma câmara de fluxo, seguido pelo hidróxido de sódio. Separadamente, dissolve o ácido 3,5-dinitrossalicílico em pouca água destilada e, quando estiver dissolvido, adicionar à mistura acima. Transferir a solução para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume. Colocar em frasco âmbar e enrolar o frasco em papel alumínio. Armazenar em temperatura ambiente, não pode ser armazenado em geladeira porque sob refrigeração há formação de precipitados.

Tabela I.4. Composição dos reagentes para a solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) utilizada para determinação do açúcar redutor.

Componentes	Concentração (g L^{-1})
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	10,0
Hidróxido de Sódio – NaOH	16,0
Tartarato de Sódio e Potássio – $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	300,0

Fonte: Miller (1959).

3.3.5 Solução de carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC, Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de 4,0% em solução tampão acetato a 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5. Foi pesada em balança de precisão 4,0 g de CMC e adicionado 50 mL de solução tampão, essa mistura sem ser homogeneizada, foi mantida em geladeira por 48 h. Após esse período, foi adicionado mais 50 mL de solução tampão e realizada a homogeneização da solução até a sua completa dissolução, com o auxílio de agitador magnético.

3.3.6 Solução de avicel e xilana

As soluções de avicel e xilana (Sigma-Aldrich) foram preparadas na concentração de 1,0%. Adicionou-se 1,0 g do substrato em 100 mL da solução de tampão acetato a 0,1 mol L⁻¹. A solução de xilana foi mantida sob agitação para homogeneização. Ambas foram conservadas em geladeira e colocadas sob agitação no momento de sua dispensa nos tubos de ensaio reacionais.

3.3.7 Soluções para determinação de proteína total

Para determinação de proteínas totais, foi adotado o método Hartree-Lowry, uma modificação do método de Lowry proposta por Lowry, (1972). Para o método são necessários três soluções, denominadas de reagentes A, B e C os quais sua composição está listadas na **Tabela I.5**. Para o reagente A, prepara-se uma solução 1 N de NaOH com metade do volume final da solução (500 mL), em seguida, os outros dois reagentes são dissolvidos nessa solução, após completa homogeneização, transfere-se para um balão volumétrico de 1.00 mL e ajusta-se o volume final da solução. Para o reagente B, prepara-se 10 mL de solução 1 N de NaOH, dissolve-se os demais reagentes independentemente em um pouco de água, após dissolução de todos os reagentes, transfere-se todos para um balão volumétrico de 100 mL, ajusta-se o volume. Os reagentes A e B devem ser armazenados em frasco de plástico por até 3 meses a temperatura ambiente. O reagente C, não pode ser estocado, deve sempre ser preparado no momento da realização da reação na proporção de 1 parte de Folin Ciocalteu para 15 partes de água destilada.

Tabela I.5. Composição das soluções utilizados no método Hartree-Lowry para determinação do teor de proteína total.

Reagente A		
Componente	g L ⁻¹	Concentração Final
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	2,0	7 mM
Carbonato de sódio Na ₂ CO ₃	100	0,81 mol L ⁻¹
Hidróxido de sódio 1N NaOH	19,995 g em 500 mL	0,5 N
Reagente B		
Componente	g 100 mL ⁻¹	Final
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	2,0	7 mM
Sulfato cúprico pentahidratado CuSO ₄ .5H ₂ O	1,0	0,04 mol L ⁻¹
Hidróxido de sódio 1N NaOH	0,399 g em 10 mL	0,1 N
Reagente C – Comercial		
Componente	Concentração%	
Folin Ciocalteau (Sigma)	6,25	
Sensibilidade: 100 – 600 µg mL⁻¹ (amostra de 0,5 mL)		

Fonte: Hartree (1972).

3.3.8 Preparo dos substratos agrícolas e agroindustriais

Os substratos utilizados fonte de carbono indutora das enzimas xilanase e celulase estão dispostos na **Tabela I.6**. O bagaço de cana-de-açúcar foi proveniente de uma mesma safra, gentilmente fornecido pela Usina Santa Adélia, situada no município de Ilha Solteira-SP. O sabugo de milho, palha de milho, palha de cana-de-açúcar e casca de arroz foram cedidos pela Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da UNESP Campus de Ilha Solteira, situada no município de Selvíria-MS. O farelo de trigo foi adquirido no mercado local.

Tabela I.6. Origem e dimensões dos substratos utilizadas no processo de fermentação para cultivo dos isolados fúngicos.

	Fontes de Carbono		Origem¹	Dimensões
1	Farelo de Trigo	FT	Comércio local	< 5 mm
2	Palha de Cana-de-açúcar	PC	FEPE-UNESP	~ 20 mm
3	Palha de Milho	PM	FEPE-UNESP	~ 20 mm
4	Palha de Milho Fina	PMf	FEPE-UNESP	< 2 mm Ø
5	Bagaço de Cana-de-açúcar	BC	Usina Santa Adélia	~ 30 mm
6	Bagaço de Cana + Farelo de trigo	BC+FT	-	-
7	Sabugo de Milho	SM	FEPE-UNESP	~ 10 mm
8	Sabugo de Milho fino	SMf	FEPE-UNESP	< 2mm Ø
9	Sabugo de Milho + Farelo de trigo	SM+FT	-	-
10	Casca de arroz	CAz	FEPE-UNESP	~ 5 mm

Fonte: Próprio autor.

A redução da matéria vegetal da palha de cana, palha de milho e do sabugo de milho em partículas foi por meio de um triturador de forragens e grãos, que reduzia os materiais vegetais em partículas menores que 20 mm de comprimento. A palha de milho e o sabugo de milho foram testadas e separadas em 2 granulometrias diferentes, selecionando as frações retidas em peneira de 10 (2 mm) e 20 mesh (0,84 mm).

A casca de arroz foi reduzida com o auxílio de um liquidificador industrial, em partículas menores de 5 milímetros de comprimento. O bagaço de cana-de-açúcar foi peneirado, e as partículas maiores que 30 mm foram retiradas e os aglomerados desfeitos manualmente no momento da pesagem (**Figura I.3**). Após redução em dimensões que variaram de 1 a 30 mm de diâmetro, os substratos foram submetidos a diversas lavagens sob água corrente para retirada de açúcares, amidos e possíveis detritos e cinzas presentes. Ensaio para açúcar redutor total foram realizados durante o processo de lavagem para verificar a retirada dos açúcares livres no substrato.

Após a lavagem, estes substratos foram expostos ao ar livre por 24 horas, para que o excesso de água fosse liberado, secos em estufas a 60 °C por 48 horas e deixados a temperatura ambiente até o total resfriamento. Os substratos foram acondicionados em sacos plásticos e depositados em câmara de armazenamento, com temperatura de 12 ± 3 °C e umidade relativa (UR) de $25 \pm 3\%$.

Figura I.3. Monte de bagaço de cana-de-açúcar no pátio da Usina de açúcar e álcool Santa Adélia (à esquerda) e o bagaço lavado e seco em estufa (à direita).



Fonte: Próprio autor.

3.4 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) foi adotada como forma de cultivo para o estudo de produção enzimática. O processo fermentativo foi conduzido em frascos

Erlenmeyer 250 mL, contendo 5 g de substrato e 10 mL de solução nutriente descrita na (Tabela I.2). O substrato utilizado nos ensaios iniciais foi o farelo de trigo. Ambos foram esterilizados separadamente em autoclave a 121 °C por 20 minutos, e após resfriamento, o meio foi inoculado com 5 discos (0,5 diâmetro) da cultura fúngica com crescimento de 72 horas em placa de Petri com Agar Saboraund Dextrose. Utilizou-se um bastão de vidro para homogeneização do inóculo e da solução nutriente no substrato, e em seguida, os frascos Erlenmeyer foram incubados em estufas nas temperaturas de 35 °C e 45 °C por 96 h.

Após esse período de fermentação, a solução enzimática foi extraída pela adição de 50 mL de água deionizada em cada frasco. O material fermentado foi suavemente homogeneizado usando um bastão de vidro (Figura I.4), e em seguida, levado a agitação em Shaker a 100 ciclos/minutos por 1 h a temperatura ambiente. Com um funil e tecido sintético a suspensão foi filtrada, e centrifugada a 10.000 x g, na temperatura de 5 °C durante 15 minutos. A solução enzimática obtida foi acondicionada em frascos âmbar, e realizadas as reações para determinação de proteína e das atividades enzimáticas para xilanase, CMCase e avicelase.

Figura I.4. Fases do processo de extração do extrato enzimático produzido por isolados. Maceração, centrifugação e armazenamento em tubos de vidro.



Fonte: Próprio autor.

3.5 Efeito da fonte de carbono

Foram analisadas as atividades enzimáticas para xilanase e celulase e os isolados fúngicos que apresentaram maiores atividades foram selecionados para os estudos de produção enzimática. Oito isolados nomeados por WPPM 145, WPPM 145B, WPPM 151, WPPM 152, WPPM 421A, WPPM 511, WPPM 622 e WPPM 92 (Tabela I.7). Foram selecionados para os ensaios de efeito da fonte de carbono, os quais foram cultivados em 6 diferentes substratos. O fungo filamentoso *Trichoderma asperelloides* F22, cedido da coleção do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP Campus de São José do Rio Preto-SP foi usado como cultura controle para comparação dos resultados obtidos entre os isolados. Os isolados WPPM 145 e WPPM 511 foram analisados em duas temperaturasde

crecimento 35 °C e 45 °C por apresentar similaridade nas atividades verificadas nos processos fermentativos anteriores.

3.6 Determinação de açúcar redutor total - ART

Para determinação das concentrações de ATR, seguiu-se o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Tal método baseia-se na redução em meio alcalino do 3,5-dinitrosalicilato (coloração amarela), o produto formado é estável e tem coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) e encontra-se com sua máxima absorção no comprimento de onda a 540 nm. Esse método foi adotado para avaliar a presença de açúcar redutor nos substratos que deram início ao processo fermentativa e na quantificação de açúcar redutor liberado nas reações enzimáticas para xilanase, avicelase e CMCCase.

Tabela I.7. Local de coleta temperatura de cultivo e isolados fúngicos selecionados a partir do solo da região do Pantanal Sul-mato-grossense.

	Isolado	Localização		Temperatura
		S	W	
1	WPPM 145B	19° 57' 10.1"	56° 20' 02.2"	35 °C 45 °C
2	WPPM 151	19° 57' 10.1"	56° 20' 02.2"	45 °C
3	WPPM 152	19° 57' 10.1"	56° 20' 02.2"	35 °C
4	WPPM 421A	19° 53' 58.1"	56° 20' 02.2"	35 °C
5	WPPM 511	19° 53' 58"	56° 17' 42.1"	35 °C 45 °C
6	WPPM 622	19° 53' 04.1"	56° 17' 58.7"	35 °C
7	WPPM 92	19° 57' 092"	56° 18' 30.4"	35 °C
8	<i>T. asperelloides</i> F22	IBILCE-UNESP		30° C

Fonte: Próprio autor.

3.6.1 Determinação de atividade enzimática

Nas reações para quantificar as atividades para xilanase, carboximetilcelulase (CMCase) e avicelase, utilizou-se os substratos xilana “beerchwood” (Sigma-Aldrich) e carboximetilcelulose(Sigma-Aldrich) e avicel (Sigma-Aldrich). Os substratos reacionais foram preparados em tampão acetato a 0,1 mol L⁻¹ e pH 5,5 como descrito nos itens 3.3.5 e 3.3.6.

Os microensaios foram realizados em duplicata em tubos de ensaio contendo 225 µL do substrato reacional e, em seguida, adicionou-se 25 µL da solução enzimática. A mistura reacional foi incubada em banho-maria com temperatura controlada em 55 °C por 10 minutos.

A reação foi interrompida com adição de 250 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Após esse processo, os tubos foram transferidos para banho de água em ebulição por 10 minutos, e posteriormente, foi transferido para banho de gelo para resfriamento imediato por 5 minutos (BRIENZO et al., 2009). Em cada tubo foi adicionado 2,5 mL de água deionizada e agitado para uma completa homogeneização. Na reação controle, a enzima foi adicionada após a adição do reagente DNS, para não ocorrer reação enzimática. No tubo branco o volume da solução de substrato reacional + volume da enzima (250 μ L) foram substituídos por água e em seguida o reagente (MILLER, 1959).

De cada amostra um volume de 200 μ L foi utilizado para leitura em placas de leitura de espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A cinética obtida foi utilizada para a obtenção de uma unidade de atividade de xilanase, CMCase e avicelase. Uma unidade (IU) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de xilose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de xilose. Uma unidade (IU) de atividade de CMCase e avicelase foram definidas como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de glicose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de glicose. Quando necessário, diluições seriadas das amostras foram preparadas, para que a absorbância resultante estivesse contida no intervalo da curva analítica.

3.7 Determinação do Teor de Proteína Total

O processo reacional iniciou-se com a adição de 500 mL amostra de proteína em 450 mL do reagente A em tubos de ensaios que foram incubados em banho por 10 minutos a 50 °C, e resfriado a temperatura ambiente. Em sequência, adicionou-se 50 μ L do reagente B, e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar o processo, adicionou-se 1,5 mL do reagente C em cada tubo, e incubou-se em banho por 10 minutos a 50 °C, e resfriou-se a temperatura ambiente. Após homogeneização, 200 μ L da solução foram utilizadas para as leituras de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. Para o branco da amostra, a proteína foi substituída por igual volume de água. Diluições seriadas das amostras foram preparadas sempre que necessário, de modo que a absorbância resultante estivesse contida no intervalo da curva analítica preparada com solução de soro albumina bovina (0-300 μ g mL⁻¹)

3.7.1 *Determinação de atividade específica*

A determinação da atividade específica foi obtida pela divisão da atividade enzimática (U mL^{-1}) pelo teor de proteína total (mg mL^{-1}), como consta na Equação 1.1.

$$\text{Ativ. Específica} = \frac{\text{Ativ. Enzimática (U mL}^{-1}\text{)}}{\text{Teor de Proteína (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad (1.1)$$

3.8 **Análise dos dados**

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 10 x 10, sendo 10 para efeito de isolado, sendo que, dos 8 isolados, 2 foram testados nas temperaturas de 35 e 45 °C, e 10 para efeito de substrato. Foram calculados os efeitos estimados das variáveis analisadas e as médias comparadas por meio do teste de Tukey (5%), utilizando o programa estatístico computacional SAS®.

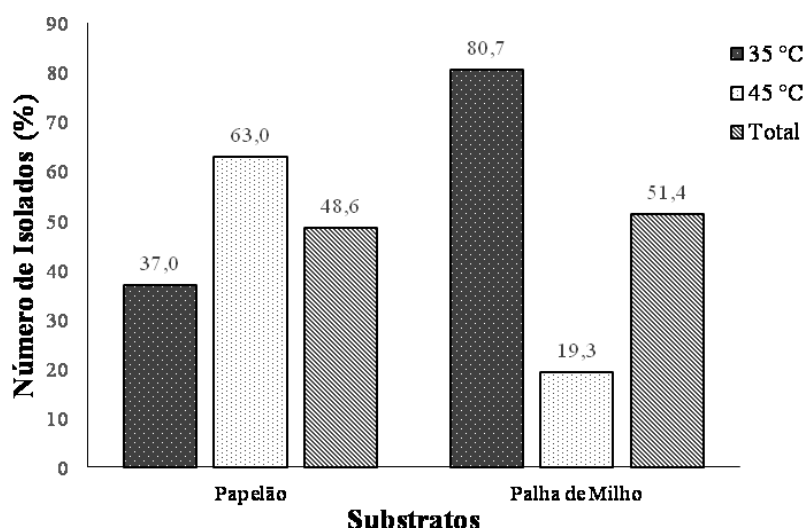
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O isolamento de espécies fúngicas a partir de amostras de solo da região do Pantanal totalizou 111 isolados, onde 99% deles possuíam habilidade em expressar celulases e xilanase. O meio líquido de isolamento enriquecido com palha de milho (**Tabela I.8**) e papelão (**Tabela I.9**) como fonte de carbono mostrou-se como bom indutor no desenvolvimento de espécies com potencial celulolítico e xilanolítico.

4.1 **Avaliação do substrato indutor**

Pode-se observar que 51,4% dos isolados foram obtidos em cultivo tendo a palha de milho como substrato indutor, e 48,6% em cultivo com papelão triturado (**Figura I.5**). A definição do substrato indutor apropriado é um fator importante para a obtenção de xilanase (HALTRICH et al., 1996), pois os fungos podem produzir concomitantemente outras enzimas celulolíticas que sofrem influência de parâmetros mínimos no bioprocessamento (POLIZELLI et al., 2005; BARATTO et al., 2011).

Figura I.5. Relação de isolados obtidos das amostras de solo da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, utilizando meio nutriente de isolamento o papelão triturado e palha de milho como substrato indutor de crescimento, nas temperaturas de 35 e 45 °C, por 96 horas.



Fonte: Próprio autor.

O papelão utilizado no experimento é composto por várias combinações de capa de papéis e miolo, com qualidade ou tipo (ondulado ou não) e resistência física diferentes. A matéria prima para produção do papelão pode ser papelão e papéis reciclados, ou aqueles originados pela fibra celulósica. Pode-se dizer que o papelão passa por um pré-tratamento, que tem como propósito, remover parte da lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos (SINGHANIA et al., 2009). Ma et al. (2016) citam que no processo de tratamento da poupa kraft, os teores de lignina reduzem mais de 5 vezes, o que pode ter facilitando assim a ação de enzimas produzidas pelos isolados.

Da mesma forma que existe o incentivo para aumentar as taxas de reciclagem de papel, a legislação brasileira e internacional impõe limites quanto a utilização de papéis reciclados que contenham contaminações decorridas pela forma de descarte, coleta e manuseio deste material (VIDAL, 2015). Ma et al. (2016) verificaram a composição química de dois materiais a serem reciclados, papel fino e papelão, e inicialmente o papelão continha cerca de 16,6% de lignina, 57,6% de celulose e 20,8% de hemicelulose, após cozimento kraft clássica, a lignina residual foi reduzida em 2,9%, a celulose em 80,2%, a hemicelulose em 16,6%. Os autores relatam que ambos os materiais continham uma quantidade considerável de íons metálicos, a altos níveis de cálcio, silício, magnésio, e alumínio que são introduzidas principalmente durante o processo de produção de pasta e fabricação do produto.

Tabela I.8. Atividades xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas por linhagens isoladas em áreas do Pantanal Sul-mato-grossense, tendo a palha de milho como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.

