



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Gisele Fernanda Alves da Silva

Influência dos macronutrientes no crescimento de
Myceliophthora thermophila I-1D3b em cultivo submerso

São José do Rio Preto

2017

Gisele Fernanda Alves da Silva

Influência dos macronutrientes no crescimento de
Myceliophthora thermophila I-1D3b em cultivo submerso

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
Co-orientadora: Dr^a. Priscila da Silva Delabona

São José do Rio Preto

2017

Silva, Gisele Fernanda Alves da.

Influência dos macronutrientes no crescimento de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivo submerso / Gisele Fernanda Alves da Silva. -- São José do Rio Preto, 2017

91 f. : il., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Coorientador: Priscila da Silva Delabona

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Enzimas de fungos - aplicações industriais. 3. Fungos filamentosos - Culturas e meios de cultura. 4. Carbono. 5. Nitrogênio. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gisele Fernanda Alves da Silva

Influência dos macronutrientes no crescimento de
Myceliophthora thermophila I-1D3b em cultivo submerso

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Maria Luiza Silva Fazio
IMES – Catanduva

São José do Rio Preto/SP-2017

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, a quem prefiro me referir como as forças do universo e toda conexão com ela existente, por emanar energia de tudo que é possível. Agradeço o dom da vida, a saúde e a capacidade de resistir e de tolerar.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. João Cláudio Thoméo que possui uma contagiante serenidade, energia e alegria de viver. Que me ensinou a não temer e nem sofrer por antecedência. O senhor me ensinou algo que levarei para toda vida “Se você não está fazendo nada de errado, não tem porque temer”. Obrigada pela paciência, e me desculpe por todo momento de irritação que lhe causei. Obrigada por não desistir de mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos membros da banca pela disponibilidade em fazer parte da comissão examinadora deste trabalho, bem como suas contribuições.

Aos colegas e amigos de laboratório, com vocês aprendi a confiar, a rir, a desconfiar (não deixar o “face” aberto) e rir mais ainda. Dividimos dúvidas de análises, segredos e bobagens. Obrigada pela cumplicidade.

À minha família, que me ofereceu todo amor, que me ensinou a ser resiliente. Que apesar da distancia, sempre foi meu porto seguro.

Em especial à minha amiga e irmã, Tuany Nogueira. Dividimos muitas alegrias e tristezas. Obrigada por ficar até tarde me fazendo companhia nas análises além de me ajudar. A você que NUNCA me deixou sucumbir.

A você Marianny Canedo, desejo de todo meu coração que você encontre a paz de espírito e esteja aberta a todo amor que o mundo ainda vai lhe oferecer

Agradeço de forma geral a todos que passaram por minha vida nesse período, de alguma maneira aprendi algo com vocês, seja pelo amor ou pela dor.

RESUMO

Fungos filamentosos secretam grande quantidade de proteínas e outros produtos metabólicos para o meio de crescimento. As substâncias secretadas dependem não só das características metabólicas do microrganismo, como também da composição nutricional do meio de cultivo, particularmente dos macronutrientes. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos macronutrientes, carbono e nitrogênio, no crescimento e secreção de amilases, CMCase e xilanase do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, em cultivo submerso. Atuando como fonte de carbono, foram escolhidos amido solúvel, carboximetilcelulose, papel de filtro e glicose e como fonte de nitrogênio sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura. O crescimento fúngico foi determinado pela quantificação de biomassa micelial. Foram realizados ensaios de cinética de crescimento microbiano e de secreção das enzimas mencionadas, alternando-se e associando-se as fontes de carbono e nitrogênio, procurando estabelecer uma correlação entre a disponibilidade de fontes simples e complexas de carbono e de fonte orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, na síntese de biomassa e secreção de enzimas amilase, CMCase e xilanase. Realizou-se ensaios variando a fonte de nitrogênio, peptona, sulfato de amônia e extrato de levedura em concentração fixa de glicose. Determinou-se a concentração de nitrogênio presente nos substratos utilizados como fonte de nitrogênio e calculou-se a massa de substrato necessário para oferecer as respectivas concentrações de nitrogênio, 10 e 13%. Também foram realizados experimentos variando as fontes de carbono em amido solúvel, Carboximetilcelulose e papel de filtro, em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L⁻¹). Esse mesmo experimento foi realizado variando as fontes de carbono combinados à glicose. Foram obtidos como resultados maiores valores de biomassa em presença de fonte orgânica de nitrogênio, enquanto maiores atividades enzimáticas foram obtidas em cultivo constituído de fontes orgânicas e inorgânicas na proporção 2:1, respectivamente. Quando avaliada a influência das fontes de nitrogênio, peptona e extrato de levedura, ambas avaliadas em função da concentração de 10% e 13% de nitrogênio, não foram observadas diferenças significativas na composição de biomassa micelial ao fim de 120h de cultivo. Identificou-se influência da concentração de nitrogênio na atividade de CMCase, sendo que as melhores atividades obtidas ocorreram para a concentração de 13% de peptona e extrato de levedura. No entanto, não foi possível identificar a influência da concentração de nitrogênio na atividade de xilanase e amilase. No estudo das fontes de carbono, mostrou-se como melhor fonte de carbono na obtenção de biomassa fúngica o amido solúvel. Maiores atividades enzimáticas foram obtidas em presença de seus indutores: CMCase foram obtidas em cultivo constituído de carboximetilcelulose, e amilase em cultivo com amido solúvel. Quando as fontes de carbono foram combinadas à glicose, observou-se redução nas atividades das enzimas analisadas. Nesse trabalho, observou-se que cada fonte de carbono proporcionaram efeitos diferentes sobre crescimento microbiano e atividades enzimáticas, dada as características distintas de sua composição química e estrutural.

Palavra Chave: *Myceliophthora*. Cultivo submerso. Macronutrientes.

ABSTRACT

Filamentous fungi secrete large amounts of proteins and other metabolic products into the growth medium. The secret substances depend not only on the metabolic characteristics of the microorganism but also on the nutritional composition of the culture medium, particularly the macroelements. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the influence of macronutrients, carbon and nitrogen on the growth and secretion of amylases, CMCase and xylanase of fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, in submerged culture. Acting as a carbon source, soluble starch, carboxymethylcellulose, filter paper and glucose and as source of nitrogen ammonium sulfate, peptone and yeast extract were chosen. Fungal growth was determined by the quantification of mycelial biomass. Microbial growth and secretion kinetics assays were performed alternating and associating as carbon and nitrogen sources, trying to establish a correlation between the availability of simple and complex sources of carbon and of organic and inorganic sources of nitrogen, in the synthesis of biomass and secretion of amylase enzymes, CMCase and xylanase. Tests were performed by varying the source of nitrogen, peptone, ammonium sulfate and yeast extract at fixed glucose concentration. The concentration of nitrogen present in the substrates used as nitrogen source was determined and the substrate mass required to provide as 10 and 13% nitrogen solutions was calculated. Experiments were also carried out, varying as carbon sources in soluble starch, Carboxymethylcellulose and filter paper, in different concentrations (2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 gL⁻¹). sources of carbon combined with glucose. As results obtained higher biomass values in the presence of organic nitrogen source, while higher enzymatic activities were obtained in organic and inorganic sources in the 2: 1 ratio, respectively. When evaluated by an influence of nitrogen sources, peptone and yeast extract, both evaluated as a function of 10% and 13% nitrogen concentration, were not significantly observed in the composition of mycelial biomass after 120 h of culture. The influence of nitrogen concentration on CMCase activity was identified, with the best activities obtained for a concentration of 13% of peptone and yeast extract. However, it was not possible to identify an influence of the nitrogen concentration on xylanase and amylase activity. In the study of carbon sources, the soluble starch was shown to be the best source of carbon in the production of fungal biomass. Higher enzymatic activities were obtained in the presence of its inducers, CMCase were obtained in culture consisting of carboxymethylcellulose and amylase in culture with soluble starch. As carbon sources were combined with glucose, it observed a reduction in the activities of the enzymes analyzed. In this work it was observed that each carbon source had different effects for microbial growth and enzymatic activities, given as distinct characteristics of its chemical and structural composition.