Isolados 35 °C	Atividade Enzimática			PROT mg mL ⁻¹	Isolados 35 °C	Atividade Enzimática			PROT mg mL ⁻¹
	XIL	CMC	AVIC			XIL	CMC	AVIC	
				<i>U g⁻¹</i>					
WPPM 111	7,15	5,04	0,00	14,59	WPPM 414	9,47	6,83	1,95	13,80
WPPM 111A	42,00	9,43	0,00	2,80	WPPM 421A	166,18	13,01	0,00	16,16
WPPM 111B	20,70	13,66	0,00	5,23	WPPM 424	159,42	4,72	0,00	16,94
WPPM 112	47,71	11,54	0,00	4,87	WPPM 511	204,83	18,70	1,46	3,94
WPPM 121	28,49	11,38	0,00	5,73	WPPM 622	279,23	6,99	0,00	9,01
WPPM 131	8,50	8,78	0,00	12,87	WPPM 711	182,61	14,63	1,30	7,37
WPPM 143	93,72	12,03	0,00	18,01	WPPM 811	153,62	35,45	0,00	8,01
WPPM 144	112,08	1,63	4,72	21,59	WPPM 812	249,28	8,78	10,57	15,09
WPPM 145	137,20	15,45	0,00	20,09	WPPM 813	243,48	20,00	0,00	17,73
WPPM 211	38,26	2,28	0,00	12,09	WPPM 82	152,66	19,02	0,00	11,37
WPPM 212	21,26	4,39	3,25	20,09	WPPM 821	245,41	6,67	14,96	15,73
WPPM 214	5,22	4,72	1,95	13,66	WPPM 823A	146,86	8,78	0,00	8,59
WPPM 221	7,34	12,36	2,60	25,44	WPPM 823B	146,86	4,88	0,00	9,59
WPPM 222	6,38	3,90	3,90	18,44	WPPM 824	124,64	15,61	8,29	12,30
WPPM 223	10,82	5,53	0,00	18,94	WPPM 826	72,46	12,85	0,00	6,23
WPPM 224	9,28	8,62	3,09	12,80	WPPM 913	93,72	14,63	6,34	7,66
WPPM 231	18,94	6,02	0,00	24,09	WPPM 92	287,92	50,41	9,76	6,37
WPPM 232	22,22	16,10	0,00	9,09	WPPM 922	614,49	107,32	5,37	9,37
WPPM 321B	14,49	8,62	0,00	18,44	WPPM 11.1.1	21,22	4,39	0,00	7,80
WPPM 322A	14,88	12,36	0,00	17,80	WPPM 11.1.2	30,05	13,33	5,04	5,51
WPPM 322B	8,89	7,48	2,11	11,59	WPPM 11.2.1	42,26	15,77	8,13	9,51
WPPM 41	8,50	9,27	13,01	14,01	WPPM 11.2.2	48,75	12,85	1,46	5,66
WPPM 413	11,59	4,23	2,28	14,51	WPPM 12.2.1	154,13	16,75	0,00	10,37
					<i>Média</i>	98,37	13,63	2,42	12,41
Isolados 45 °C	Atividade Enzimática			PROT mg mL ⁻¹	Isolados 45 °C	Atividade Enzimática			PROT mg mL ⁻¹
	XIL	CMC	AVIC			XIL	CMC	AVIC	
				<i>U g⁻¹</i>					
WPPM 151	303,12	38,21	0,00	6,01	WPPM 423	43,67	13,33	0,00	10,51
WPPM 152	445,97	31,71	0,00	16,01	WPPM 514	41,74	9,92	1,95	6,87
WPPM 213	39,40	14,31	0,00	5,37	WPPM 621	2,90	9,11	0,00	4,73
WPPM 242	11,01	11,38	31,87	5,51	WPPM 915	73,43	7,64	0,00	16,23
WPPM 243	34,01	15,61	0,00	20,73	WPPM 1212	28,49	3,25	2,44	9,80
WPPM 252	15,85	12,85	1,63	15,44	<i>Média</i>	94,51	15,21	3,44	10,66

Fonte: Dados do próprio autor.

Tabela I.9. Atividades xilanase (XIL), CMCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) produzidas isolados da áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, tendo papelão triturado como indutor de crescimento. Fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, cultivado à 35 e 45 °C, por 96 horas.

Isolados 35 °C	Atividade Enzimática			PROT <i>mg mL⁻¹</i>	Isolados 35 °C	Atividade Enzimática			PROT <i>mg mL⁻¹</i>
	XIL	CMC	AVIC			XIL	CMC	AVIC	
	<i>U g⁻¹</i>				<i>U g⁻¹</i>				
WPPP 152B	25,38	0,00	4,55	98,71	WPPP 912A	38,62	19,02	14,47	83,71
WPPP 231	20,18	7,64	0,00	32,29	WPPP 912B	29,53	5,37	5,20	73,71
WPPP 244C	5,38	33,17	1,79	141,57	WPPP 913	38,62	25,37	5,37	100,86
WPPP 321	26,42	16,59	0,00	65,86	WPPP 923	50,05	13,50	1,79	141,57
WPPP 41	36,03	22,11	2,44	56,57	WPPP 1111B	32,91	8,62	0,00	177,29
WPPP 413	4,60	10,73	4,72	58,00	WPPP 1112	25,64	1,63	5,20	125,86
WPPP 511	16,03	3,74	3,09	82,29	WPPP 1113	22,78	11,87	1,63	86,57
WPPP 62	37,01	13,33	3,09	95,14	WPPP 1121	42,52	15,77	21,14	140,14
WPPP 814B	22,26	9,27	0,00	37,29	WPPP 1122	77,84	5,69	3,41	139,43
WPPP 911	36,03	16,26	0,00	35,14	WPPP 1123	30,31	4,72	0,00	128,71
	<i>Média</i>					30,94	12,61	4,10	9,33
Isolados 45 °C	Atividade Enzimática			PROT <i>mg mL⁻¹</i>	Isolados 45 °C	Atividade Enzimática			PROT <i>mg mL⁻¹</i>
	XIL	CMC	AVIC			XIL	CMC	AVIC	
	<i>U g⁻¹</i>				<i>U g⁻¹</i>				
WPPP 121	17,84	6,34	10,57	143,71	WPPP 2451	14,99	13,17	5,53	126,57
WPPP 121A	31,09	9,43	0,49	132,29	WPPP 245A	17,58	6,83	0,00	120,14
WPPP 131	11,87	4,39	10,41	153,71	WPPP 252	51,61	16,10	0,98	335,86
WPPP 132A	19,14	8,94	1,46	125,86	WPPP 2611	10,05	4,72	0,00	129,43
WPPP 152	39,40	15,45	12,52	159,43	WPPP 311B	11,09	7,64	0,00	176,57
WPPP 1613	10,57	5,04	0,00	125,86	WPPP 312	16,29	8,62	3,58	88,71
WPPP 211	21,74	8,78	3,74	108,71	WPPP 3211	21,22	11,71	4,39	129,43
WPPP 212	18,36	24,07	14,80	112,29	WPPP 3212	23,82	13,33	0,00	130,14
WPPP 213	12,39	21,79	4,39	117,29	WPPP 4122	12,13	6,02	0,00	40,14
WPPP 2142	25,38	9,76	0,00	85,14	WPPP 413B	22,78	12,68	0,00	103,71
WPPP 221	13,69	13,17	6,83	100,86	WPPP 512	21,74	12,03	0,00	101,57
WPPP 222	15,51	8,46	6,34	120,14	WPPP 6612	18,10	9,76	15,28	143,71
WPPP 231	20,96	9,76	4,88	123,00	WPPP 911	19,66	10,73	8,13	86,57
WPPP 242	40,18	13,98	0,00	203,71	WPPP 912B	64,86	10,73	37,56	95,14
WPPP 2433	27,19	10,41	0,00	85,14	WPPP 1131	13,69	6,99	3,74	89,43
WPPP 243A	15,25	9,43	0,00	120,86	WPPP 11231	25,12	14,15	0,00	154,43
WPPP 244B	41,48	11,22	1,46	313,71	WPPP 11233	4,86	1,46	0,33	135,86
	<i>Média</i>					22,11	10,50	4,63	18,21

Fonte: Dados do próprio autor.

As celulasas são enzimas que precisam ser induzidas a palha de milho utilizada no meio se mostrou um bom indutor de crescimento principalmente pelas suas características químicas, apresentando cerca de 30,88% de hemicelulose, 51,53% de celulose e 17,59% de lignina (HOSRT, 2013), e sua base elementar é de 44,8% de carbono, 6,8% de hidrogênio, 0,3

de nitrogênio, 0,1 de enxofre, 47,9 de oxigênio, apresentando uma alta relação C/N, cerca de 149,3 (RAMOS-PAULA et al., 2011). A escolha do indutor deve ser criteriosa, por ser um dos itens que mais geram custos na produção industrial de enzimas vendo que a palha de milho e a folha do milho são resíduos que estão disponíveis em grande escala, correspondendo a 41% de toda biomassa do milho produzida por hectare (BRASIL, 2012), portanto seu uso pode ser interessante.

Uma remoção eficiente da lignina otimiza a sacarificação enzimática, pois esta limita a taxa de hidrólise, atuando como um escudo, impedindo a hidrólise eficiente do substrato, além de adsorver proteínas a partir de soluções aquosas, quando esta encontra-se condensada (YANG; WYMAN, 2004). No processo inicial de isolamento, poucos parâmetros reacionais são utilizados, evitando assim, gastos desnecessários com uso de produtos e reagentes com micro-organismos pouco eficientes no processo de produção de enzimas de baixa atividade hidrolítica. Após isso, é realizada a otimização do meio de cultura e das condições de crescimento do fungo com o intuito de maximizar a produção de enzimas (LEVIN et al., 2008; DESWAL et al., 2011; WANG et al., 2012).

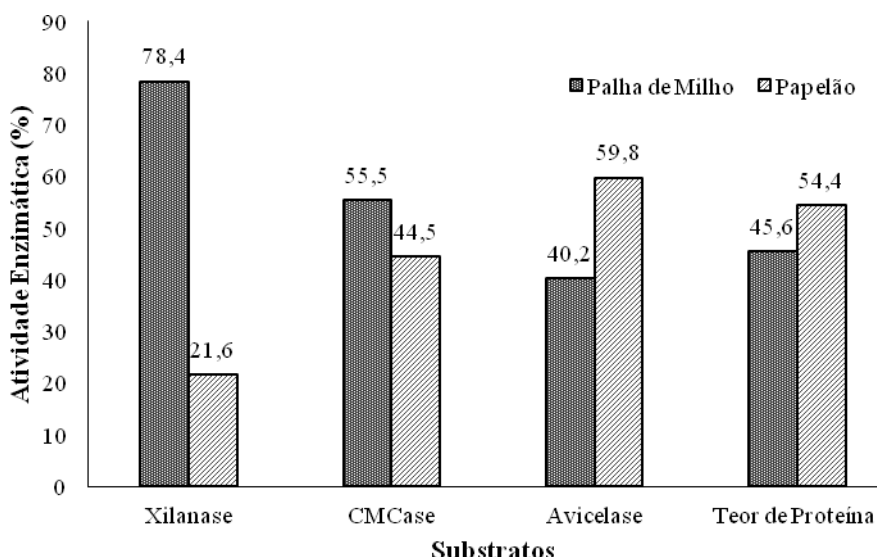
A FES utilizada neste processo é citada por autores por sua vantagem de não necessitar das etapas de concentração já que o extrato é cerca de 3 a 4 vezes mais diluído que a fermentação submersa e, quando então, sobrevenha a perspectiva de sua aplicação biotecnológica, e por gerar um menor volume de resíduo, entre outras vantagens (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Identificando os isolados mais eficientes na produção de enzimas, melhores condições reacionais podem ser inseridas no processo, como diferentes faixas de pH e de temperatura, podendo assim caracterizar o amplo perfil enzimático que estas possam apresentar (POLIZELLI et al., 2005; BARATTO et al., 2011). O crescimento de isolados foi mais expressivo na temperatura de 45 °C quando utilizou-se o papelão como substrato indutor, no entanto o inverso aconteceu, quando o substrato indutor de crescimento foi a palha de milho, sendo maior o número de manifestações fúngicas a 35 °C.

O farelo de trigo utilizado no processo de fermentação em estado sólido é a fonte de carbono mais utilizada em processos de fermentação em estado sólido (PANDEY et al., 2000; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011; HU et al., 2011), por induzir uma ampla variedade de enzimas celulolíticas, possui um adequado balanço entre carbono e nitrogênio, rico em vitaminas do complexo B, e sua eficiente capacidade de reter água. A composição química do farelo de trigo também induz o crescimento de micro-organismos, por conter uma quantidade considerável de açúcares solúveis, tais como glucose (42,5%), xilose (15,4%), arabinose (3,1%), galactose (2,7%) (LEQUART et al., 1999).

4.2 Atividade enzimática dos isolados

Analisou-se a produção de enzimas pelos isolados em geral, obtendo-se a média (%) de atividade de xilanases, CMCCase e avicelase e teores de proteína dos fungos isolados em meios contendo palha de milho e papelão como indutores de crescimento (**Figura I.6**). Silva (2014) estudando perfil de produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução, em biorreator de bancada (Bioflo 110), a 500 rpm, 28 °C, pH 5,0, comparou a lactose, xilana, pectina, celulose microcristalina, melação, biomassa de palma forrageira e hidrolisado hemicelulósico, onde a xilanase foi a enzima mais evidente nos cultivos com xilana, atingindo valor máximo de 11,93 U mL⁻¹, e 4,0 U mL⁻¹ de CMCCase, em 50 horas de cultivo. A xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste em uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil, unidos por ligações β-1,4-glicosídicas (SILVA, 2010; KUHAD et al., 2011; DEUTSCHMAN; DEKKER, 2012)

Figura I.6. Atividades médias geral para xilanase (XIL), CMCCase (CMC), avicelase (AVIC) e teor de proteína (PROT) das solução enzimáticas produzidos por isolados em áreas do Pantanal Sul-Mato-Grossense, usando palha de milho papelão no ‘screening’. Fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, à 35 °C e 45 °C, por 96 horas.



Fonte: Próprio autor.

Alves-Prado et al. (2010) realizaram uma triagem de bactérias e fungos da região do Cerrado Sul-mato-grossense, onde identificaram fungo *Neosartorya spinosa* que obteve atividade de 20,6 U mL⁻¹ de xilanase e 0,15 U mL⁻¹ de CMCCase tendo o farelo de trigo como substrato a 35 °C. Valores superiores a este foi obtido com isolado WPPM 922 com atividade

de 61,45 U mL⁻¹, e 10,73 U mL⁻¹ e 0,54 U mL⁻¹ de xilanase, CMCase e avicelase, respectivamente (**Tabela I.8**), fermentado em farelo de trigo, em 96 h de fermentação a 35 °C. Entretanto, este valor é semelhante quando se avalia a produção do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, por 96 h a 50 °C, com produção de 64 U mL⁻¹, 30 U mL⁻¹ e 1,5 U mL⁻¹ de xilanase, CMCase e avicelase, respectivamente.

Valores superiores foram obtidos por Pereira et al., (2015), que isolando fungos de matéria orgânica identificaram o fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e *Myceliophthora* sp. DABM 23/45, que apresentaram as maiores atividades de xilanase (931,11 e 712,21 U g⁻¹) na mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), a 45 °C por 96 h. Sendo que o isolado WPPM 922 obteve atividade de 614,5 U g⁻¹, em farelo de trigo sem pré-tratamento, mostrando seu potencial em comparação a outros experimentos (**Tabela I.10**).

Pirota et al. (2015), isolando fungos da região da floresta Amazônica, avaliaram o potencial de 40 isolados em FES, durante 10 dias a 35 °C. O isolado *Aspergillus oryzae* P6B2 obteve produção de xilanase de 1.076,94 U g⁻¹ em 72 horas de cultivo em farelo de trigo com solução nutriente modificada. Uma atividade próxima foi obtida por Delabona et al. (2012), quando os autores iniciaram o isolamento dos mesmos fungos relatados, obtendo 1055,62 U g⁻¹ pelo isolado *Aspergillus fumigatus* P40M2. O gênero *Trichoderma* é o mais importante gênero de fungos filamentosos na produção de enzimas em escala industrial, seguindo do gênero *Aspergillus*, sendo o *A. niger* e *A. oryzae* os dois fungos mais importantes a nível mundial para aplicações tecnológicas (BHAT, 2000; HU et al., 2011).

Tabela I.10. Comparação de dados da literatura, sobre as produções de xilanase e carboximetilcelulase, obtidas por fungos cultivados em farelo de trigo sob fermentação em estado sólido.

Fungo	Xilanase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i> 195	2.335	GAFFNEY et al. (2009)
<i>Myceliophthora</i> sp	128,9	BADHAN et al. (2007)
<i>Aspergillus japonicus</i> C03	155,50	FACCHINI et al. (2011)
Linhagem IP4-A2	190,0	SENNA (2014) – UNESP - CISA
<i>Trichoderma reesei</i> SAF3	210,0	KAR et al. (2013)
Isolado WPPM 922	931,95	Este trabalho
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	4.516	CHAPLA et al. (2010)
<i>Humicola brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	5.372	MASUI et al. (2012)
<i>Humicola lanuginosa</i>	5.977	KAMRA E SATYANARAYANA (2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.055,6	DELABONA et al. (2012)

Fungo	CMCase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Aspergillus japonicus</i> C03	19,38	FACCHINI et al. (2011)
<i>Myceliophthora</i> sp	26,6	BADHAN et al. (2007)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10,26	SHERIEF et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC7956	135,4	SUKUMARAN et al. (2009)
Linhagem IP 8-A1	5,90	SENNA (2014) - UNESP - CISA
<i>Aspergillus niger</i>	48,22	MATKAR et al. (2013)
<i>Trichoderma reesei</i>	68,57	DHILLON, et al. (2011)
<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	71.699	DESWAL et al. (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011 (Wild)	10.250	RAGHUWANSHI et al. (2014)
<i>Trichoderma asperellum</i> SR7 (Mutant)	13.129	
Isolado WPPM 622	155,73	Este trabalho

Fonte: Próprio autor.

O isolado WPPM 922 obteve os maiores valores de xilanase e CMCase entre os isolados avaliados. Xia e Cen (1999) obtiveram 128 U g⁻¹ de CMCase (148 h) em condições otimizadas de umidade e meio suplementar utilizando FES no substrato farelo de trigo com 70% de umidade pelo fungo *T. reesei*, considerado um dos melhores fungos celulolíticos. Esses valores são próximos ao obtido por este isolado, que obteve atividade de 107,3 U g⁻¹ de CMCase.

Mesmo considerando baixas as atividades de xilanase, comparado com outros experimentos, os isolados WPPM 912B (45 °C) e WPPM 242 (45 °C), mostraram altas atividades de avicelase, 37,56 U g⁻¹ e 31,81 U g⁻¹, respectivamente (**Tabela I.8**). Já na mistura de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 1:1, testada por Pereira et al. (2015) os fungos *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e *Myceliophthora* sp. DABM 23/45 obtiveram avicelase com atividade de 15,29 e 14,35 U g⁻¹ a 45 °C por 96 h. As avicelases obtidas por estes fungos mostram-se promissoras, por não haver nenhum incremento que otimize o processo, e esta atividade mostra-se significativa quando comparada com outros fungos citados na literatura (JATINDER et al., 2006).

As principais técnicas utilizadas para a obtenção de enzimas microbianas de interesse biotecnológico são a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido, sendo que esta última se sobressai por fornecer ao micro-organismo condições semelhantes ao seu ambiente de origem, já que a grande maioria destes se desenvolve sobre a superfície de biomassa lignocelulósica do solo ou na matéria orgânica do solo (HOLKER, et al. 2004). No entanto, ainda não há relatos na literatura, sobre aliar vantagens dos cultivos em fermentação sólida utilizando resíduos ou outro substrato na caracterização de micro-organismos da região do Pantanal e o seu potencial biotecnológico, principalmente na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

4.3 Efeito da fonte de carbono na produção xilanase

Os isolados foram considerados eficientes na produção das xilanases e CMCases quando comparados com o *T. asperelloides* F22. Todos os fatores e interação avaliados neste experimento foram significativos (**Tabela I.11**), onde é possível verificar que as maiores atividades de xilanase foi obtida por *T. asperelloides* F22, e pelo isolado WPPM 152, com atividades de 303,97 e 303,9 U g⁻¹, respectivamente.

O uso de espécies de fungos conhecidos por sua capacidade antagonista, como por exemplo, do gênero *Trichoderma* (SAMUELS, 2006; SAMUELS et al., 2010; SRIRAM et al., 2013) foram utilizados por pesquisadores e relatados na literatura (BARBOSA et al., 2001; SRIRAM; RAY, 2005; IRSHAD et al., 2013), onde examinaram as atividades das enzimas excretadas por *Trichoderma*, que é o um dos principais gêneros capazes de produzir enzimas de interesse agroindustrial (FANG; XIA, 2013), como por exemplo, o *Trichoderma reesei* (SRIRAM et al., 2009), outras espécies como *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. viride* e *T. asperelloides*. Estas espécies, além de serem agentes de biocontrole (SAMUELS, 2006; MORANDI; BETTIOL, 2009), são testadas quanto ao seu potencial na produção de celulases (SRIRAM; RAY, 2005; TIAN-QING et al., 2013).