Keyword: *Myceliophthora*. Submerged culture. Macronutrients.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amido solúvel
AR	Açúcares Redutores
ASG	Amido solúvel + Glicose
BC	Bagaço de cana
C	Carbono
C+N	Carbono + Nitrogênio
CES	Cultivo em estado sólido
CSb	Cultivo Submerso
CMC	Carboximeltilcelulose
CMCG	Carboximeltilcelulose + Glicose
CMCase	Carboximeltilcelulase
E	Extrato de levedura
FT	Farelo de trigo
g	Gramas
G	Glicose
L	Litros
MM	Material Mineral
N	Nitrogênio
P	Peptona
PF	Papel de filtro
PFG	Papel de filtro + Glicose
S	Sulfato de amônio
t	Tempo (horas)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 3.1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA MOLECULAR DE CARBOXIMETILCELULOSE (CMCNA).	22
FIGURA 3.2: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO SOBRE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	25
FIGURA 3.3: REPRESENTAÇÃO DAS MOLÉCULAS CONSTITUINTES DO AMIDO.....	26
FIGURA 3.4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE AÇÃO DAS CELULASES SOBRE A CELULOSE	29
FIGURA 3.5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS ENZIMAS AMILOLÍTICAS (A-AMILASE, B-AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE	32
FIGURA 5.1: CRESCIMENTO FÚNGICO ESTIMADO PELA QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA SECA EM CULTIVO SEMI-SÓLIDO COM FARELO DE TRIGO, VARIANDO-SE A FONTE DE NITROGÊNIO	39
FIGURA 5.2: ATIVIDADE DE (A) CMCase E (B) XILANASE, EM FUNÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO (●) PEPTONA (P), (■) SULFATO DE AMÔNIO (S) E (▲) P+S, EM CULTIVO SEMI-SÓLIDO COM FARELO DE TRIGO	42
FIGURA 5.3: PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM CULTIVO SUBMERSO, EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE PEPTONA COM SULFATO DE AMÔNIO, (●) 1:2 P+S, (■) 1:1 P+S E (▲) 2:1 P+S, TENDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO.....	44
FIGURA 5.4: FONTES DE CARBONO UTILIZADAS NO CULTIVO SUBMERSO DE <i>MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA</i> I-1D3B.....	46
FIGURA 5.5: PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA, VARIANDO-SE AS FONTES DE NITROGÊNIO EM EXTRATO DE LEVEDURA E PEPTONA, NA CONCENTRAÇÃO DE 1 G.L ⁻¹ , ACRESCIDAS DE SULFATO DE AMÔNIO A 0,5 G.L ⁻¹	47
FIGURA 5.6: RENDIMENTO DE BIOMASSA EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CARBONO, APENAS CARBONO E CARBONO COM NITROGÊNIO, PARA TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (A) 48 H, (B) 84 H E (C) 120 H.....	49
FIGURA 5.7: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DA FONTE DE NITROGÊNIO PRESENTE NO SUBSTRATO PARA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE IGUAL A 10 G.L ⁻¹	52
FIGURA 5.8: ASPECTO DA BIOMASSA MICELIAL TENDO COMO FONTE DE CARBONO AMIDO SOLÚVEL (A), CMC (C) E PAPEL DE FILTRO (P).....	54
FIGURA 5.9: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA (---) E AÇÚCARES REDUTORES (—) OBTIDOS NO CULTIVO DO <i>MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA</i> I-1D3B EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO, AMIDO (♦) CMC (■) E PAPEL DE FILTRO (●), COM AS FONTES DE NITROGÊNIO FIXADAS. EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (A) 48 H, (B) 84 H E (C) 120 H	56
FIGURA 5.10: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMILASE EM PRESENÇA DE AMIDO SOLÚVEL COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO, COM AS FONTES DE NITROGÊNIO FIXADAS EM SULFATO DE AMÔNIO (0,5 G.L ⁻¹) E PEPTONA (1 G.L ⁻¹). DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (♦) 48 H, 84 H (●) E (■) 120H ..	59

FIGURA 5.11: COMPARAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE AMIDO E ATIVIDADE AMILÁSICA OBTIDA EM CULTIVO COM AMIDO SOLÚVEL PARA 48 H DE CULTIVO, TENDO AMIDO SOLÚVEL COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO E COM AS FONTES DE NITROGÊNIO SULFATO DE AMÔNIO (0.5 G.L ⁻¹) E PEPTONA (1 G.L ⁻¹).....	60
FIGURA 5.12: ATIVIDADE DE CMCase NO CULTIVO DO <i>MYCELIOPHthora THERMOPHILA</i> I-1D3B EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO, (A) CMC E (B) E PAPEL DE FILTRO E COM AS FONTES DE NITROGÊNIO SULFATO DE AMÔNIO (0.5 G.L ⁻¹) E PEPTONA (1 G.L ⁻¹). DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS CULTIVO 48, 84 E 120 H.	61
FIGURA 5.13: ATIVIDADE DE ENZIMÁTICA DE XILANASE NO CULTIVO DO <i>MYCELIOPHthora THERMOPHILA</i> I-1D3B EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PAPEL DE FILTRO. DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (♦) 48 H, (●) 84 H E (■) 120 H.....	64
FIGURA 5.14: PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO FONTE DE CARBONO EM COMBINAÇÃO À GLICOSE, SENDO (♦) AMIDO + GLICOSE, (■) CMC + GLICOSE, (▲) PAPEL FILTRO + GLICOSE E (●) SOMENTE GLICOSE EM (A) 48, (B) 84 E (C) 120 H DE CULTIVO	66
FIGURA 5.15: AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS CONSUMIDOS DURANTE CULTIVO SUBMERSO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO FONTE DE CARBONO EM COMBINAÇÃO À GLICOSE, SENDO (♦) AMIDO + GLICOSE, (■) CMC + GLICOSE, (▲) PAPEL FILTRO + GLICOSE E (●) SOMENTE GLICOSE EM (A) 48 H, (B) 84 H E (C) 120 H.....	68
FIGURA 5.16: ATIVIDADE DE A-AMILASE PARA O CULTIVO COM AMIDO SOLÚVEL E GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO. DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (▲) 48 H, 84 H (●) E (■) 120H.....	70
FIGURA 5.17: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CMCase EM PRESENÇA DE CMC + GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO. DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (▲) 48 H, 84 H (●) E (■) 120 H	72
FIGURA 5.18: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILANASE EM PRESENÇA DE CMC + GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO. DADOS OBTIDOS EM TRÊS TEMPOS DE CULTIVO (▲) 48 H, 84 H (●) E (■) 120 H	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELA LINHAGEM <i>MYCELIOPHthora THERMOPHILA</i> SSP.....	18
TABELA 5.1: CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.	45
TABELA 5.2: AÇÚCAR REDUTOR CONSUMIDO PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO.....	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
	<i>3.1 Cultivo submerso com fungos.....</i>	<i>15</i>
	<i>3.1.1 Myceliophthora thermophila.....</i>	<i>17</i>
	<i>3.2 Fatores nutricionais</i>	<i>18</i>
	<i>3.2.1 Fontes de macronutrientes</i>	<i>21</i>
	<i>3.2.1.1 Celulose e hemicelulose</i>	<i>21</i>
	<i>3.2.1.2 Papel como fonte de celulose</i>	<i>24</i>
	<i>3.2.1.3 Amido solúvel</i>	<i>26</i>
	<i>3.3 Enzimas 27</i>	
	<i>3.3.1 Celulases.....</i>	<i>28</i>
	<i>3.3.2 Xilanases</i>	<i>30</i>
	<i>3.3.3 Amilases.....</i>	<i>30</i>
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
	<i>4.1 Materiais</i>	<i>33</i>
	<i>4.1.1 Pré-inoculo e solução nutriente</i>	<i>33</i>
	<i>4.2 Método experimental.....</i>	<i>34</i>
	<i>4.2.1 Ensaios preliminares.....</i>	<i>34</i>
	<i>4.2.2 Variação da concentração da fonte de carbono glicose.....</i>	<i>34</i>
	<i>4.2.3 Variação das fontes de nitrogênio.....</i>	<i>35</i>
	<i>4.2.4 Variação das fontes de carbono</i>	<i>35</i>
	<i>4.2.5 Determinação da atividade enzimática</i>	<i>36</i>
	<i>4.2.5 .1 Endoglucanases (CMCase).....</i>	<i>36</i>
	<i>4.2.5.2 Xilanases</i>	<i>36</i>
	<i>4.2.5.3 α amilases.....</i>	<i>37</i>
	<i>4.2.6 Caracterização dos substratos</i>	<i>37</i>
	<i>4.2.6.1 Análise de cinzas.....</i>	<i>37</i>
	<i>4.2.6.2 Análise de nitrogênio total</i>	<i>37</i>
	<i>4.2.6.3 Determinação quantitativa de açúcares redutores totais.....</i>	<i>38</i>
	<i>4.2.6 .4 Umidade</i>	<i>38</i>
	<i>4.2.7 Análises estatísticas.....</i>	<i>38</i>
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
	<i>5.1 Ensaios preliminares.....</i>	<i>39</i>