O isolado WPPM 421A exibiu atividade média de xilanase de 242,94 U g⁻¹ de substrato, sendo esta agrupada no segundo maior grupo de médias da comparação desta variável, nas condições do experimento. Os menores valores médios de xilanase foi obtido pelo isolado WPPM 511, cultivado nas temperaturas de 35 e 45 °C, com atividades média de 61,16 e 47,41 U g⁻¹, respectivamente. O isolado, quando cultivado a 45 °C, não mostraram médias significativa na probabilidade de 5% na atividade de xilanase e teor de proteína.

A temperatura de fermentação mostrou efeito significativo sobre a produção de xilanase de *Thermomyces lanuginosus* 195, que aumentou sua atividade conforme o acréscimo da temperatura, apresentando atividade de 52 U g⁻¹ a 25 °C, 210 U g⁻¹ a 30 °C e de 2192 U g⁻¹ a 45 °C (GAFFNEY et al., 2014). Certamente, organismos capazes de produzir hemicelulases e celulases termotolerantes para processos industriais, são preferíveis, pois na maioria das vezes é indispensável o uso de elevadas temperaturas para aumentar a solubilidade dos substratos e reduzir o risco de contaminação (WU et al., 2004; BAJPAI, 1997).

Quando se avalia o potencial dos fungos em excretar a enzima CMCase, o isolado WPPM 622 supera as demais, com atividade média de 62,65 U g⁻¹, seguido pelo fungo *T. asperelloides* com atividade de 35,93 U g⁻¹, e pelo isolado WPPM 151, que obteve atividade de 28,83 U g⁻¹. O isolado WPPM 151, cultivado na temperatura a 45 °C, foi um dos poucos organismos termofílicos selecionados para avaliar a produção enzimática neste experimento. Fungos filamentosos termotolerantes com potencial para síntese de hemicelulases e celulases destinadas a processos industriais, tem sido foco para pesquisas nos últimos anos, sendo o *Trichoderma reesei* um dos principais micro-organismos produtores de enzimas em escala industrial (MORETTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015).

Tabela I.11. Atividade xilanase, teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicos cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.

Subst.	WPPM 14.5B - 35 °C				WPPM 14.5B - 45 °C			
	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹
FT	3,55 ^{AB}	93,82 ^{AB}	9,38	2,719	2,91 ^{CD}	1,32 ^D	1,32	0,47 ^D
PC	3,09 ^{ABC}	110,86 ^{AB}	11,09	4,113	6,26 ^{AB}	3,42 ^{CD}	3,42	0,55 ^D
PM	2,95 ^{ABCD}	20,37 ^B	2,04	0,749	8,71 ^A	3,91 ^{CD}	3,91	0,45 ^D
PMf	4,19 ^A	17,84 ^B	1,78	0,431	8,80 ^A	3,86 ^{CD}	3,86	0,43 ^D
BC	0,13 ^D	73,52 ^{AB}	7,35	55,636	1,54 ^D	22,04 ^B	22,04	14,67 ^{ABC}
BC+FT	1,43 ^{ABCD}	322,79 ^A	32,28	23,970	3,90 ^{BCD}	7,23 ^{CD}	7,23	1,88 ^{CD}
SM	0,36 ^{CD}	248,12 ^{AB}	24,81	85,846	2,50 ^{CD}	51,14 ^A	51,14	19,30 ^A
SMf	0,98 ^{BCD}	54,90 ^{AB}	5,49	6,219	3,03 ^{CD}	50,31 ^A	50,31	18,56 ^{AB}
SM+FT	2,68 ^{ABCD}	105,83 ^{AB}	10,58	3,953	4,58 ^{BC}	8,27 ^{CD}	8,27	1,82 ^{CD}
CAz	1,02 ^{BCD}	336,88 ^A	33,69	35,191	2,96 ^{CD}	16,22 ^{BC}	16,22	4,73 ^{BCD}
Média	2,04	138,49	13,85	21,88	4,52	16,77	16,77	6,28
EPM.	0,16	19,45	1,95	5,58	0,15	0,75	0,75	0,79
P	<0,01*	0,025*	-	0,068 ^{ns}	<0,01*	-	-	<0,01*
Subst.	WPPM 511 - 35 °C				WPPM 511 - 45 °C			
	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹
FT	6,625 ^{ABC}	33,20 ^C	3,32	0,335 ^B	2,21	33,70	3,37	1,515 ^B
PC	6,185 ^{ABC}	40,06 ^C	4,00	0,65 ^B	3,65	64,99	6,50	1,740 ^{AB}
PM	7,225 ^{AB}	21,22 ^C	2,12	0,29 ^B	3,57	13,30	1,33	0,435 ^B
PMf	8,47 ^A	22,65 ^C	2,26	0,265 ^B	3,97	16,94	1,70	0,405 ^B
BC	0,855 ^D	20,32 ^C	2,03	2,875 ^B	1,72	19,40	1,94	1,900 ^{AB}
BC+FT	2,285 ^{BCD}	36,94 ^C	3,69	1,62 ^B	2,19	65,12	6,51	5,075 ^{AB}
SM	2,05 ^{CD}	269,74 ^A	26,97	13,27 ^B	1,40	43,17	4,32	3,170 ^{AB}
SMf	3,18 ^{BCD}	33,04 ^C	3,34	1,07 ^A	1,73	31,74	3,17	1,855 ^{AB}
SM+FT	2,64 ^{BCD}	42,65 ^C	4,27	1,6 ^B	2,18	87,20	8,72	8,050 ^A
CAz	2,48 ^{BCD}	91,79 ^B	9,18	3,72 ^B	1,69	99,15	9,92	6,605 ^{AB}
Média	4,199	61,158	61,16	2,569	2,42	47,416	47,42	3,08
EPM	0,285	2,29	2,29	0,222	0,189	8,803	0,88	0,35
P	<0,01	<0,01*	-	<0,01*	0,09	0,398 ^{ns}	-	<0,01*
Subst.	WPPM 92 - 35 °C				WPPM 421A - 35 °C			
	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹	PROT mg mL ⁻¹	Xilanase U g ⁻¹ U mL ⁻¹		AESP U mg ⁻¹
FT	5,23	29,67 ^B	2,97	0,58 ^B	10,21	428,84 ^B	42,88	4,20 ^{BC}
PC	7,97	7,20 ^B	0,72	0,16 ^B	4,48	155,91 ^C	15,59	3,55 ^{BC}
PM	12,23	20,31 ^B	2,03	0,30 ^B	9,30	19,02 ^C	1,90	0,22 ^C
PMf	7,09	14,34 ^B	1,43	0,45 ^B	5,88	33,24 ^C	3,32	0,59 ^C
BC	5,26	44,34 ^B	4,43	1,69 ^{AB}	2,78	40,57 ^C	4,06	1,47 ^C
BC+FT	7,14	17,33 ^B	1,73	0,43 ^B	5,41	10,00 ^C	1,00	0,28 ^C
SM	5,23	43,04 ^B	4,30	1,96 ^{AB}	2,38	47,33 ^C	4,73	2,04 ^C
SMf	6,68	42,52 ^B	4,25	1,13 ^{AB}	5,33	35,40 ^C	3,54	0,67 ^C
SM+FT	5,92	179,34 ^A	17,93	5,06 ^{AB}	6,45	727,13 ^A	72,71	13,16 ^B
CAz	3,92	147,53 ^A	14,75	7,42 ^A	2,21	931,95 ^A	93,20	42,12 ^A
Média	6,67	54,56	5,46	1,92	5,44	242,94	24,29	6,83
EPM	0,52	2,667	0,267	0,37	0,59	13,18	1,32	0,59
P	0,157 ^{ns}	<0,01*	-	0,018*	0,127 ^{ns}	<0,01*	-	<0,01*

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, PC: palha de cana, PM: palha de milho, PMf: palha de milho fina (<0,1 cm), BC: bagaço de cana, BC+FT: bagaço de cana + farelo de trigo (1:1), SM: sabugo de milho, SMf: sabugo de milho fina (1:1), SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1), CAz: casca de arroz. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si nas probabilidades de 5%* pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média, P: probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

Continuação da Tabela I.11.

Subst.	WPPM 152 - 35 °C				WPPM 151 - 45 °C			
	PROT	Xilanase		AESP	PROT	Xilanase		AESP
	mg mL ⁻¹	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	U mg ⁻¹	mg mL ⁻¹	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	U mg ⁻¹
FT	6,63 ^{BCD}	703,79 ^{AB}	70,38	10,91 ^B	9,23 ^{AB}	14,60 ^F	1,46	0,158 ^C
PC	8,57 ^B	69,21 ^C	6,92	0,81 ^C	6,66 ^{BCD}	45,25 ^{EF}	4,53	0,681 ^C
PM	7,64 ^{BC}	40,25 ^C	4,03	0,53 ^C	10,00 ^{AB}	49,79 ^{DEF}	4,98	0,498 ^C
PMf	11,38 ^A	7,72 ^C	0,77	0,07 ^C	11,34 ^A	24,47 ^F	2,45	0,219 ^C
BC	4,93 ^{CDEF}	71,61 ^C	7,16	1,46 ^C	1,17 ^E	110,09 ^{CDE}	11,01	9,601 ^{AB}
BC+FT	2,96 ^F	714,42 ^{AB}	71,44	24,34 ^A	7,26 ^{BC}	361,92 ^A	36,19	4,982 ^{BC}
SM	3,76 ^{EF}	84,08 ^C	8,41	2,25 ^C	2,65 ^E	319,77 ^A	31,98	12,495 ^A
SMf	5,38 ^{CDEF}	46,16 ^C	4,62	0,87 ^C	3,36 ^{DE}	121,30 ^{CD}	12,13	3,651 ^C
SM+FT	6,01 ^{BCDE}	517,53 ^B	51,75	8,59 ^B	9,06 ^{AB}	166,75 ^{BC}	16,68	1,842 ^C
CAz	4,03 ^{DEF}	784,27 ^A	78,43	19,59 ^A	3,86 ^{CDE}	196,17 ^B	19,62	5,187 ^{BC}
Média	6,13	303,90	30,39	6,93	6,46	141,01	14,10	39,31
EPM	0,16	12,06	1,21	0,31	1,99	4,19	0,42	3,16
P	<0,01 [*]	<0,01 [*]	-	<0,01	<0,01 [*]	<0,01 [*]		<0,01 [*]
Subst.	WPPM 622 - 35 °C				<i>Trichoderma asperelloides</i> - 30 °C			
	PROT	Xilanase		AESP	PROT	Xilanase		AESP
	mg mL ⁻¹	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	U mg ⁻¹	mg mL ⁻¹	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	U mg ⁻¹
FT	7,60 ^{CD}	84,17 ^D	8,42	1,13 ^D	6,915 ^{AB}	876,48 ^A	87,65	12,82 ^{AB}
PC	6,38 ^C	55,77 ^D	5,58	0,87 ^D	6,65 ^{ABC}	430,39 ^{BC}	43,04	6,98 ^{ABC}
PM	8,52 ^E	12,13 ^D	1,21	0,14 ^D	6,99 ^{AB}	10,05 ^D	1,01	0,15 ^C
PMf	10,85 ^{DE}	50,05 ^D	5,01	0,46 ^D	10,75 ^A	8,89 ^D	0,89	0,09 ^C
BC	1,19 ^E	31,09 ^D	3,11	3,68 ^{CD}	1,68 ^C	10,19 ^D	1,02	0,66 ^C
BC+FT	5,47 ^A	40,57 ^D	4,06	0,77 ^D	4,445 ^{BC}	392,20 ^{BC}	39,22	9,03 ^{ABC}
SM	2,22 ^{CD}	235,98 ^C	23,60	10,66 ^{AB}	2,355 ^{BC}	243,30 ^{CD}	24,33	10,78 ^{AB}
SMf	3,06 ^{CD}	289,87 ^{BC}	28,99	9,60 ^{AB}	1,675 ^C	42,47 ^D	4,25	3,46 ^{BC}
SM+FT	4,81 ^B	331,43 ^B	33,14	7,48 ^{BC}	4,17 ^{BC}	520,00 ^B	52,00	12,53 ^{AB}
CAz	3,06 ^B	432,54 ^A	43,25	14,13 ^A	3,24 ^{BC}	505,72 ^B	50,57	15,55 ^A
Média	5,31	156,34	15,63	4,89	4,89	303,97	30,40	7,20
EPM	0,21	5,18	0,518	0,31	0,22	14,29	1,43	0,56
P	<0,01 [*]	<0,01 [*]	-	<0,01 [*]	<0,01	<0,01 [*]	*	<0,01 [*]

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, PC: palha de cana, PM: palha de milho, PMf: palha de milho fina (<0,1 cm), BC: bagaço de cana, BC+FT: bagaço de cana + farelo de trigo (1:1), SM: sabugo de milho, SMf: sabugo de milho fina (1:1), SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1), CAz: casca de arroz. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si nas probabilidades de 5%* pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média, P: probabilidade.

Fonte: Próprio autor

Os substratos influenciaram na atividade da xilanase em seis dos oito isolados selecionados ($p < 0,05$). O substrato que mais induziu a produção de xilanase foi a casca de arroz (CAz), onde as maiores médias foram obtidas em 6 isolados testados, sendo sabugo de milho (SM) o segundo mais eficiente na indução desta enzima. Santana et al. (2012) relatam que fungos filamentosos possuem um mecanismo de controle de expressão de enzimas, que pode ser estimulada ou inibida pelo substrato utilizado no processo.

A casca de arroz pode ter diferentes composições químicas de acordo com o processamento e condições de condução da cultura, e como a maioria dos resíduos lignocelulósicos, possui a glicose como o principal açúcar, seguindo de xilose e arabinose (HOWARD et al., 2003). Por mais que alguns resíduos possam ser indutores na produção de determinadas enzimas, essas diferenças na composição química do arroz, como de outros

produtos lignocelulósicos, podem alterar a eficiência de algumas enzimas no processo de hidrólise (SAHA et al., 2005).

Falkoski et al. (2013) relatam que a biomassa lignocelulósica não pode ser sacarificada por enzimas com rendimentos elevados sem um processo de pré-tratamento, pois justificam a formação de um obstáculo formado pela lignina e a hemicelulose presentes na parede da célula vegetal que impedem uma ação eficiente das enzimas produzidas por micro-organismos. Este mecanismo dificulta a biodegradação, conferindo a planta uma resistência a ataque a micro-organismo e insetos, além de coesão à estrutura interna (FARINAS, 2010).

O isolado WPPM 421A apresentou as maiores atividades de xilanase, 931,95 e 727,13 U g⁻¹, tendo a CAz e a mistura de SM+FT (1:1), respectivamente, como substrato (Tabela I.11). O isolado WPPM 421A expressou maior habilidade em degradar os resíduos lignocelulósicos, pois analisando os efeitos dentro de cada isolado, a atividade da enzima xilanase por este isolado superou a obtida por *T. asperelloides* F22, que obteve valores atividade de xilanase de 876,48 U g⁻¹ no extrato enzimático bruto extraído do substrato FT. O farelo de trigo possui em sua composição altos níveis de proteínas (13-19%), celulose (10,86%) e hemicelulose (28,8%), e um teor baixo de lignina (3-6%), que fazem com que este seja um bom indutor de celulasas e hemicelulasas (FALKOSKI et al., 2013; SUKUMARAN et al., 2009; SINGHANIA et al., 2009).

Atividades de xilanases consideráveis, também foram obtidas pelos isolados WPPM 152 e WPPM 622, que obtiveram valores médios de xilanases em CAz, de 784,27 e 432,54 U g⁻¹, respectivamente. Altos valores de atividade de xilanase são relatados por pesquisadores quando fontes de carbono são resíduos da agroindústria, ou colheita. Chapla et al. (2010) e Nagar et al. (2012) obtiveram altas atividades de xilanase quando o farelo de trigo foi utilizado como substrato. A PM, em ambas as granulometrias, e o BC foram os substratos que menos induziram a produção da enzima xilanase pelos isolados analisados. Esta enzima apresentou, entre os isolados, atividades média de 24,56, 23,47 e 64,15 U g⁻¹ nos substratos PM, PMf e BC, respectivamente.

Em trabalho realizado por Terone (2013) a granulometria influenciou a produção de xilanases pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, nos experimentos com o bagaço de cana-de-açúcar, interferindo também no crescimento micelial, mas pouco afetou a produção de enzima e o crescimento do fungo nos ensaios com bagaço de cevada. A maior atividade enzimática foi verificada com o bagaço de cana-de-açúcar (2 e 1 mm), obtendo-se produção de 4,23 U mL⁻¹. Os demais tratamentos, com o bagaço de cana-de-açúcar, maiores que 2 mm e entre 1 e

0,35 mm, apresentaram atividades menores com valores de 1,79 e 2,85 U mL⁻¹, respectivamente.

Pereira et al. (2015) isolando fungos de matéria orgânica, identificaram *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e *Myceliophthora* sp. DABM 23/45, que apresentaram as maiores atividades de xilanase (931,11 e 712,21 U g⁻¹, respectivamente) na mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), a 45°C, por 96 h. Neste trabalho, valores próximos foram obtidos usando esta mesma mistura o isolado WPPM 152, cultivado a 35 °C, obteve-se atividade de xilanase de 714,42 U g⁻¹, o *T. asperelloides* F22 (30 °C), com 392,20 U g⁻¹ e o isolado WPPM 151 (45 °C), com 361,92 U g⁻¹.

O *Trichoderma asperelloides* F22 produziu xilanase em BC com atividade de 10,19 U g⁻¹ e, Mayrink (2010) avaliando um isolado de *Trichoderma* sp. T02 em cultivo no bagaço de cana-de-açúcar, alcançou valor superior ao encontrados neste trabalho, com o pico de atividade de xilanase de 30,0 U g⁻¹. Como o bagaço de cana apresenta altos teores de celulose e hemicelulose, cerca de 46,62% e 26,52% respectivamente, sua utilização como fonte de carbono é dificultada pela presença de lignina (21,7%) e baixo teor proteico (1,52%). Uma estratégia para melhorar a produção de enzimas, é por meio da mistura de substrato que fornecem nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento de micro-organismos e simulam as condições do habitat natural de fungos filamentosos (RODRIGUEZ-ZUNICA et al., 2011).

As misturas SM+FT e BC+FT testadas apresentaram influência moderada quando se analisa os isolados separadamente, onde cada mistura induziu 3 diferentes isolados às maiores produções de xilanase (**Tabela I.11**). O isolado WPPM 421A e o fungo *T. asperelloides* produziram 727,13 e 520,00 U g⁻¹ de xilanase, respectivamente, quando o substrato utilizado era a mistura SM+FT. Atividades de xilanase superiores a esta foram obtidas por Betini et al. (2009), após testarem a mesma mistura com *Aspergillus niger* (794,7 U g⁻¹), *A. niveus* (652,6 U g⁻¹) e *A. ochraceus* (752,6 U g⁻¹), testados em FES por 96 h a 30 °C. Os autores citam que houve um incremento de 20% na atividade quando se utilizou esta mistura para o *Aspergillus niger* e *A. ochraceus*. No entanto, para o *A. niveus*, este incremento não aconteceu. O mesmo aconteceu para o *T. asperelloides* F22, que mostrou 40,1% de incremento na atividade da enzima xilanase neste experimento, quando cultivado apenas no farelo de trigo.