5.2	<i>Caracterização dos substratos.....</i>	45
5.3	<i>Influência das fontes de nitrogênio na presença de glicose como fonte de carbono</i>	46
5.4	<i>Influência das fontes de nitrogênio e de sua concentração no crescimento microbiano</i>	51
5.4.1	<i>Influência da concentração de nitrogênio na obtenção de biomassa micelial</i>	51
5.5	<i>Influência das fontes de carbono e de suas concentrações no crescimento microbiano e nas atividades enzimáticas.....</i>	53
5.5.1	<i>Influência de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa micelial</i>	53
5.5.2	<i>Influência de diferentes fontes de carbono nas atividades enzimáticas</i>	58
5.5.2.1	<i>Atividade de amilase</i>	58
5.5.2.2	<i>Atividade de CMCase.....</i>	60
5.5.2.3	<i>Atividade de Xilanase</i>	63
5.6	<i>Influência da fonte de carbono em combinação à glicose na obtenção de biomassa</i>	64
5.6.1	<i>Influência da fonte de carbono em combinação com glicose sobre as atividades enzimáticas.....</i>	69
5.6.1.1	<i>Atividade de Amilase</i>	70
5.5.4.2	<i>Atividade de CMCase.....</i>	71
5.6.4.3	<i>Atividade de Xilanase</i>	73
6.	CONCLUSÃO	75
7.	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

O cultivo submerso é uma técnica de cultivo de microrganismos em excesso de água e permite grande controle sobre as variáveis de processo, dentre as quais a composição do meio de cultivo. Por outro lado, o cultivo em estado sólido ocorre em substratos com composição variável, sendo difícil estabelecer uma relação de consumo de nutrientes e a síntese de biomassa e enzimas. Assim, acredita-se que ensaios em cultivo submerso podem ser úteis para avaliar como fungos filamentosos apropriam-se de nutrientes para suas atividades metabólicas, de modo a prever o comportamento do microrganismo no cultivo em estado sólido.

O grupo de Bioenergia do IBLCE/UNESP tem trabalhado fortemente para viabilizar a rota enzimática da produção de etanol de 2º geração, e o cultivo em estado sólido tem sido usado para a produção de enzimas fibrolíticas, devido ao baixo custo que esta técnica proporciona. Um dos obstáculos enfrentados pelo grupo é a variabilidade da matéria-prima empregada, principalmente bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, o que acarreta intensa variabilidade na concentração das enzimas produzidas.

Os fungos termofílicos têm sido descritos como bons produtores de complexos enzimáticos. Dentre esses, *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, isolado pelo grupo de Bioenergia, tem demonstrado bom potencial para a síntese de celulases e hemicelulases. A vantagem da utilização industrial de cepas termófilas é a menor incidência de contaminação e as características termotolerantes das enzimas produzidas.

Sabe-se que as fontes de nutrientes estão intimamente ligadas à capacidade dos microrganismos se desenvolverem e secretar metabólitos. Dentre os nutrientes, destacam-se como essenciais para o desenvolvimento dos fungos os macronutrientes, carbono e nitrogênio, sendo o carbono o principal constituinte do material celular e o nitrogênio o constituinte das glicoproteínas e das enzimas que serão produzidas. Desta forma, a busca da combinação ideal de fontes simples e complexas de carbono e de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio visa potencializar a síntese das enzimas de interesse.

Desta forma, este trabalho visa avaliar o comportamento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em termos de crescimento micelial e do conjunto de enzimas amilase, endoglucanases e xilanase, em função dos macronutrientes e suas respectivas fontes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a influência dos macronutrientes carbono e nitrogênio no crescimento e na síntese de enzimas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivo submerso.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico e de suas concentrações no crescimento de *M. thermophila* I-1D3b.
- Avaliar a influência das fontes de carbono amido solúvel, CMC e papel de filtro no crescimento e na síntese das enzimas extracelulares.
- Estabelecer relações entre a produção de biomassa fúngica e a síntese de enzimas para as diferentes fontes de carbono.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo submerso com fungos

O cultivo submerso é uma das principais estratégias na obtenção de enzimas microbianas, é um sistema capaz de gerar uma variedade de metabólitos em que os fungos filamentosos são de grande importância (CASTRO 2010; JR, 2010; PAPAGIANNI, 2004; PEREIRA). Comumente utilizada devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de possibilitar fácil recuperação das enzimas extracelulares. Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e o conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (ORLANDELLI et al., 2012, FAZENDA et al., 2008).

Esta técnica tornou-se o método fermentativo preferido para as aplicações comerciais, sendo utilizada pela maioria das indústrias de bioprodutos. Apresenta menor problemática, uma vez que, a transferência de massa, calor e oxigênio são facilitadas e a homogeneidade geralmente é superior. Tem a vantagem quanto ao crescimento fúngico ser realizado pela formação de micélio num período de tempo curto e em qualquer época do ano, uma vez que as condições de cultivo como pH, a temperatura, agitação, aeração e a concentração de nutrientes podem ser controladas. Sendo assim, devido ao melhor monitoramento e facilidade de manuseio, muitos processos de produção de enzimas usam esta tecnologia (MACENO, 2014; GERN, 2005). Portanto, este processo é mais confiável e reproduzível, facilmente monitorado e o controle dos parâmetros-chave são mais flexíveis (FAZENDA et al., 2008). No entanto, o custo de operação e o grande volume de resíduos líquidos gerados encarecem o processo (WANG; YANG, 2007).

Os fungos em geral, são lembrados pelos danos que causam, sejam em alimentos, problemas de saúde (alergias e micoses em animais) ou parasitando plantas. No entanto, os fungos são responsáveis por diversas aplicabilidades positivas, como a ação fermentativa na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, os quais são imprescindíveis na produção de bebidas como vinho e cerveja, alimentos como pães e massas em geral, conferindo sabor e aroma distintos em diferentes tipos de alimentos (queijos), ou esteróides e hormônios para crescimento vegetal. Na medicina, os fungos receberam especial atenção a partir do desenvolvimento de alguns antibióticos, destacando-se a penicilina sintetizada a partir de metabólitos do fungo *Penicillium chrysogenum*. Cada metabólito está vinculado a

um tipo de microrganismo (MORAES, 2017; TERÇARIOLI et al., 2010, PATERSON, 2006; RAVEN et al., 1992).

Encontra-se na literatura vasta pesquisa utilizando fungos como microrganismos em cultivo submerso. Em cultivo submerso, os fungos filamentosos têm sido empregados industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de enorme importância econômica e social, tais como os antibióticos, enzimas, micotoxinas, vitaminas, entre outros. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos reportando o sucesso na aplicação de fungos, em pesquisas como: a produção de polissacarídeos constituintes da massa micelial de fungos produzidos em cultura submersa, bem como a produção de exopolissacarídeos excretados para o meio de cultivo líquido com atividade terapêutica (ZANCHETTA, 2012; FERREIRA, 2006; ROSADO et al., 2003; ROSADO et al., 2003; SILVEIRA, 2003; WISBECK et al., 2002; LEIFA et al., 2001; MAZIERO et al., 1999; BURNS et al., 1994; CAVAZONI; ADAMI, 1992;).

Quando comparada à fermentação em estado sólido, o cultivo submerso apresenta como vantagem a possibilidade de ter melhor racionalização e padronização do processo, o que é fundamental para a indústria (HOLKER; LENZ, 2005) além de permitir um sistema de cultura homogêneo (AGUILAR et al., 2003).

Para obter êxito no cultivo de fungos filamentosos em meio submerso, é necessário o estudo de diversas variáveis. Dentre os desafios para o cultivo submerso, encontram-se mecanismos de crescimento do fungo, a dinâmica de agregação do micélio, a fragmentação, quantificação da morfologia e modelos matemáticos para o crescimento e formações de produtos do cultivo. Como relatado anteriormente, os constituintes físico-químicos do meio, como composição de nutrientes, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e forças mecânicas exercem mudanças na formação do micélio (PAPAGIANNI, 2004).

Dentre as enzimas obtidas de fungos por cultivo submerso destaca-se a celulase. Entretanto, na natureza, o crescimento e utilização de celulose por microrganismos aeróbios, produtores de celulases, provavelmente assemelha-se mais à fermentação em estado sólido do que a fermentação líquida (SINGHANIA et al., 2010). Entretanto a secreção de celulases e demais enzimas tem sido relatada a partir de fungos mesófilos e termófilos, tanto em cultivo submerso como em cultivo sólido (CASCIATORI et al., 2015; MORETTI, 2012; PINTO, 2010; SANTOS, 2015; ZANCHETA, 2012).