Dos isolados fúngicos originais da região da floresta Amazônica e estudados por Delabona et al. (2012) e Pirota et al. (2015), o fungo *Aspergillus oryzae* P6B2 apresentou em farelo de trigo atividade de xilanase de 1.076,94 U g⁻¹ (PIROTA et al., 2015) e o isolado *Aspergillus fumigatus* P40M2, 1.055,62 U g⁻¹ (DELABONA et al., 2012) a 35 °C, em 72

horas, quando iniciaram o isolamento dos fungos desta região e na mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), a atividade foi de 821,52 U g⁻¹.

Soni et al. (2010) obtiveram atividade xilanase de 1.722 e 1.024 U g⁻¹, quando utilizaram farelo de trigo e palha de trigo, respectivamente, por um isolado de *Aspergillus fumigatus*. Monte et al. (2010), cultivando *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo, bagaço de cana e palha de cana, obtiveram xilanases com atividade de 1.315,9; 9.780 e 1.679,8 U g⁻¹, respectivamente. Valores próximos foram obtidos por Moretti et al. (2012), com produção de 1.292 U g⁻¹ (192 h) e 1.040 U g⁻¹ (144 h), por meio dos isolados *Aspergillus fumigatus* M.7.3 e M.7.1 cultivados na mistura de farelo de trigo e bagaço de cana (1:1), sem pré-tratamento, e utilizando a palha de milho, a produção de xilanase foi de 7.238 U g⁻¹.

O farelo de trigo é uma fonte de carbono bastante utilizada nos experimentos de hidrólise da biomassa lignocelulósica (BETINI et al., 2009), tanto em FES ou em fermentação em meio líquido (BON et al., 2008). A composição química do farelo de trigo induz o crescimento de micro-organismos por conter uma quantidade considerável de açúcares solúveis, tais como glucose (42,5%), xilose (15,4%), arabinose (3,1%), galactose (2,7%) (LEQUART et al. 1999). Como a FES se caracteriza pelo crescimento microbiano e a formação de produto na superfície do substrato na ausência da água livre, é viável empregar produtos como o farelo de trigo, bagaço de cana, entre outros resíduos de interesse, onde há a utilização direta do produto fermentado bruto (LEQUART et al., 1999; PANDEY et al., 2000).

A xilanase obtida pelo isolado WPPM 511 sob fermentação na temperatura de 35 °C, apresentou maior atividade quando se utilizou o substrato SM, tendo 259,74 U g⁻¹ de substrato. A atividade da xilanase e o teor de proteína resultante da fermentação na temperatura a 45 °C, produzida pelo isolado não foi significativa. O isolado WPPM 145B também foi testado nas duas temperaturas e, produziu enzimas com maiores capacidades hidrolíticas a 45 °C, com valores de 336,88 e 322,79 U g⁻¹ em CAz e BC+FT, respectivamente.

4.4 Efeito da fonte de carbono na produção CMCase

O efeito de diferentes materiais de subprodutos agroindustriais na produção de CMCase por isolados e por *T. asperelloides* F22 foi avaliado. Os dados de produção de CMCase (**Tabela I.12**), revelaram que estes fungos foram capazes de crescerem e produzirem esta enzima em todos os materiais selecionados para este experimento. No entanto, a atividade

da CMCase é variável dependendo do tipo de material do subproduto agroindustrial, provavelmente devido a variações na composição dos carboidratos. As maiores atividades de CMCase foram obtidas em CAZ, foi superior em 4 isolados avaliados. No entanto, este valor poderá ser melhorado com o estudo de diferentes tipos de pré-tratamentos, sendo eles físicos, químicos ou enzimáticos, em diferentes resíduos lignocelulósicos (LEE, 1997).

O isolado WPPM 622 foi estatisticamente superior aos demais na produção da enzima CMCase, com atividade de $155,73 \text{ U g}^{-1}$, seguindo os isolados WPPM 421A e WPPM 151 ($45 \text{ }^\circ\text{C}$) com atividades médias de $60,61$ e $60,05 \text{ U g}^{-1}$ respectivamente. A atividade da enzima CMCase foi comparativamente mais baixa quando a fermentação ocorreu com a palha de milho como substrato, possivelmente devido a alguma repressão ou a presença de um fator de inibição do substrato ou, ainda, o tamanho da granulometria e umidade do substrato. Ademais, que a solução enzimática produzida por meio deste substrato apresentou os maiores valores no teor de proteína, em ambas as granulometrias, sendo necessário realizar outros testes, como por exemplo amilase ou α -amilase (SAHA et al., 2005).

A granulometria de um substrato utilizado deve dar condições suficiente para que existam espaços entre as partículas, para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (SANCHEZ, 2009). Por isso, é necessário mensurar o teor de água dos processos fermentativos onde a granulometria do substrato seja reduzida a $<0,10 \text{ mm}$, para que este seja adequado, ao mínimo de permitir a formação de um filme de água na superfície e facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio.

Rodrigues-Zuniga et al. (2011), testando a produção de celulasas por *Aspergillus niger* em FES, em diferentes fontes de carbono, misturas e umidade do substrato, verificaram que apesar do bagaço de cana-de-açúcar apresentar alto valor de celulose (46,62%) e hemicelulose (26,51%), sua utilização como fonte de carbono é dificultada pela presença de lignina (21,7%), onde obteve altos valores de endoglucanase apenas quando este foi misturado com 60% de farelo de trigo, onde obteve um acréscimo de 26 vezes na atividade desta enzima ($8,0 \text{ U g}^{-1}$ frente $0,3 \text{ U g}^{-1}$) do valor obtido com 100% de bagaço de cana-de-açúcar. O farelo de trigo utilizado pelos autores continha cerca de 10,86% de celulose, 28,88% de hemicelulose, e apenas 4,89% de lignina, o que pode ter facilitado o processo de hidrólise, da mesma forma que a proteína contida no bagaço de cana-de-açúcar (1,52%) e cerca de 10 vezes menor que o encontrado no farelo de trigo (17,61%). Pereira et al. (2015), isolando fungos de matéria orgânica, obtiveram atividade de 357,51 e 314,27 de endoglucanase (CMC a 4%), por *Myceliophthora* sp. JCP 1-4 e *Myceliophthora* sp. DABM

23/45, quando fermentados por 96h na mistura de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (1:1).

Tabela I.12. Atividade carboximetilcelulase (CMCase), teor de proteína (PROT) e atividade específica (AESP), dos isolados fúngicos cultivados sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, por 96 horas.

Subst.	WPPM 1.4.5B, 35 °C						WPPM 1.4.5B, 45 °C							
	CMCase		PROT		AESP		CMCase		PROT		AESP			
	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹		
FT	0,3	2,99	ABC	3,55	AB	0,084	C	0,74	7,38	CD	2,91	CD	0,2565	BC
PC	0,22	2,22	ABCD	3,09	ABC	0,081	C	1,62	16,16	BCD	6,26	AB	0,258	BC
PM	0,07	0,69	D	2,95	ABCD	0,024	C	0,42	4,24	D	8,71	A	0,0485	C
PMf	0,07	0,65	D	4,19	A	0,016	C	0,56	5,56	D	8,80	A	0,064	BC
BC	0,13	1,31	CD	0,13	D	0,994	A	1,72	17,17	BCD	1,54	D	1,1185	ABC
BC+FT	0,40	3,96	A	1,43	ABCD	0,281	C	2,05	20,51	BC	3,90	BCD	0,5345	ABC
SM	0,25	2,49	ABCD	0,36	CD	0,743	AB	2,87	28,69	AB	2,50	CD	1,137	ABC
SMf	0,22	2,23	ABCD	0,98	BCD	0,241	C	4,04	40,41	A	3,03	CD	1,589	A
SM+FT	0,19	1,91	BCD	2,68	ABCD	0,070	C	2,41	24,14	B	4,58	BC	0,526	ABC
CAz	0,35	3,48	AB	1,02	BCD	0,366	BC	3,91	39,09	A	2,96	CD	1,323	AB
Média	0,22	2,19		2,04		0,289		2,03	20,33		4,52		0,071	
EPM.		0,11		0,16		0,022			0,82		0,15		0,686	
P		<0,01		<0,01*		<0,01			<0,01*		<0,01*		<0,01	
Subst.	WPPM 511, 35 °C						WPPM 511, 45 °C							
	CMCase		PROT		AESP		CMCase		PROT		AESP			
	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹		
FT	1,46	14,55	ABC	6,63	ABC	0,263	AB	2,47	24,65	AB	2,21	A	1,117	B
PC	1,03	10,31	BC	6,19	ABC	0,167	AB	1,37	13,64	BCD	3,65	A	0,377	BC
PM	1,07	10,67	BC	7,23	AB	0,145	AB	0,59	5,86	CD	3,57	A	0,121	BC
PMf	0,87	8,69	C	8,47	A	0,103	B	0,00	0,00	D	3,97	A	0	C
BC	0,86	8,59	C	0,86	D	1,158	A	1,02	10,20	BCD	1,72	A	0,866	BC
BC+FT	2,14	21,42	AB	2,29	BCD	0,960	AB	1,74	17,40	BC	2,19	A	0,795	BC
SM	1,10	11,01	BC	2,05	CD	0,550	AB	1,15	11,52	BCD	1,40	A	0,893	BC
SMf	1,15	11,52	BC	3,18	BCD	0,371	AB	1,47	14,65	BCD	1,73	A	0,852	BC
SM+FT	1,53	15,25	ABC	2,64	BCD	0,593	AB	1,51	15,06	BCD	2,18	A	0,689	BC
CAz	2,47	24,65	A	2,48	BCD	1,004	AB	3,77	37,68	A	1,69	A	2,262	A
Média	1,37	13,66		4,20		0,531		1,51	15,06		2,42		0,797	
EPM		0,649		0,285		0,058			0,96		0,189		0,062	
P		0,002*		<0,01*		0,014			<0,01*		0,09	ns	<0,01	
Subst.	WPPM 92, 35 °C						WPPM 421A, 35 °C							
	CMCase		PROT		AESP		CMCase		PROT		AESP			
	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹	UmL ⁻¹	U g ⁻¹	mg mL ⁻¹	U mg ⁻¹		
FT	2,50	24,95	A	5,23	A	0,51	AB	2,22	22,23	AB	10,21	A	0,21	A
PC	1,64	16,37	A	7,97	A	0,20	B	1,00	10,00	B	4,48	A	0,22	A
PM	1,59	15,86	A	12,23	A	0,13	B	0,89	8,89	B	9,30	A	0,08	A
PMf	0,65	6,47	A	7,09	A	0,15	B	0,75	7,48	B	5,88	A	0,14	A
BC	1,46	14,55	A	5,26	A	0,30	B	0,61	6,06	B	2,78	A	0,22	A
BC+FT	1,15	11,52	A	7,14	A	0,16	B	1,11	11,12	B	5,41	A	0,21	A
SM	2,09	20,91	A	5,23	A	0,43	AB	1,27	12,73	B	2,38	A	0,53	A
SMf	2,41	24,04	A	6,68	A	0,36	AB	0,88	8,79	B	5,33	A	0,19	A
SM+FT	1,82	18,19	A	5,92	A	0,33	B	6,06	60,61	A	6,45	A	1,07	A
CAz	3,51	35,05	A	3,92	A	0,88	A	2,23	22,33	AB	2,21	A	0,97	A
Média	1,88	18,79		6,67		0,35		1,70	17,02		5,44		0,39	
EPM		1,70		0,52		0,03			2,44		0,59		0,07	
P		0,117	ns	0,157	ns	<0,01			0,014		0,127	ns	0,07	ns

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, PC: palha de cana, PM: palha de milho, PMf: palha de milho fina (<0,1 cm), BC: bagaço de cana, BC+FT: bagaço de cana + farelo de trigo (1:1), SM: sabugo de milho, SM: sabugo de milho fina (1:1), SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1), CAz: casca de arroz. Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem entre si nas probabilidades de 5%* pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média, P: probabilidade.

Fonte: Próprio autor

Continuação da Tabela I.12.

Subst.	WPPM 152, 35 °C					WPPM 151, 45 °C				
	CMCase		PROT	AESP		CMCase		PROT	AESP	
	$U mL^{-1}$	$U g^{-1}$	$mg mL^{-1}$	$U mg^{-1}$		$U mL^{-1}$	$U g^{-1}$	$mg mL^{-1}$	$U mg^{-1}$	
FT	5,07	50,71 ^{AB}	6,63 ^{BCD}	0,82 ^{BC}		1,75	17,50 ^{DEF}	9,23 ^{AB}	0,192 ^{CD}	
PC	2,01	20,10 ^C	8,57 ^B	0,24 ^{CDE}		2,56	25,63 ^{CDE}	6,66 ^{BCD}	0,383 ^{BCD}	
PM	0,72	7,17 ^C	7,64 ^{BC}	0,10 ^{DE}		0,62	6,15 ^{EF}	10,00 ^{AB}	0,061 ^D	
PMf	0,34	3,43 ^C	11,38 ^A	0,03 ^E		0,00	0,00 ^F	11,34 ^A	0,000 ^D	
BC	1,85	18,48 ^C	4,93 ^{CDEF}	0,37 ^{BCDE}		3,68	36,77 ^{BCD}	1,17 ^E	3,199 ^A	
BC+FT	5,26	52,63 ^A	2,96 ^F	1,79 ^A		1,93	19,27 ^{DEF}	7,26 ^{BC}	0,267 ^{BCD}	
SM	2,25	22,53 ^C	3,76 ^{EF}	0,60 ^{BCDE}		3,08	30,84 ^{BCD}	2,65 ^E	1,199 ^{BCD}	
SMf	0,97	9,70 ^C	5,38 ^{CDEF}	0,18 ^{DE}		4,91	49,07 ^{AB}	3,36 ^{DE}	1,470 ^{BC}	
SM+FT	5,24	52,42 ^A	6,01 ^{BCDE}	0,87 ^B		4,26	42,61 ^{ABC}	9,06 ^{AB}	0,470 ^{BCD}	
CAz	2,64	26,36 ^{BC}	4,03 ^{DEF}	0,67 ^{BCD}		6,05	60,52 ^A	3,86 ^{CDE}	1,584 ^B	
Média	2,64	26,35	6,13	0,57		2,88	28,83	6,46	0,882	
EPM		1,38	0,16	0,04			1,27	1,99	0,078	
P		<0,01*	<0,01*	<0,01			<0,01*	<0,01*	<0,01	
Subst.	WPPM 622, 35 °C					<i>Trichoderma asperelloide</i> , 30 °C				
	CMCase		PROT	AESP		CMCase		PROT	AESP	
	$U mL^{-1}$	$U g^{-1}$	$mg mL^{-1}$	$U mg^{-1}$		$U mL^{-1}$	$U g^{-1}$	$mg mL^{-1}$	$U mg^{-1}$	
FT	3,66	36,56 ^{CD}	7,60 ^{ABC}	0,486 ^B		1,59	15,84 ^A	6,915 ^{AB}	2,27 ^A	
PC	4,92	49,17 ^C	6,38 ^{BCD}	0,781 ^B		2,31	23,13 ^A	6,65 ^{ABC}	3,33 ^A	
PM	2,01	20,11 ^E	8,52 ^{AB}	0,238 ^B		2,49	24,90 ^A	6,99 ^{AB}	3,66 ^A	
PMf	3,19	31,88 ^{DE}	10,85 ^A	0,294 ^B		3,29	32,92 ^A	10,75 ^A	2,91 ^A	
BC	1,91	19,07 ^E	1,19 ^F	1,61 ^{AB}		5,23	52,29 ^A	1,68 ^C	32,23 ^A	
BC+FT	15,57	155,73 ^A	5,47 ^{BCDE}	2,99 ^{AB}		4,10	41,04 ^A	4,445 ^{BC}	9,70 ^A	
SM	4,12	41,15 ^{CD}	2,22 ^{EF}	1,86 ^{AB}		3,04	30,42 ^A	2,355 ^{BC}	13,87 ^A	
SMf	4,31	43,13 ^{CD}	3,06 ^{DEF}	1,47 ^{AB}		3,66	36,56 ^A	1,675 ^C	35,76 ^A	
SM+FT	11,30	113,02 ^B	4,81 ^{CDEF}	2,538 ^{AB}		4,49	44,90 ^A	4,17 ^{BC}	10,91 ^A	
CAz	11,67	116,67 ^B	3,06 ^{DEF}	3,82 ^A		5,73	57,29 ^A	3,24 ^{BC}	17,56 ^A	
Média	6,27	62,65	5,31	1,67		3,59	35,93	4,89	13,21	
EPM		0,93	0,21	1,57			3,22	0,22	2,74	
P		<0,01*	<0,01*	<0,01*			0,218 ^{ns}	<0,01*	0,16 ^{ns}	

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, PC: palha de cana, PM: palha de milho, PMf: palha de milho fina (<0,1 cm), BC: bagaço de cana, BC+FT: bagaço de cana + farelo de trigo (1:1), SM: sabugo de milho, SMf: sabugo de milho fina (1:1), SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1), CAz: casca de arroz. Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem entre si na probabilidade de 5%* pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média, P: probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

Florencio (2011), realizando testes com a linhagem *Trichoderma reesei* RUT C30, em fermentação em estado sólido utilizando a mistura de BC+FT na proporção de 1:1, em diferentes umidades iniciais do substrato, concluiu que para a produção de CMCase pela linhagem, a melhor umidade inicial do substrato foi de 80%, considerando o desvio padrão de 2%. O autor enfatiza a redução da produção desta enzima quando a umidade inicial foi de 85%, pois está diretamente relacionada aos níveis de retenção de água dos substratos utilizados. No substrato com 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, as maiores atividades enzimáticas são observadas com 70 a 80% de umidade.

Avaliando o efeito do fator substrato em relação a atividade da CMCase produzida pelo isolado WPPM 622 e por *Trichoderma asperelloides* F22, observa-se que a CAz e o SM

acarretaram as maiores atividades desta enzima. Estes substratos foram expressivos quando se analisa a atividade específica dos isolados, verificando assim a eficiência no extrato enzimático obtido nestes tratamentos. O *Trichoderma asperelloides* F22 mostrou atividade de CMCase de 57,29 U g⁻¹ quando fermentado na casca de arroz, por 96 h. Valores menores a este foi citado por Raghuwanshi et al. (2014), onde relataram a utilização de uma estirpe mutante de *Trichoderma asperellum* SR1-7 sob condições otimizadas na degradação de farelo de trigo, e com atividade de CMCase de 9,2 UI g⁻¹, no período de 7 dias.

Vários substratos como por exemplo, resíduos da planta *Agave atrovirens*, espécie mexicana caracterizada por possuir folhas carnosas são reportados na literatura. Nava-cruz et al. (2016) realizaram pré-tratamento químico e térmico e testaram seu poder indutor na produção das celulasas com isolados e espécies do gênero *Trichoderma*, com atividades extremamente elevadas de endoglucanase (CMC à 1%), com 12.860,8 U g⁻¹ por um isolado de *Trichoderma asperellum* durante 216 h em biorreator de bandeja. Outro exemplo de elevadas atividades de CMCase foi obtida por Ncube et al. (2012), com farinha de pinhão-manso (*Jatropha curcas*), material gerado após a extração de óleo das sementes, suplementada com capim sapé (*Hyperrhaenia* sp.) e cloreto de amônio. As atividades máximas foram obtidas a pH inicial de 3, com atividade de CMCase de 3.974 U g⁻¹ (40 °C) e pH inicial de 5, com atividade de xilanase de 6.087 U g⁻¹ (25 °C).

Estudos otimizando a produção dos isolados testados neste trabalho tornam-se promissor quando comparado com dados da literatura. Verifica-se que a diversidade de substratos e resíduos agrícolas e agroindustriais que podem ser inseridos no processo, além de protocolos de pré-tratamentos (MORETTI et al., 2014) que visam facilitar a hidrólise por fungos para a produção de enzimas. Variáveis como o melhor substrato indutor de celulase e xilanase e do micro-organismo, efeitos sobre granulometria e influência da umidade e aeração no sistema, fonte de nitrogênio, pH e temperatura de cultivo, são as principais que influenciam na produção de enzimas em fermentação em estado sólido. Os isolados da região do pantanal Sul-mato-grossense, mostraram boa produtividade de enzimas, comparados a obtidos por pesquisadores da área, e sugere-se que teste com diferentes umidades e tratamento de substratos sejam realizados a fim de induzir uma maior produção de enzimas pelos isolados.

5 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a região é bastante promissora para seleção deste grupo de organismos, capazes de hidrolisar resíduos agroindustriais em FES na obtenção de enzimas celulolítica a xilanolítica.

A palha de milho induziu um maior número de isolados na temperatura de 35 °C, cerca de 80,7% dos isolados, e o papelão induziu a manifestação de um maior número de indivíduos a 45 °C, cerca de 63,0%.

O resíduo que mais induziu a produção da xilanase foi a casca de arroz.

A maior atividade de xilanase foi obtida por enzimas produzidas por *T. asperelloides* F22, e pelo isolado WPPM 152, com atividades de 303,97 e 303,9 U g⁻¹, respectivamente.

O isolado WPPM 622 foi o que apresentou a mais alta a produção da enzima CMCCase, com atividade de 155,73 U g⁻¹,

Os isolados foram considerados eficientes na produção das enzimas xilanases e CMCases quando comparados com o *T. asperelloides* F22, nas condições em que o experimento foi executado.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. O Pantanal Mato-Grossense e a teoria dos refúgios. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 9-57, 1988.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Carlos, v. 68, n. 4, p. 957-966, 2008.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. Biodiversidade do Pantanal: **Ecologia e conservação**. Campo Grande-MS: UNIDERP, 2005. 142 p.
- ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Cellulolytic Enzymes Isolated From Brazilian Areas: Characterization and Applications. In: GOLAN, A. E. (Org.). **Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses**, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. Cap. 6, p.183-210.
- 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. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 504-510, 2007.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Advance in applied Microbiology**, Maryland Heights, v. 43, p. 141-194, 1997.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11 n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 98-104, 2001.
- BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, E. S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, E. H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 32, p. 819–824, 2009.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M.

A.; COELHO, R. R. R. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008. p. 241-271.

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS JUNIOR, G.; KUROKAWA, A. S.; LEONERDECZ NETO, E.; KRÜGER, R. H.; Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture Welds. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 190, p. 129–139, 2008. DOI 10.1007/s00203-008-0374-6.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2011. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agroindustrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, p. 361–369, 2010.

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

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal Food Engineering**, London, v. 76, p. 291-302, 2006.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C.S.; RIBEIRO, M. S.; FREITAS, S. A.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.107, p.517–521, 2012.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.102, p. 6065–6072, 2011.

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DIAS, J. M. C. de S.; SOUZA, D. T. de S.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M. O.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2012a. 130 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/78690/1/DOC-13.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

DURIGAN, G.; MELO, A. C. G.; MAX, J. C. M.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de Cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011, 19p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Publicações on-line**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://cnpt.embrapa.br/i-mecan.htm>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 296-305, 2013.

FANG, H. E.; XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 44, p. 69, 2013.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO JUNIOR, A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FARINAS, C. S.; PIROTA, R. D. P. B.; FONSECA, R. F.; NETO, V. B. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. de M. et al. (Ed.) **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. P. 211-241. ISBN 978-85-7035-429-7

FLORENCIO, C. **Micro-organismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GAFFNEY, M.; DOYLE, S., MURPHY, R., Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Abingdon, v. 73, p. 2640–2644, 2009.

GOMES, E; SOUZA, S.R.; GRANDI, R.P. e DASILVA, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75-82, 2005.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresouce Technology**, Amsterdam, v.58, n.2, p.137-161, 1996.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 48, p. 422–427. doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2

HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004. ISSN 0175-7598.

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. Review. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 2, n. 12, p.602-619, 2003.

HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 65, p. 248-252, 2011.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-Industrial and municipal paper wastes. **BioResources**, Raleigh, v. 8, p. 145-157, 2013.

JATINDER, K.; CHADHA.; B.S.; SAINI. H. H.; Optimization of medium components for production of cellulases by *Melanocarpus sp.* MTCC 3922 under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 15–22, 2006.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Suita, v. 111, p. 121-127, 2011.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 24, p. 391-401, 2005.

JUNK, W. J.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Science**, Basel, v. 69, n. 3, p. 278-309, 2006.

KAR, S.; GAURI, S. S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; BISKASH, R. P.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on

the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess Biosyst Eng**, Heidelberg, v. 36, p. 57–68, 2013.

KERBER, B. B.; ROSA, A. L. Z.; GABAS, S. G.; LEME, J. M.; PACHECO, M. L. A. O registro fossilífero de metazoários ediacaranos na América do Sul e suas implicações nos estudos sobre origem e complexificação da vida. **Geologia USP**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 5-64, 2013.

KUHAD, R. C.; GRUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 1-10 p, 2011. Article ID 280696. doi:10.4061/2011/280696.

KAMRA, P.; SATYANARAYANA, T.; Xylanase production by the thermophilic mold *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Totowa, v. 119, n. 2, p. 145-157, 2004.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 133-140, 2003.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEQUART, C.; NUZILLARD, J. M.; KUREK, B.; DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 319, p. 102–111, 1999.

LEVIN, L.; HERRMAN, C.; PAPINUTTI, V.L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 39, p. 207–214, 2008.

LOPES, R. B.; BRITO, M. A. V. P. MELLO, S. C. M.; SAGGIN, O. J.; WENDLAND, A. Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade. In: SIMPÓSIO MICRO-ORGANISMOS EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. 161 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95339/1/DOC15-19-12-2013.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

MA, Y.; HUMMEL, M.; MÄÄTTÄNEN, M.; SÄRKILAHTI, A.; HARLIN, A.; SIXTA, H. Upcycling of waste paper and cardboard to textiles. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 18, p. 858-866, 2016.

MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A.L.R.L.; SOUZA, F.H.M; GUIMARÃES, L. H. S.; FURRIEL, R. P.M.; JORGE, J. A. Production of a xylose-stimulated b-glucosidase and a cellulase- free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, p. 2689–2701, 2012.

MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulasas na sacarificação da celulose**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MERCANTE, M. A.; RODRIGUES, S. C.; ROSS, J. L. S. Geomorphology and habitat diversity in the Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, supl. 1, p. 233-240, 2011.

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

MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; et al. Use of a mixture of thermophilic enzymes produced by the fungus *Thermoascus aurantiacus* to enhance the enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse cellulose. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, New York, v. 5, p. 468-476, 2010.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.07-14.

MORETTI, M. M. S; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R., RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 1062–1071, 2012.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. D. C. C; PERONE, O. M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, Kidlington, v. 122, p. 189–195, 2014.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading of bacteria using agro waste material. **Asian Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 5, p. 384-394, 2012.

- NAKUMURA, S. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**, New York, v. 7, p. 157-164, 2003.
- NAVA-CRUZ, N. Y.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR-GONZALEZ, M. A.; NUNCIO, A.; RODRIGUES-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. *Agave atrovirens* fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 115-127, 2016. doi:10.1007/s13205-016-0426-6
- NCUBE, T.; HOWARD, R.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 37, p. 118–123, 2012.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, p.742-756, 2009.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: 1-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: 1-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p.1153-1169, 2000.
- PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI-MARTINS, D. A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 118, p. 928-939, 2015.
- PIROTA, R. D. TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, set. 2015
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Biochem Microbiology**, Hoboken, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

- RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulose production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, Houston, v. 124, p. 183-189, 2014.
- RAMOS-PAULA, L. E.; TRUGILHO, P. F.; NAPOLI, A.; BIANCHI, M. L. Characterization of Residue from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237-246, abr./jun. 2011.
- RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.
- SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. Review Paper. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 30, p. 279-291, 2003.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, London, v. 100, p. 923-935, 2006.
- SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BON, M.; RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, p. 944-966, 2010.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 21, 85-94, 2009.
- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, [S. l.], v. 25, p. 188-193, 2012.
- SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophilic fungi from sugarcane bagasse and their prospecting for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 903-910, 2015.
- SHERIEF, A.A.; EL-TANASH, A.B.; ATIA, N. Cellulase Production by *Aspergillus fumigatus* Grown on Mixed Substrate of Rice Straw and Wheat Bran. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 5, 199-211, 2010.
- SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

SILVA, M. J. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução.** 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2014.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicas e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 31, p. 277-283, 2010.

SRIRAM, S.; MANASA, S. B.; SAVITHA, M. J. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. **Journal Biological Control**, Bangalore, v. 23, n.4, p.449-456, 2009.

SRIRAM, S.; RAY, R. C. *Trichoderma*: systematic and molecular taxonomy and application in agriculture and industry. In: Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture, (ed. RAY, R. C.), **Science Publishers**, New Hampshire, v.1, p.333–370, 2005.

SRIRAM, S.; SAVITHA, M. J.; ROHINI, H. S.; JALALI, S. K. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oli, n.4, p.gonucleotide barcode and morphological characters. **Current Science**, Jodhpur, v. 104, p. 1332-1340, 2013.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Schenectady, v. 32, p. 421-424, 2009.

TAO, Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, X. B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and properties of endoglucanase from a sugarcane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 10, p. 6126-6130, 2010.

TERRONE, C. C. **Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas.** 2013. 77f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

TIAN-QING, L.; DONG, W.; SHANG-TIAN, Y.; XIAOGUANG, L. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 133, p. 175–182, 2013.

VIDAL, A. C. F. O mercado de papelão ondulado e os desafios da competitividade da indústria brasileira. **Papel e Celulose**, [S. l], v. 35, p. 5-46, 2015.

VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes offer potential benefits in the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, New York, v.108, p.121–145, 2007.

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

WANG, W.; YUAN, T.; WANG, K.; CUI, B.; DAI, Y. Statistical optimization of cellulase production by the brown rot fungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass. **Process Biochemistry**, London, v. 47, p. 2552–2556, 2012.

WU, Y. B.; RAVINDRAN, V.; THOMAS, D. G.; BIRTLES, M. J.; W. H. ENDRIKS. Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. **British Poultry Science Journal Impact & Description**, Abingdon, v.45, p.385-394, 2004.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 86, p. 88-95, 2004.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, London, v. 34, p. 909–912, 1999.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

CAPITULO II - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS FUNGICOS DO BIOMA PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E POR *Trichoderma asperelloides* F22

RESUMO

Enzimas produzidas por micro-organismos têm sido amplamente utilizadas durante as últimas décadas, justificado por suas potencialidades e aplicações em diversos setores da indústria. Após analisar o potencial de 111 isolados fúngicos na produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas, oriundos do solo da região do Pantanal Sul-mato-grossense, os isolados WPPM 421A e WPPM 622 foram selecionados, juntamente com o *Trichoderma asperelloides* F22, para determinação do perfil de produção enzimática de xilanase e CMCase e, para caracterização físico-químicas de temperatura e pH da xilanase. A fermentação ocorreu tendo o farelo de trigo como substrato indutor, e apenas o isolado WPPM 421A foi testado com sabugo de milho e com a mistura de sabugo e farelo de trigo (1:1). O *Trichoderma asperelloides* F22 apresentou a maior atividade para a xilanase, e obteve pico de produção em 72 h ($606,23 \text{ U g}^{-1}$). O isolado WPPM 421A exibiu altas atividades para ambas as enzimas, tendo pico de produção em 96 h, com atividade de $547,27$ e $55,53 \text{ U g}^{-1}$, para a xilanase e CMCase, respectivamente. A enzima produzida por WPPM 421A, tendo o farelo de trigo como substrato, mostrou pH ótimo de 5,5, mas manteve sua atividade acima de 50% na faixa de pH 5-11. Quanto a termoestabilidade, o isolado WPPM 421A, quando cultivado em sabugo de milho, produziu xilanase mais termoestável, pois conservou sua atividade em até 60%, 12 horas após incubação, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, e manteve 50% de sua atividade após 1 h de incubação à $70 \text{ }^\circ\text{C}$. A enzima obtida por WPPM 421A quando cultivada pela mistura de SM+FT, apresentou termoestabilidade peculiar, mantendo 67,4% de atividade quando a reação ocorreu a $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Conclui-se que estas enzimas possuem potencial promissor para sua aplicação biotecnológica.

Palavras chaves: Endoglucanase. Meia-vida. Xilanase. Termoestabilidade.

**PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ENZYMES OBTAINED BY
ISOLATED FUNGAL FROM PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL STATE
AND BY *Trichoderma asperelloides* F22**

ABSTRACT

Enzymes produced by microorganisms has been widely used over the past decades, justified by its potential and applications in various sectors of industry. After analyzing the potential of 111 fungal isolates in the production of enzymes xylanolytic and cellulolytic, coming from the soil of the Mato Grosso do Sul Pantanal, the isolated WPPM 421A and WPPM 622 were selected with the *Trichoderma asperelloides* F22 to determine the enzymatic production profile of xylanase and carboxymethylcellulase and for physicochemical characterization, temperature and pH of the xylanase enzyme. Fermentation occurred with wheat bran as an inducer substrate, and only isolate WPPM 421A was tested with corn cob, and with a mixture of corn cob and wheat bran (ratio 1:1). The *Trichoderma asperelloides* F22 showed the highest activity for the xylanase, and achieved peak production at 72 h (606.23 U g⁻¹). Isolate WPPM 421A obtained high activities to both enzymes, with peak production at 96 h, the activity of 547.27 and 55.53 U g⁻¹ for xylanase and CMCase, respectively. The enzyme produced by WPPM 421A with wheat bran as substrate showed optimum pH of 5.5, but maintained its activity above 50% in the pH 5-11 range. The isolated WPPM 421A when grown on corn cob, produced more thermostable xylanase therefore retained its activity by 60% at 12 h after incubation at 60 °C and maintained 50% of its activity after 1 h of incubation at 70 °C. The enzyme obtained by WPPM 421A when cultivated by mixture of corn cob and wheat bran presented peculiar thermostability, while maintaining activity 67.4% when the reaction occurred at 90 °C. It was concluded that these enzymes have promising potential for their biotechnological application.

Keywords: Endoglucanase. Half-life. Xylanase. Thermostability.

1 INTRODUÇÃO

Entre os processos que agregam valor econômico a resíduos agrícolas e agroindústrias, podemos destacar os bioprocessos de conversão que resultam produtos de interesse industrial com o uso de micro-organismos (VILLAS-BOAS et al., 2002; LOPES et al., 2013). Os produtos mais visados pelo setor são o bioetanol, glicose e enzimas (LEATHERS, 2003; BADHAN et al., 2007), que podem advir de resíduos que são considerados uma expressiva fonte de energia renovável (POTHIRAJ et al., 2006), tornando-se uma nova matriz para a produção de tecnologias limpas por meio de materiais lignocelulósicos.

Diversos são os materiais lignocelulósicos capazes de induzir celulasas e xilanases, onde podemos citar o farelo de trigo, palha e casca de arroz, bagaço de cana e palha e, sabugo de milho (GIRIO et al., 2010; FALKOSKI et al., 2013). Estes resíduos lignocelulósicos agrícola e agroindustriais possuem uma resistência ao ataque químico ou bioquímico devido a sua composição físico-químico complexa, dificultando assim sua conversão em materiais com alto valor agregado (ZHANG; LYND, 2004; CHAMPAGNE, 2008).

Composta por cadeias fortemente alinhadas e ligadas entre si, a celulose é formada por cadeias lineares de D-glicose com ligações β - (1 \rightarrow 4), que a torna cristalina, resistente, estável e pouco acessível ao ataque enzimático. Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose, um complexo de enzimas formado por endoglucanases, exoglucanases e β -D- glicosidases devem agir concomitantemente, e quando produzidas por fungos, apresentam um processo oneroso e baixa eficiência hidrolítica (ZHANG et al., 2006).

Fatores ambientais como temperatura de incubação, pH do meio, tempo de cultivo, concentração do inóculo inicial e a qualidade do substrato utilizado influenciam diretamente na atividade metabólica microbiana e, conseqüentemente, a produção da enzima, já que deve haver a degradação do material lignocelulósico para sua manutenção e acesso a nutrientes necessários a sua existência (SANCHEZ, 2009).

A desnaturação térmica de uma enzima pode ser reversível ou irreversível (NAKANISHI, et al. 1994; KELLY; PRINCE, 1997; ROSETO, 2011), de acordo com a sua natureza proteica e sua estabilidade em temperaturas próximas a 40 °C permite sua aplicação em vários setores da indústria, como por exemplo na indústria de bebidas, panificação, produção de xilooligossacarídeos, rações animais e degradação de resíduos vegetais para a produção de etanol (TERRONE, 2013). Esta variedade de processos biotecnológicos em que

as enzimas podem ser úteis, faz com que incrementem estudos sobre sua estabilidade e estado ótimos de pH e temperatura (BAJPAI, 1997).

A escolha do material definido como substrato de cultivo deve ser apropriada para obtenção do sucesso na produção de xilanases porque este além de ser fonte de carbono e energia, também serve para acionar o processo de indução enzimática, por meio de compostos químicos que nele se constitui (HALTRICH et al., 1996). Dois tipos de processo fermentativo são utilizados para a produção de enzimas, mas mais da metade de todas as enzimas industriais são produzidas por fermentação submersa (FSm), e mais de 90% das celulases também são obtidas por este método (HOLKER et al., 2004).

Quando se cultiva fungos filamentosos, a fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado mais vantajosa pois plágia o ponto de origem desses micro-organismos, e proporciona uma maior produtividade quando comparada a fermentação submersa (FSm). O processo de FES produz enzimas com mais vantagens que o FSm, por possuírem maior estabilidade a alterações do processo, como as variações de temperatura e pH, e produzem menor volume de efluentes, além da possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono e energia (HOLKER et al., 2004; FARINAS et al., 2014).

O desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para a produção de xilanases visando aumento da produtividade, e da escala de produção e redução dos custos de obtenção tem sido muito frequente na literatura. As pesquisas objetivam buscar novos micro-organismos eficientes na produção de enzimas, identificar meios de cultivo e substratos para o processo fermentativo, buscar substratos de baixo custo a alta disponibilidade, determinar condições ótimas para cultivo dos micro-organismos e a estabilidade das enzimas envolvidas em processos biotecnológicos.

As xilanases são utilizadas no branqueamento de polpas de celulose, e é crescente seu uso nas indústrias de papel e celulose, um dos setores que mundialmente possui uma das maiores movimentações econômica (BRACELPA, 2016). Assim, com o intuito de atender a demanda da indústria, é essencial que haja a prospecção de novos micro-organismos e o aprimoramento das enzimas produzidas por eles, tanto nos processos fermentativos como no uso da engenharia genética e de proteínas.

2 OBJETIVOS

Após analisar o potencial das enzimas xilanolíticas e celulolíticas secretadas por 111 isolados fúngicos oriundos do solo da região do Pantanal Sul-mato-grossense, os isolados WPPM 421A e WPPM 622 foram selecionados juntamente com o *Trichoderma asperelloides* F22, para determinação do perfil de produção enzimática de xilanase e CMCase, e para a caracterização físico-químicas de temperatura e pH da xilanase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Após determinar os melhores indutores na produção de xilanase e CMCase por isolados da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense, dois isolados foram selecionados para caracterização do perfil de produção enzimática, juntamente com o *Trichoderma asperelloides* F22. Após apurado o pico de produção no período de 168 horas, seguiu-se a caracterização das enzimas determinando as condições ótimas e de estabilidade de temperatura e pH. Os critérios adotados para seleção foram de acordo com a atividade enzimática obtida nos extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens nas temperaturas e substratos em pré-testes realizados (**Tabela II.1**).

Tabela II.1. Relação dos isolados da região do Pantanal, selecionados para análise do perfil de produção enzimática, e da atividade de xilanase e CMCase obtida na fase de teste com diferentes substratos.

Fungo	Substrato	Temperatura	Xilanase	CMCase
			U g ⁻¹	
WPPM 421A	FT	35° C	428,84	22,23
	SM+FT	35° C	727,13	60,61
	SM	35° C	47,33	12,73
WPPM 622	FT	35° C	84,17	36,56
	<i>Trichoderma asperelloides</i> F22	30° C	876,48	15,84

*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho.

Fonte: Próprio autor.

3.1 Perfil de Produção

A curva de indução enzimática expressa pelos isolados foi avaliada nos tempos: 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h, na temperatura de incubação de 35 °C, diferente apenas para o *Trichoderma asperelloides* F22, incubada a 30 °C. O pré-inóculo foi preparado utilizando o Agar Saboraund Dextrose, em placas de Petri recebeu os inóculos que ficaram incubados por 72 h em BOD a 30 e 35 °C.

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer 250 mL, contendo 5 g de substrato (**Figura II.1**), utilizado como fonte de carbono e 10 mL de solução nutriente preparada com 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,03% uréia, e ajustou-se o pH a 5,0. Os nutrientes foram diluídos em 100 mL de água destilada, esterilizados e armazenados em geladeira e reservado. Nas combinações de bagaço de cana + farelo de trigo e sabugo de milho + farelo de trigo utilizou-se a proporção de 1:1. Ambos os substratos foram esterilizados, e após resfriamento, 5 discos (0,5 diâmetro) do pré-inóculo fúngico foram transferidos para o meio e umedecido com a solução salina, obtendo assim uma umidade inicial média de 75%. Utilizou-se um bastão de vidro para a homogeneização do inóculo no substrato, e os frascos de Erlenmeyer foram transferidos para incubadoras nas temperaturas de 35 e 45 °C por 96 h.

Figura II.1. Fase de preparo da fermentação sólida em Erlenmeyer contendo substratos como fonte de carbono.



Fonte: Próprio autor.

Após o período de fermentação, a solução enzimática foi extraída pela adição de 50 mL de água deionizada em cada frasco. O material fermentado foi suavemente homogeneizado usando um bastão de vidro e, em seguida, levado a agitação em shaker a 1000 ciclos/minutos por 1 h a temperatura ambiente. Com um funil e coador de pano sintético a suspensão foi filtrada, e centrifugada a 10.000 x g, na temperatura de 5 °C durante 10 minutos. As soluções enzimáticas obtidas (extrato enzimático) foram acondicionadas em frascos âmbar e, posteriormente utilizadas nas reações para determinação de proteína e de atividade enzimática para xilanase e CMCase.

3.1.1 Curva de calibração

Para curva de calibração foi utilizada xilose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g L⁻¹ pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS (MILLER, 1959). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto a 55 °C. A atividade enzimática foi expressa também em U por grama de substrato (U g⁻¹).

3.1.2 Endoglucanase e Hemicelulase

As reações realizadas para quantificar as atividades de CMCase e de xilanase utilizou-se os substratos carboximetilcelulose (CMC) a 4% e xilana “beerchwood” (Sigma-Aldrich) a 1% como substrato reacional. Com tampão acetato a 0,1 mol L⁻¹, preparou-se os substratos com pH ajustado a 5,5. As atividades tanto reação quanto controle foram ensaiadas em duplicata, seguindo método proposto por MILLER (1959).

Os tubos da reação foram em seguida transferidos para banho de água fervente por 10 minutos, tempo este que foi determinado por uma cinética de tempo e, posteriormente, foi transferido para banho de gelo para resfriamento imediato (BRIENZO et al., 2009). Em cada tubo foi adicionado cerca de 2,5 mL de água deionizada, e agitada para uma completa homogeneização. Cerca de 200 µL de cada amostra foi utilizada para leitura em placas de leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 µmol de glicose por minuto sob as condições do ensaio, utilizando uma curva analítica de glicose. A mesma cinética foi utilizada para determinar a unidade de atividade para xilanase, utilizando a curva analítica de xilose. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteína total (U mg⁻¹ proteína) na solução enzimática bruta.

Para obtenção das leituras de absorvância, utilizou-se um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A atividade de xilanase expressa em unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto, seguindo o protocolo citado acima, e empregando uma curva analítica de xilose. Nas situações em que a absorvância ultrapassou o intervalo da curva-padrão, diluições seriadas foram realizadas até a normalização, e a absorvância resultante contida no intervalo da curva.

3.1.3 Determinação de Proteína

Na determinação de proteínas totais, o método proposto por HARTREE-LOWRY (1951) foi utilizado e as leituras de absorvância realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. Utilizou-se água para o branco da amostra, que substituiu a proteína foi substituída por igual volume de água. Diluições seriadas das amostras foram preparadas sempre que necessário, ao modo que a absorvância resultante estivesse contida no intervalo da curva analítica.

Obteve-se a atividade específica dividindo a atividade enzimática (U mL^{-1}) pelo teor de proteína total (mg mL^{-1}), apenas para enzima xilanase e CMCase, como consta na Equação 1.1.

$$\text{Ativ. Específica} = \frac{\text{Ativ. Enzimática (U mL}^{-1}\text{)}}{\text{Teor de Proteína (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad (1.1)$$

3.2 Caracterização bioquímica da Xilanase

3.2.1 Efeito do pH e estabilidade das enzimas

Para definir o pH ótimo das enzimas secretadas pelas linhagens, os tampões (tampão McIlVaine, pH 3 - 8,0 e tampão Glicina: NaOH, pH 8,5 - 11) foram preparados no pH de 3,0 a 11, com intervalos de 0,5; onde adicionou-se 1% de xilana, e seguiu-se a reação em triplicata para determinação de atividade de xilanase a 55 °C. As atividades obtidas no pH ótimo foram utilizadas para calcular a atividade das enzimas em termos de porcentagem relativa a partir da maior atividade na faixa de pH citada.

Para a avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, estas foram misturadas nos tampões de diferentes valores de pH (3,0 a 11,0) por 60, 90, 120, 360, 720 e 1440 minutos em sala climatizada (± 18 °C). Cerca de 0,5 µL de enzima e 0,5 µL do tampão acetato foram preparados em tubos de ensaio em cada de pH. Esta estabilidade também foi

avaliada comparando a atividade obtida em 1 h de incubação e após 24 h, determinando-se assim sua atividade residual (%). A reação foi realizada na temperatura ótima da enzima, seguida pela determinação da atividade residual em condições de ensaio padrão no pH ótimo determinado para a enzima.

3.2.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

A influência da temperatura sobre a atividade das enzimas foi analisada avaliando a temperatura ótima. A mistura de reação foi mantida em banho-maria nas seguintes temperaturas: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90 °C, com tampão a pH 5,5. A atividade da enzima xilanase foi determinada realizando procedimento de ensaio padrão em triplicata, e utilizou-se o valor obtido para calcular a atividade enzimática relativa percentual em relação ao maior valor obtido nas temperaturas testadas.

Nos ensaios de estabilidade térmica das enzimas secretadas por estes isolados, esta foi obtida determinando-se a atividade remanescente da enzima que permaneceu incubada em condições estáticas, em banho termostaticado por 1 h nas temperaturas de 30 a 90 °C, com intervalo de 10 °C. Após esse período, as enzimas foram imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação e então foram analisadas de acordo com os procedimentos de atividades padrão sob condições de pH e temperatura ótima definida para cada enzima, seguidas pela determinação da atividade residual dada em porcentagem.

3.2.3 Meia vida da enzima

Avaliou-se o tempo de meia vida da enzima xilanase realizando a reação enzimática em duplicata. As enzimas foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 15 min, 30 min, 1 h, 1h30, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h. Após a incubação, as enzimas foram colocadas em banho de gelo por 5 min e posteriormente mantida em *overnight* a 4 °C, para uma possível estabilização das estruturas secundárias e terciárias, e para que qualquer dobramento reversível fosse refeito (SAQUIB et al., 2012). O tempo de meia vida foi definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, para isso, a máxima atividade obtida foi dada como 100% da atividade e este valor usado para o cálculo de atividade residual.

3.3 Análise estatística

A análise de variância foi realizada pelo Teste F na probabilidade de 5%, e o teste de Tukey, para todas as atividades das xilanases e CMCase obtidas no perfil de produção. Para avaliar os efeitos da interação entre atividade enzimática x pH ótimo, sobre a produção da enzima xilanase, utilizou-se o esquema fatorial 5x17 (5 enzimas x 17 pH), e para avaliar os efeitos da interação entre atividade enzimática x temperatura ótima utilizou-se o esquema fatorial 5x13 (5 enzimas x 13 temperaturas).

O pH estabilidade, a temperatura estabilidade, e a meia vida da enzima tiveram seus dados transformados em $\sqrt{x+1}$, $\sqrt{x+0,5}$ e $\text{Log}_{10}(x+1)$ e realizou-se as análises utilizando o aplicativo computacional SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de produção

Os resultados obtidos inicialmente em pré-testes mostraram claramente que a adição do farelo de trigo e sabugo de milho induziram com maior frequência a produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas por este grupo de isolados, principalmente por *Trichoderma asperelloides* F22 na indução da xilanase. Analisando o isolado WPPM 622, a mistura SM+FT induziu um aumento de 170% e 1.536% comparado a produção destes cultivados com 100% de FT e SM, respectivamente. B

De acordo com Marques (2014), a indução exercida pelo farelo de trigo na produção enzimática destes fungos pode estar correlacionada com a maior fonte de carbono e nitrogênio em sua composição para a síntese destas enzimas. O baixo teor de lignina (3-6%) e os altos níveis de proteínas (13-19%), celulose (10,86%) e hemicelulose (28,8%) (SINGHANIA et al., 2009; SUKUMARAN et al., 2009; FALKOSKI et al., 2013) são fatores que colaboram com este incremento de atividade obtida pelos fungos, além de conter uma quantidade considerável de açúcares solúveis, tais como glucose (42,5%), xilose (15,4%), arabiose (3,1%), galactose (2,7%) (LEQUART et al., 1999).

4.1.1 Perfil de Produção da Xilanase

Considerando a atividade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, fermentado no farelo de trigo, não foi observada diferença ($p>0,05$) nos tempos avaliados

(Tabela I.2). Entretanto, observa-se que após 24 h de fermentação, que é considerada a fase de estabelecimento e crescimento do fungo, ocorreu a maior atividade da xilanase, cerca de 19,01 U g⁻¹, seguido por picos de produção nos tempos 48 h (15,9 U g⁻¹), 168 h (14,86 U g⁻¹) e 120 h (13,17 U g⁻¹).

Examinando as enzimas obtidas pelo mesmo isolado fermentado na mistura SM+FT e no SM, verifica-se que estas apresentaram diferenças entre as médias obtidas nos tempos do perfil, tendo picos de atividade enzimática a 96 h (554,27 U g⁻¹) e a 72 h (255,06 U g⁻¹), respectivamente. A utilização de misturas de substratos é reportada por Betini et al. (2009), onde os autores relataram o uso de SM+FT (1:1), com atividade máxima para *A. niger* (794,7 U g⁻¹), *A. niveus* (652,6 U g⁻¹) e *A. ochraceus* (752,6 U g⁻¹) em 96 h de incubação.

O isolado WPPM 622 (FT) produziu xilanase com pico de atividade em 48 h (276,04 U g⁻¹), e declinou bruscamente 24 h depois, aumentando a atividade em 168 h (64,21 U g⁻¹) de fermentação. A redução da atividade da xilanase pode estar relacionada a alterações no metabolismo do fungo, durante o crescimento contínuo e juntamente com a limitação de nutrientes e consequente morte celular, seguido da desnaturação e redução da atividade da enzima (BON et al., 2008). Indica-se mensurar o pH em cada período, para verificar se este permanece constante, sem nenhuma alteração brusca capaz de alterar a eficiência produtiva dos micro-organismos.

O *T. asperelloides* mostrou máxima atividade da xilanase entre 48 h e 120 h de incubação, com atividades de 519,55 U g⁻¹ (48 h) e 606,23 U g⁻¹ (72 h), 418,04 U g⁻¹ (96 h) e 538,18 U g⁻¹ (120 h). Pode-se notar que em 96 h houve um leve declínio na produção ou na atividade desta enzima, mas este declínio se expressou com mais intensidade 144 h após o início da fermentação, supostamente devido ao ambiente já alterado, acarretando a redução na produção de xilanase. SARIASLANI et al. (1974) citam que a fase inicial representa um período onde as enzimas estão sendo sintetizadas para metabolizar os ácidos orgânicos resultantes da primeira fase de crescimento. Nota-se que quando ocorre o acúmulo de ácidos orgânicos, evidencia-se uma queda brusca de pH, resultante da fase inicial de crescimento micelial.

Tabela II.2. Perfil de produção dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22 em fermentação em estado sólido a 35°C.

Tempo	WPPM 421A		WPPM 622		<i>Trichoderma asperelloides</i> F22					
	FT	SM+FT	SM	FT	FT					
	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	Xilanase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	Xilanase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	Xilanase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	Xilanase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	Xilanase <i>U g⁻¹</i>
24 h	2,80	19,01	3,96	9,01 d	3,57 a	7,06 c	3,72	10,57 b	1,59 c	8,10 c
48 h	5,71	15,90	3,91	104,60 cd	1,08 ab	165,00 ab	6,56	276,04 a	8,40 a	519,55 a
72 h	3,04	6,94	4,56	300,52 bc	1,21 ab	255,06 a	7,06	14,08 b	5,06 abc	606,23 a
96 h	5,24	5,64	3,31	547,27 a	0,92 ab	54,60 c	5,37	17,84 b	7,58 a	481,04 ab
120 h	3,12	13,17	2,35	499,22 ab	0,88 ab	57,45 c	3,82	13,69 b	3,57 bc	538,18 a
144 h	1,30	10,44	2,68	15,64 d	2,81 ab	32,13 c	2,18	7,32 b	5,57 ab	33,95 c
168 h	2,18	14,86	1,92	54,86 d	0,71 b	82,00 bc	5,20	64,21 b	5,60 ab	116,42 bc
Média	3,24	3,34	3,24	218,73	1,60	93,33	4,84	57,68	5,34	329,07
EPM	0,24	0,41	0,24	64,39	0,20	6,55	0,47	11,24	0,25	25,24
F	0,13 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,13 ^{ns}	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,20 ^{ns}	<0,01*	<0,01*	<0,01*

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, SM: sabugo de milho, SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1). Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem entre si nas probabilidades de 5%* pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média.

Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Perfil de Produção da CMCase

A produção da enzima CMCase pelo isolado WPPM 421A foi influenciada pelo substrato utilizado na fermentação. O substrato que mais induziu o isolado na produção de CMCase foi a mistura de SM+FT, com atividade média de 23,88 U g⁻¹, e com pico de produção da enzima em 96 h de fermentação com 55,53 U g⁻¹, sendo que o mesmo tempo foi o máximo de produção alcançada quando este fermentou em sabugo de milho, obtendo 23,83 U g⁻¹ de atividade. Quando o isolado fermentou em farelo de trigo, seu pico de atividade foi em 144 h, com atividade de CMCase de 54,97 U g⁻¹ (**Tabela II.3**).

Embora a produção de CMCase pelo isolado WPPM 622 não tenha apresentado diferenças significativas entre os tempos de avaliação, observa-se a ocorrência de dois picos de produção, nos tempos 48 e 144 h após início da fermentação, com 11,68 e 15,17 U g⁻¹, respectivamente. Este isolado obteve atividade maiores de CMCase em pré-testes com resíduos lignocelulósicos (Capítulo I), com atividade de 155 U g⁻¹ na mistura de bagaço de cana e farelo de trigo como substrato, e em FT, a produção foi de 56,36 U g⁻¹ em 96 h de fermentação. Esta diferença na atividade obtida pode ser justificada pelo processo de manutenção da cultura pura do fungo. Os isolados encontravam-se cultivados em tubo inclinado com o meio agar saboraound, e também em vidros de Castelany com óleo mineral e água destilada na proporção de 1:4, reservados em caixas de isopor, livre de luz e na temperatura de 22 °C ±1,0. Após realização desta etapa do experimento e verificada a redução de 73% da atividade da enzima CMCase produzida pelo isolado WPPM 622 cultivado em farelo de trigo, recomenda-se uma cuidadosa repicagem da cultura para se evitar uma possível mutação dos fungos.

A atividade da CMCase obtida por *Trichoderma asperelloides* F22 e pelo isolado WPPM 421A foram superadas neste processo, conforme podemos visualizar na **Tabela II.3**. O fungo *Trichoderma asperelloides* F22 produziu o máximo de CMCase em farelo de trigo em 72 h de fermentação, declinando até 144 h, e logo aumentando 86,4% de sua atividade. O pico de produção de CMCase de 72 h também foi mostrado por *Aspergillus niger* DM testado em bagaço de cana-de-açúcar, com atividade de 0,38 U mL⁻¹ (MARQUES, 2014), valor superior ao obtido neste experimento com *Trichoderma asperelloides* F22 em farelo de trigo (0,26 U mL⁻¹).

Tabela II.3. Perfil de produção de carboximetilcelulase (CMCase) dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22 em FES a 35 °C nos substratos farelo de trigo, sabugo de milho e a mistura sabugo de milho de farelo de trigo.

Tempo	WPPM 421A				WPPM 622		<i>Trichoderma asperelloides</i> F22			
	FT		SM+FT		SM		FT			
	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	CMCase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	CMCase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	CMCase <i>U g⁻¹</i>	Proteína <i>mg mL⁻¹</i>	CMCase <i>U g⁻¹</i>		
24 h	2,80	5,39 b	3,96	0,00 c	3,57 a	0,00 c	3,72	6,19	1,59 c	2,60 d
48 h	5,71	0,00 b	3,91	13,91 abc	1,08 ab	7,28 abc	3,09	11,68	8,40 a	3,02 cd
72 h	3,04	13,62 b	4,56	17,13 bc	1,21 ab	3,53 bc	3,70	10,14	5,06 abc	25,64 a
96 h	5,24	0,00 b	3,31	55,53 a	0,92ab	23,83 a	2,65	8,18	7,58 a	21,17 a
120 h	3,12	2,56 b	2,35	46,45 ab	0,88 ab	18,24 ab	3,82	4,09	3,57 bc	10,14 b
144 h	1,30	54,97 a	2,68	25,36 bc	2,81 ab	5,11 bc	2,18	15,17	5,57 ab	1,72 d
168 h	2,18	4,55 b	1,92	8,74 abc	0,71 b	12,65 abc	5,20	12,23	5,60 ab	12,65 b
Média	3,34	11,58	3,24	23,88	1,60	10,09	3,48	9,67	5,34	10,99
EPM	0,41	2,23	0,23	3,05	1,97	1,16	0,47	1,93	0,25	0,49
F	0,15 ^{ns}	<0,01*	0,13 ^{ns}	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,20 ^{ns}	0,21 ^{ns}	<0,01*	<0,01*

Substrato FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, SM: sabugo de milho, SM+FT: mistura sabugo de milho + farelo de trigo (1:1). Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem entre si nas probabilidades de 5% pelo teste de Tukey. Os valores das atividades enzimáticas representam a média de duas determinações. EPM: Erro padrão da Média.

Fonte: Próprio autor.

Usar dados da literatura para comparação de picos de produção é um tanto incontestável, pois cada micro-organismo possui características peculiares quanto a isto, mas geralmente, espécies do mesmo gênero possuem comportamento um pouco semelhantes. Raghuwansh et al. (2014), avaliando a produção de *Trichoderma asperellum*, mostraram um pico de produção em 96 h, com atividade de 2.741 e 6.394 U g⁻¹, para os isolados RCK2011 e SR1-7 de *T. asperellum* cultivados em farelo de trigo, respectivamente.

LADEIRA (2013), trabalhando com *Bacillus* sp. SMIA-2, cultivado com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, e suplementado com água de maceração de milho, verificou que a produção das enzimas avicelase e CMCCase apresentou uma taxa de crescimento muito rápida, aumentando até 12 vezes, e sua taxa de crescimento inalterada até 72 h. A autora verificou que o pH do meio aumentou com o início do desenvolvimento microbiano, visto que houve um consumo de nitrogênio orgânico, como aminoácidos e peptídeos decorrente da utilização da água de maceração do milho. O pH estabilizou a 8,5 até 120 h de incubação, declinado para 7,8, decorrente a utilização de açúcares contidas no meio pela bactéria.

Com a avaliação do perfil de produção das enzimas em estudo, determinou-se o tempo ideal de fermentação para a produção da enzima xilanase e CMCCase, ou seja, o tempo de incubação do fungo no qual se obtém a produtividade enzimática máxima. Este perfil pode ser melhor visualizado na **Tabela II.4**, onde os dados revelam que os picos de produção das enzimas xilanase e CMCCase pelos fungos testados acontecem em períodos diferentes de fermentação, onde somente o isolado WPPM 421 atingiu seu pico de produção de ambas as enzimas no mesmo tempo, em 96 h.

Tabela II.4. Perfil de produção dos isolados da região do Pantanal, selecionados para análise do perfil de produção enzimática.

Fungo	Substrato	Temperatura	Pico de atividade	
			Xilanase	CMCase
WPPM 421A	FT	35 °C	168 h	144 h
	SM+FT	35 °C	96 h	96 h
	SM	35 °C	72 h	96 h
WPPM 622	FT	35 °C	48 h	144 h
<i>Trichoderma asperelloides</i> F22	FT	30 °C	120 h	72 h

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, SM: sabugo de milho, SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1).

Fonte: Próprio autor.

4.2 Efeito do pH e estabilidade da xilanase

Com o ensaio realizado na faixa de pH 3,0 a 11, foi calculada a atividade relativa em cada um dos pH. Através da **Tabela II.5** podemos verificar que a enzima produzida pelo isolado WPPM 421A mostrou a maior atividade da xilanase em pH da reação a 5,5, tanto a produzida por fermentação no sabugo de milho, quanto no farelo de trigo. Na enzima obtida pela mistura SM+FT, a atividade relativa obtida foi mais expressiva no pH 6, porém, se analisarmos a curva obtida na figura, notamos que entre o pH 5,0 a 7,5, a atividade relativa mantém-se acima dos 50%. A enzima obtida pelo isolado, tendo o substrato FT no processo, apresentou maior atividade no pH 6,0, e uma faixa de pH 5 - 11, onde a atividade relativa se manteve acima de 50%, demonstrando-se assim mais estável às alterações de pH do meio.

Tabela II.5. pH ótimo para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e por *Trichoderma asperelloides* F22.

pH	WPPM 421A			WPPM 622	<i>T. asperelloides</i> F22
	FT	FT+SM	SM		FT
<i>Atividade Relativa da Xilanase (%)</i>					
3,0	38,22	0,00	0,00	5,40	4,54
3,5	40,65	0,00	0,74	5,57	5,17
4,0	41,69	0,00	8,77	8,61	6,87
4,5	49,32	0,00	8,96	9,20	5,17
5,0	55,22	34,84	53,64	30,57	33,50
5,5	100,00	87,15	100,00	80,23	76,26
6,0	63,21	100,00	93,04	100,00	100,00
6,5	61,12	96,03	67,27	79,36	98,17
7,0	58,00	64,90	38,71	55,29	73,11
7,5	57,65	59,74	33,24	40,41	57,68
8,0	57,65	41,73	33,24	26,77	42,19
8,5	54,18	33,92	28,56	25,83	28,78
9,0	52,45	31,66	28,47	25,53	27,96
9,5	58,35	29,55	26,28	24,80	12,85
10,0	58,00	16,17	25,88	24,80	12,47
10,5	55,22	16,17	21,50	24,67	12,35
11,0	53,49	14,71	21,30	24,00	10,71
Média	56,14	36,86	34,68	34,77	35,75
pH Ótimo	5,5	6,0	5,5	6,0	6,0
Faixa ótima*	5,0-11,0	5,5-7,5	5,0-6,5	5,5-6,5	5,5-7,5
DPM	7,63	26,87	21,09	21,35	27,40

*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho. DPM: Desvio Padrão da Média. Faixa ótima: Faixa de pH que as enzimas mantem até 50% de sua atividade relativa. Fonte: Próprio autor.

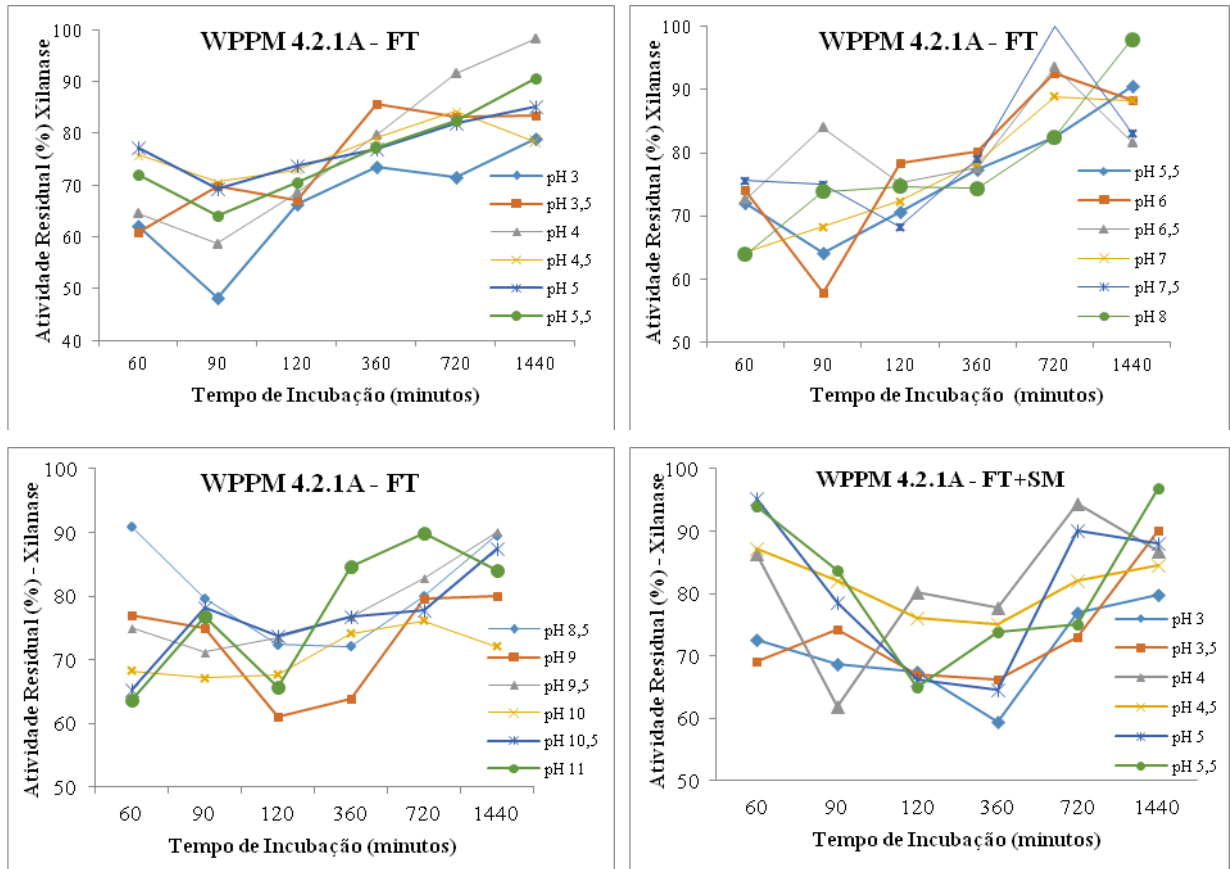
A enzima do isolado WPPM 622 apresentou atividade superior quando a reação ocorreu no pH 6, tendo uma estreita faixa de pH (5,5 - 6,5), onde está manteve mais de 50% de sua atividade, no entanto, o fungo *Trichoderma asperelloides* F22 também teve o pH 6,0 como pH ótimo, apresentando uma reduzida faixa de pH (5,5 - 7,5) com atividade acima de 50%, podendo então afirmar que estes fungos produzem enzimas com uma estreita faixa de estabilidade e atuação para pH. Dentro de um intervalo, cada micro-organismo apresenta um valor de pH ótimo para seu crescimento e fungos filamentosos apresentam bom crescimento em faixa de pH entre 2,0 e 9,0, e faixa ótima de 3,8 a 6,0 (KRISHNA, 2005), no entanto, o isolado WPPM 421A quando fermentado no farelo de trigo obteve maiores atividades enzimáticas em uma faixa de pH mais alcalino.

O meio de cultivo do isolado WPPM 421 influenciou na estabilidade das enzimas obtidas na FES, sendo que as enzimas obtidas do FT, SM+FT e SM apresentaram maiores atividades no pH 4,0; 6,0 e 6,5, respectivamente. É importante avaliar a estabilidade das enzimas, tanto em relação pH, quanto a sua temperatura, sendo assim, é possível controlar no processo de bioconversão fatores que possam reduzir sua eficiência. O teste de estabilidade de pH e temperatura foi feito com o tampão da reação calibrado no pH ótimo de cada enzima.

O extrato enzimático bruto foi incubado em diferentes pHs durante 60, 90, 120, 360, 720 e 1440 minutos em temperatura ambiente (18,0 °C, ±1) (**Figura II.2, Figura II.3, Figura II.4**). Em função dos resultados obtidos, foi possível observar que apenas o isolado WPM 622 foi pouco tolerante aos pH avaliados, apresentando uma estabilidade acima de 75%, apenas na faixa de pH entre 4,5 a 5,0 e 8,5 a 9,5, onde a mínima atividade observada foi no pH 5,5, com atividade relativa de 35,1%. Com o produto da atividade obtida, comparando a atividade de 1 h e após 24 h de incubação em pH variando de 3 a 11, determinou-se a atividade relativa, justificando o pH de estabilidade de cada um. Em todas as enzimas obtidas houve incremento na atividade, como pode-se verificar na **Figura II.5**.

Os extratos enzimáticos obtidos pelo isolado WPPM 421A e pelo fungo *Trichoderma asperelloides* F22 demonstraram uma maior estabilidade quando incubados em diferentes pHs, apresentando uma atividade relativa de no mínimo 70% na faixa de pH 3 a 11 (**Tabela II.5**). Ambas as enzimas demonstraram maior atividade xilanolítica no tempo de 720 e 1440 minutos.

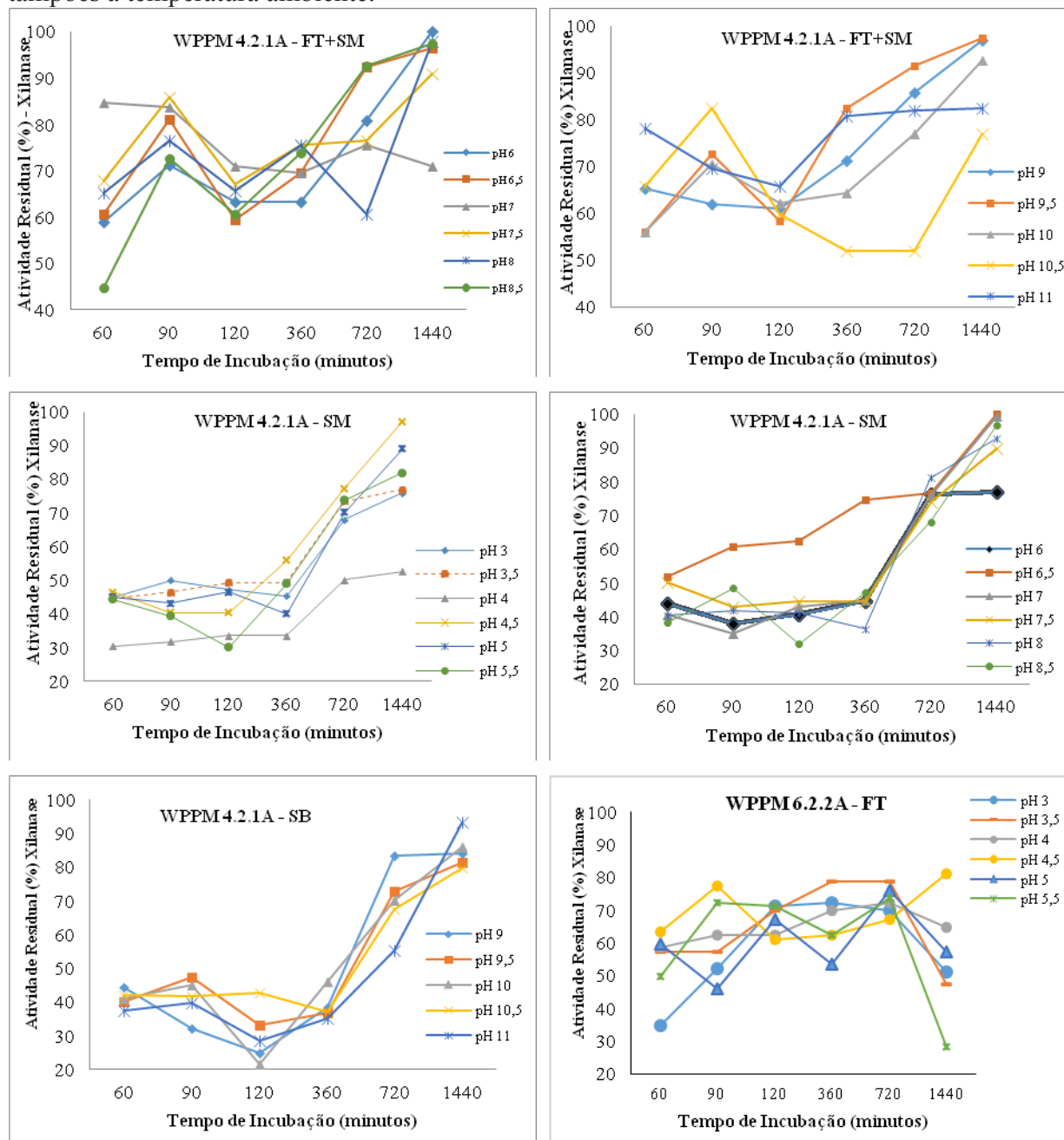
Figura II.2. Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo farelo de trigo (FT) e mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente.



*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho. Os valores de pH estabilidade foram obtidos através da atividade relativa da xilanase após 24 horas de incubação na faixa de pH 3-11.

Fonte: Próprio autor.

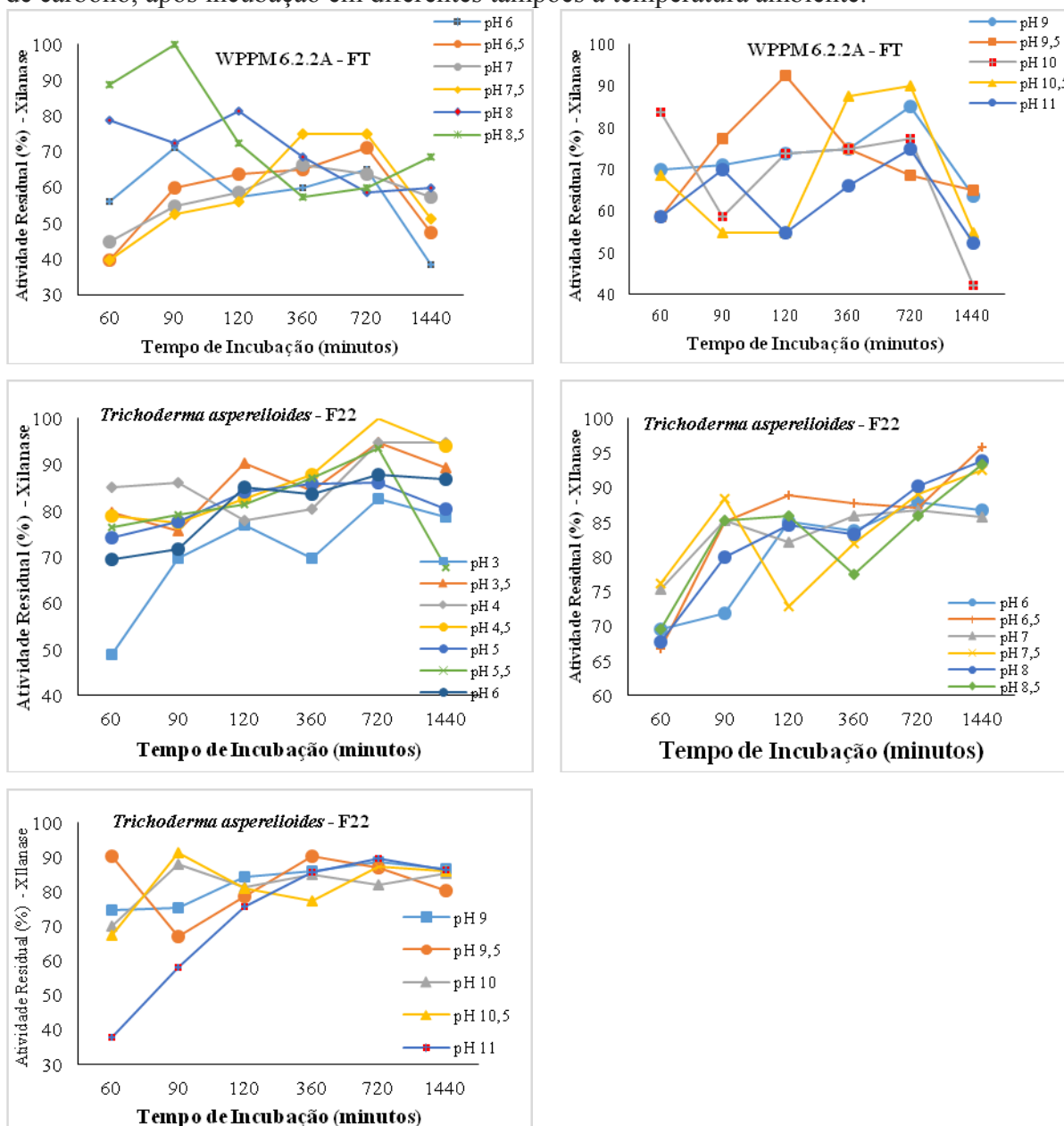
Figura II.3. Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 421A, em FES tendo a mistura de sabugo de milho e farelo de trigo (SM+FT) e sabugo e milho como substrato, e o isolado WPPM 622 (FT), após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente.



*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho. Os valores de pH estabilidade foram obtidos através da atividade relativa da xilanase após 24 horas de incubação na faixa de pH 3-11.

Fonte: Próprio autor.

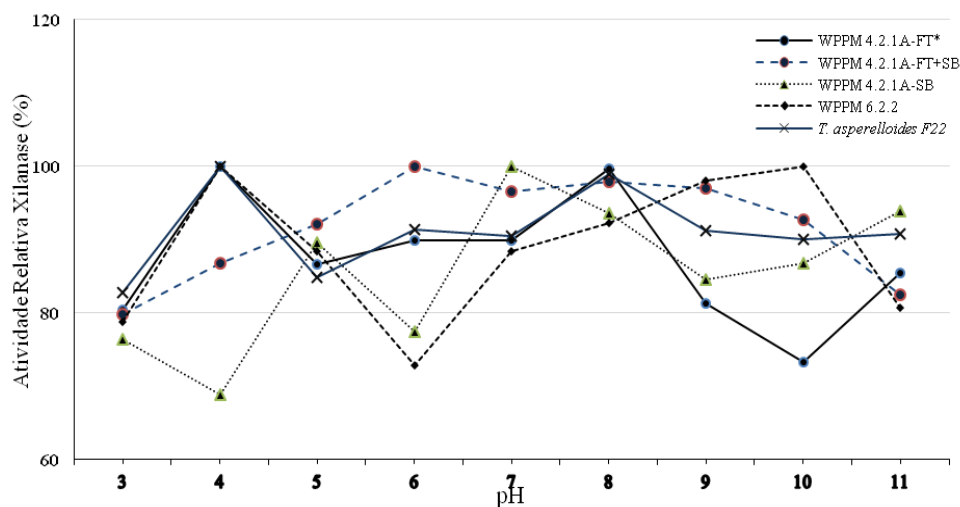
Figura II.4. Efeito do pH sobre a estabilidade da enzima xilanase produzida pelo isolado WPPM 622, e *Trichoderma asperelloides* F22 em FES tendo farelo de trigo (FT) como fonte de carbono, após incubação em diferentes tampões a temperatura ambiente.



*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono. *Os valores de pH estabilidade foram obtidos através da atividade relativa da xilanase após 24 horas de incubação na faixa de pH 3-11.
Fonte: Próprio autor.

A desnaturação das proteínas geralmente ocorre em situações que o pH do meio, difere do pH ótimo de cada enzima, devido a isso, o efeito do pH sobre a estabilidade da enzima é um parâmetro importante para seleção de materiais direcionadas a bioprocessos onde existe a constante alteração do pH do meio, ou onde o controle dessas condições seja um pouco limitado (KALRA; SANDHU, 1986).

Figura II.5. Atividade residual da xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22, incubadas em pH 3 a 11 por 24 horas em temperatura ambiente.



*Os valores de atividade residual foram obtidos por meio da atividade da xilanase após 1 hora de incubação na faixa de pH (3-11), comparada com a obtida após 24 h (—) de incubação. Substratos utilizados na fermentação: FT: Farelo de trigo, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho.
Fonte: Próprio autor.

4.3 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

Para avaliar os efeitos da temperatura sobre a eficiência xilanase, dados de atividade relativa (%) foram obtidas na faixa de 30 a 90 °C, e então construiu-se uma tabela onde pode-se verificar que a faixa de 45 a 60 °C é predominante como ótima para as xilanases testadas pelos isolados em seus respectivos substratos. A enzima produzida pelo isolado WPPM 421A apresentou uma faixa de temperatura ótima mais estreita quando se utilizou o farelo de trigo como substrato (45 a 50 °C), com pico de atividade a 50 °C. Quando utiliza-se a mistura do substrato FT+SM este apresenta xilanase com atividade relativa em ampla faixa de temperatura (45 a 75 °C), onde a atividade reduziu menos de 20%, e seu pico obtida a 60 °C. Na temperatura de 80 °C, esta atividade declina cerca de 52%, mas eleva-se novamente na temperatura de 85 e 90 °C (62,8 e 67,4% respectivamente), com redução de aproximadamente 40% da atividade, sendo esta, uma atividade considerável em altas temperaturas, podendo afirmar que este substrato foi capaz de influenciar na estabilidade térmica da enzima produzida nas condições que o experimento foi realizado.

Moretti et al. (2012), cultivando fungos termofílicos verificaram o pico de atividade de xilanase por *Aspergillus fumigatus* M.7.7 em 60 °C, o mesmo pico apresentado por WPPM 421A. A enzima resultante da fermentação pelo isolado WPPM 421A em sabugo de milho demonstrou uma maior atividade na temperatura de 55 °C, e manteve mais de 50% da atividade

na faixa de 40 a 60 °C. Este mesmo comportamento é adquirida pela enzima obtida pelo isolado WPPM 622 quando fermentado com farelo de trigo. O extrato enzimático obtido pelo fungo *T. asperelloides* F22 produziu enzimas com pico de atividade na temperatura à 50 °C, e manteve atividade relativa maior que 50% na faixa de 35 a 65 °C.

Todas as enzimas obtidas foram inativadas à 80 °C, exceto a produzida pelo isolado WPPM 421A fermentado com sabugo de milho a 35 °C por 96 h, que manteve uma estabilidade interessante. Estudos sobre a termoestabilidade e pH ótimos das enzimas são de suma importância devido a ampla variedade de processos biotecnológicos de aplicação destas enzimas (BAJPAI, 1997). O efeito da temperatura na estabilidade da xilanase é mostrado na **Tabela II.6**. As enzimas dos isolados WPPM 421A, WPPM 622 e *T. asperelloides* demonstraram suas estabilidades mantendo mais de 60% da atividade quando incubadas em banho termostatizado por 1 h entre 30 e 40 °C.

A enzima obtida pelo isolado WPPM 421A na fermentação com sabugo de milho apresentou-se estável até 70 °C, onde expressou uma atividade residual de 56,8% (**Tabela II.7**). Já a estabilidade da xilanase produzida por *Aspergillus fumigatus* M.7.7 foi verificada quando esta manteve 90% da atividade incubado por 1 h a 65 °C, enquanto a obtida por *Aspergillus fumigatus* M.7.1 perdeu 50% de sua atividade após 1 h de 55 °C (MORETTI et al., 2012). O *Aspergillus fumigatus* M51, se mostrou estável nas temperaturas de 25 a 50 °C, mantendo 87% da atividade a 50 °C, e a partir de 60 °C a atividade foi inferior a 15% (ALBANO, 2012). A 80 °C a enzima obtida pelo isolado WPPM 421A cultivado em farelo de trigo apresentou uma atividade residual média de 40%. Existem várias processos e aplicações industriais que ocorrem diante de temperaturas elevadas (BAJPAI, 1997; WU et al., 2004), diante disso, verificou-se que as enzimas obtidas por WPPM 622 e *T. asperelloides* F22 apresentaram menor termoestabilidade, pois reduziram cerca de 80% da atividade após incubação a 50 °C por 1 h.

Tabela II.6. Temperatura ótima para xilanase produzida pelos isolados WPPM 421A e WPPM 622 e por *Trichoderma asperelloides* F22.

Temperatura	WPPM 421A			WPPM 622	<i>T. asperelloides</i>
	FT	FT+SM	SM		FT
<i>Atividade Relativa da Xilanase (%)</i>					
30 °C	10,8	18,6	32,2	21,3	45,6
35 °C	39,4	27,5	33,0	32,7	53,8
40 °C	40,0	48,4	49,8	51,6	74,8
45 °C	96,3	84,2	77,5	78,5	80,7
50 °C	100,0	88,4	87,3	80,6	100,0
55 °C	52,8	94,1	100,0	100,0	92,9
60 °C	29,4	100,0	71,9	54,1	69,0
65 °C	26,3	99,7	49,4	42,0	54,0
70 °C	24,5	97,3	20,1	25,0	41,1
75 °C	7,7	81,0	19,3	14,2	22,4
80 °C	0,0	47,8	0,0	0,0	0,0
85 °C	0,0	62,8	0,0	0,0	0,0
90 °C	0,0	67,4	0,0	0,0	0,0
Média	31,4	66,2	40,0	37,0	47,0
Temp. ótima	50 °C	60,0	55,0	55,0	50,0
Faixa ótima	45-55	45-75	40-60	40-60	35-65

*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho. DPM: Desvio Padrão da Média. Faixa ótima: Faixa de temperatura que as enzimas mantem até 50% de sua atividade relativa.

Fonte: Próprio autor.

Tabela II.7. Atividade residual da enzima xilanase produzidas pelos isolados WPPM 421A, e WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22, após 60 minutos de incubação em diferentes temperaturas, para determinação da temperatura de estabilidade.

Temperatura	WPPM 421 ^a			WPPM 622	<i>T. asperelloides</i>
	FT	FT+SM	SM		FT
<i>Atividade Residual da Xilanase (%)</i>					
30 °C	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
40 °C	86,6	89,0	96,0	96,3	62,7
50 °C	45,7	52,5	83,0	21,4	10,7
60 °C	45,1	38,5	57,1	20,7	7,8
70 °C	43,3	19,0	56,8	18,6	5,7
80 °C	40,8	0,0	28,3	10,3	3,8
90 °C	10,7	0,0	10,0	0,0	0,0
Média	53,2	42,7	61,6	38,2	27,2
Faixa Estabilidade	30-40	30-50	30-70	30-40	30-40

*FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: substrato sabugo de milho. Faixa Estabilidade: Faixa de pH que as enzimas mantem até 50% de sua atividade relativa.

Fonte: Próprio autor.

4.4 Meia vida da enzima xilanase

A termoestabilidade da enzima refere-se a sua resistência ao desdobramento após aquecimento, isto é, para a desnaturação térmica por um determinado período de tempo. Vários parâmetros são utilizados para definir a estabilidade térmica das enzimas, incluindo a meia-vida da enzima (GRIFFIN et al., 1984; BAJPAI, 1997; WU et al., 2004; VIKARI et al., 2007). A meia-vida de uma enzima é o tempo após o qual diminui 50% de sua atividade original a uma dada temperatura (FARINAS et al., 2010).

Os valores de meia-vida das xilanases a 60 °C estão dispostos na **Tabela II.8**, e como verifica-se que o isolado WPPM 421A produziu enzimas com diferentes termoestabilidade, de acordo com o substrato utilizado na fermentação. O extrato enzimático obtido após cultivo do isolado em sabugo de milho apresentou a maior estabilidade pois manteve sua atividade em até 60%, 12 h após incubação a 60 °C. Esta estabilidade é superior quando se compara com as atividades obtidas pelo isolado fermentado em farelo de trigo e SM+FT, e por WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22. Assim, podemos afirmar que o substrato sabugo de milho possui propriedades peculiares que induzem a produção de enzima termoestáveis, já que o isolado apresentou enzimas mais suscetíveis ao aumento de temperatura quando fermentado apenas no farelo de trigo, com 54,37% de atividade em 2 h de incubação e 42,42% com 8 h de incubação.

A xilanase mais sensível a temperatura foi a obtida por WPPM 622, que após 1 h já havia reduzido 50% de sua atividade, e a 12 h apenas 27,8%, o mesmo foi tido por Jun et al. (2009) ao analisarem as xilanases produzidas por *T. reesei*, incubada 60 °C por 30 minutos, onde obtiveram 40% de sua atividade enzimática. Já a enzima produzida por WPPM 421A em farelo de trigo e em SM+FT e por *Trichoderma asperelloides* F22, reduziram cerca 50% seu potencial enzimático em 4 h de incubação (**Tabela II.8**). Farinas et al. (2010), cultivando *Aspergillus niger* em farelo de trigo, obtiveram a meia vida da xilanase em 243 h a 37 °C, e este valor diminuiu para 90 h quando incubação foi efetuada a 50 °C.

Tabela II.8. Meia vida da enzima xilanase (%), produzidas pelos isolados fúngicos WPPM 421A, WPPM 622 e *Trichoderma asperelloides* F22, em FES incubadas a 60 °C.

Tempo	Isolados				
	WPPM 421 A			WPPM 622	<i>T. asperelloides</i>
	FT ¹	FT+SM	SM	FT	FT
15'	82,15	100,00	90,78	100,00	72,24
30'	100,00	92,08	100,00	63,90	100,00
1 h	60,32	86,80	93,09	49,46	85,52
1h30	56,35	73,60	88,48	47,65	74,65
2 h	54,37	65,68	88,48	42,24	61,38
4 h	48,42	45,62	86,18	38,63	51,42
6 h	42,46	40,87	74,66	36,82	42,67
8 h	42,46	36,64	72,35	36,82	29,09
10 h	38,50	31,89	60,83	33,21	16,42
12 h	19,25	13,94	60,83	27,80	9,78

¹FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, FT+SM; farelo de trigo + sabugo de milho (1:1); SM: sabugo de milho.

Fonte: Próprio autor.

Perfazendo-se todo processo de caracterização físico-química da enzima xilanase, podemos afirmar um comportamento dinâmico diferenciado em ambas as enzimas obtidas (**Tabela II.9**). Nota-se que o sabugo de milho induziu a maior estabilidade térmica da enzima excretada por WPPM 421A. Assim, admite-se que as atividades de xilanase e CMCase obtidas neste trabalho sejam consideradas interessantes em processos industriais, sendo necessário a completa identificação dos isolados testados, e uma otimização das condições de cultivo para facilitar o processo de purificação das enzimas (POLIZELLI et al., 2005). O tratamento dos resíduos lignocelulósicos para a parcial remoção da lignina pode aumentar a capacidade do fungo em induzir a síntese de enzimas do complexo celulolítico (AGUIAR; MENEZES, 2000).

Tabela II.9. Caracterização das xilanases produzidas pelos isolados selecionados.

Linhagens	Fonte de Carbono	Tempo de fermentação	pH Ótimo	pH Estab.	Temperatura Ótima	Estab. Térmica	Tempo de Meia Vida
WPPM 421A	FT	168 h	5,5	4,0	50 °C	30-40 °C	2 h
WPPM 421A	FT+SM	96 h	6,0	6,0	60 °C	30-50 °C	2 h
WPPM 421A	SM	72 h	5,5	6,5	55 °C	30-70 °C	12 h
WPPM 622	FT	48 h	5,5	4,5	55 °C	30-40 °C	30'
<i>T. asperelloides</i> F22	FT	120 h	6,0	6,5	50 °C	30-40 °C	4 h

Substratos FT: Farelo de trigo como fonte de carbono, SM: sabugo de milho, SM+FT: sabugo de milho + farelo de trigo (1:1).

Fonte: Próprio autor.

5 CONCLUSÕES

O isolado WPPM 421A produziu as enzimas com as maiores atividades de xilanase e o isolado WPPM 622 produziu as enzimas com as maiores atividades de CMCase.

A enzima produzida por WPPM 421A, tendo sabugo de milho como substrato se mostrou mais termoestável, pois mantiveram sua atividade em até 60%, 12 h após incubação a 60 °C, e manteve 50% de sua atividade após incubada 1 h a 70 °C.

A enzima obtida por WPPM 421A quando esta foi fermentada pela mistura de SM+FT, apresentou uma termoestabilidade peculiar, pois manteve sua atividade em 67,4% quando a reação ocorreu a 90 °C.

O substrato sabugo de milho possui propriedades peculiares que induzem a produção de enzima termoestáveis.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto 2012.
- 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. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 504-510, 2007.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Advance in applied Microbiology**, Maryland Heights, v. 43, p. 141-194, 1997.
- BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, E. S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, E. H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 32, p. 819-824, 2009.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Brasil, 2008. p. 241-271.
- BRACELPA. **Associação Brasileira de Celulose e Papel**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/170>>. Acesso em: 07 mar. 2016.
- CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, Hoboken, n. 27, p. 51-57, 2008.
- DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.
- FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of

cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 296-305, 2013.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO JUNIOR, A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FARINAS, C. S.; PIROTA, R. D. P. B.; FONSECA, R. F.; NETO, V. B. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. de M. et al. (Ed.) **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 412 p. ISBN 978-85-7035-429-7

GRIFFIN, H.; DINTZIS, F.R.; KRULL, L.; BAKER, F. L. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 26, n. 3, p. 269-300, 1984.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.

HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004. ISSN 0175-7598.

JUN, H.; BING, Y.; KEYING, Z.; XUEMEI, D.; DAIWEN, C. Thermostable carbohydrate binding module increases the thermostability and substrate-binding capacity of *Trichoderma reesei* xylanase 2. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 53-59, 2009.

KALRA, M. K.; SANDHU D. K. Optimal production of cellulolytic enzymes and their location in *Trichoderma pseudokoningii*. **Acta Biotechnologica**, Weinheim, v. 6, n. 2, p. 161-166, 1986.

KELLY, S. M.; PRINCE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochemistry and Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 1338, n. 2, p. 161-85, 1997. ISSN 0006- 3002.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems – Na Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 25, p.1-30, 2005.

KUHAD, R. C.; GRUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 1-10, 2011. Article ID 280696. doi:10.4061/2011/280696

LADEIRA, S. A. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *Bacillus* sp.** 2013.139f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to valueadded coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Res**, Oxford, v. 3, n. 2, p.133-140, 2003.

LEQUART, C.; NUZILLARD, J. M; KUREK, B.; DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 319, p. 102–111, 1999.

LOPES, R. B.; BRITO, M. A. V. P. MELLO, S. C. M.; SAGGIN, O. J.; WENDLAND, A. Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade. In: SIMPÓSIO MICRO-ORGANISMOS EM AGROENERGIA: DA PROSPECÇÃO AOS BIOPROCESSOS. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.161 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95339/1/DOC15-19-12-2013.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

MARQUES, M. P. **Determinação das condições ótimas de fermentação para produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aspergillus niger* derivado-marinho, utilizando diferentes subprodutos agroindustriais.** 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

MORETTI, M. M. S; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R., RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 1062–1071, 2012.

NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. W. **Circular dichroism: principles and applications.** New York: Wiley-VCH, 1994.

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

POTHIRAJ, C.; KANMANI, P.; BALAJI, P. Bioconversion of Lignocellulose Materials. **Mycobiology**, Hoboken, v. 34, p. 159-165, 2006.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulose production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, Houston, v. 124, p. 183-189, 2014.

ROSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por Xanthomonas campestris pv. Campestris ATCC33913**. 2011. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 21, p. 85-94, 2009.

SAQUIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state 83 fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, London, v. 45, p. 641-646, 2010.

SARIASLANI, F. S.; HARPER, D. B.; HIGGINS, I. J. Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. **Biochemical Journal**, London, v. 140, p. 31-45, 1974.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Schenectady, v. 32, p. 421-424, 2009.

TERRONE, C. C. **Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes offer potential benefits in the hydrolysis of lignocellulosic

substrates. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, New York, v. 108, p. 121–145, 2007.

VILLAS-BOAS, S. L.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2002.

WU, Y. B.; RAVINDRAN, V.; THOMAS, D. G.; BIRTLES, M. J.; W. H. ENDRIKS. Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. **British Poultry Science Journal Impact & Description**, Abingdon, v. 45, p. 385-394, 2004.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology Bioengineering**, Hoboken, v. 88, p. 797, 2004b.

CONCLUSÕES GERAIS

A casca de arroz foi o substrato que mais induziu a produção de xilanase.

Os isolados foram considerados eficientes na produção das enzimas xilanases e CMCase quando comparados com o *T. asperelloides* F22, nas condições em que o experimento foi executado.

O isolado WPPM 421A, produziu as enzimas com as maiores atividades de xilanase e o isolado WPPM 622 produziu as enzimas com as maiores atividades de CMCase.

A enzima produzida por WPPM 421A, tendo sabugo de milho como substrato se mostrou mais termoestável que as outras enzimas obtidas neste experimento pois mantiveram sua atividade em até 60%, 12 h após incubação a 60 °C, e manteve 50% de sua atividade após incubada 1 h a 70 °C.

A enzima obtida por WPPM 421A quando esta foi fermentada pela mistura de SM+FT, apresentou uma termoestabilidade peculiar com mantendo atividade em 67,4% quando a reação ocorreu a 90 °C. As propriedades estudadas colocam esta enzima como promissora para aplicações biotecnológicas.

O substrato sabugo de milho possui propriedades peculiares que induzem a produção de enzima termoestáveis.