Esse crescente interesse pelo uso de fungos termofílicos pode ser atribuído à capacidade de esses fungos crescerem em temperaturas mais elevadas, diminuindo o risco

de contaminação por microrganismos mesofílicos competidores, além de produzirem, em geral, enzimas mais termoestáveis, despertando ainda mais o interesse de aplicação industrial destas enzimas (GOMES et al., 2007). Diversos são os fungos utilizados para produção de celulase xilanases e amilases, dentre eles estão: *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Humicola*, *Penicillium brasilianum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trametes versicolor*, *Penicillium* sp (BEHERA; RAY, 2016).

3.1.1 *Myceliophthora thermophila*

Dentre os fungos termofílicos utilizados na obtenção de complexos enzimáticos, encontra-se o *Myceliophthora thermophila* I-1D3b (CASCIATORI, 2015; ZANELATO, 2012). No Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP, integrante do Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia, tem-se utilizado duas linhagens do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*, identificadas como I-1D3b e M.7.7, ambas isoladas pelo próprio grupo a partir de pilhas de compostagem.

Algumas linhagens recentemente isoladas dessa espécie têm demonstrado atividades celulolíticas promissoras em estudos de cultivo em estado sólido (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI, 2015). Na Tabela 3.1, são apresentadas algumas das recentes linhagens de *Myceliophthora* utilizadas para secreção de celulases e seus respectivos substratos utilizados em alguns trabalhos da literatura.

Tabela 3.1: Produção de enzimas celulolíticas pela linhagem *Myceliophthora thermophila* ssp

Microrganismo	Substrato*	Referência
<i>M.thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	Casciadori (2015)
<i>M.thermophila</i> I-1D3b	FT com BC	Zanelato et al., (2012)
<i>M.thermophila</i> ACCC nº.30572	Mistura de carbono	Chen e Lou (2014)
<i>M.thermophila</i> M.77	BC e FT	Moretti (2012)
<i>M.thermophila</i> M.77	BC e FTe/ou FS	Kilikian (2014)
<i>M.thermophila</i> M.77	PM e papelão	Moretti (2012)
<i>M.thermophila</i> JPC	Glicerol, glicose e xilose	Pereira et al. (2015)
<i>M.thermophila</i> JPC 1-4	BC Ozonizada e FS	Pereira(2016)
<i>M.thermophila</i> (MYC)	Palha de arroz	Soni et al.(2008)

* BC: bagaço de cana de açúcar, FT: farelo de trigo FS: farelo de soja PM: palha de milho.

Sabe-se que cada microrganismo possui uma capacidade de secretar metabólitos em função da técnica de cultivo e dos substratos empregados em seu cultivo. Sabe-se ainda que dificilmente encontra-se na literatura dados a respeito do cultivo líquido do fungo *M. thermophila* I1D3b. Em posse do conhecimento de que o crescimento do fungo depende da presença de elementos nutritivos presentes no meio de cultivo, um melhor entendimento dos requerimentos nutricionais e das condições de cultivo utilizadas trará uma significativa contribuição ao desenvolvimento de processos que proporcionem um maior rendimento em biomassa e atividades enzimáticas.

3.2 Fatores nutricionais

Há tempos vem sendo provado que as fontes de nutrientes estão intimamente ligadas à capacidade dos microrganismos se desenvolverem e secretar metabólitos. Logo, para o desenvolvimento de um processo biotecnológico, o cultivo de células microbianas requer um meio de cultivo adequado, lembrando que esse meio deve suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para a síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial (SAGORRI, 2008).

Os meios de cultivo podem ser classificados em meios sintéticos ou complexos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Meios sintéticos por definição são aqueles com composição quimicamente definida e conhecida. Alguns microrganismos necessitam de um meio definido especificamente para seu crescimento, sendo denominados fastidiosos ou muito exigentes em termos nutricionais. Os meios complexos são aqueles que apresentam composição variável, bem como peptona, extratos de levedura, de carne e de plantas. Meios complexos também são usados quando as necessidades nutricionais de um microrganismo em particular não são conhecidas ou deseja-se estudar sua influência no desenvolvimento do microrganismo (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002; SAGORRI, 2008).

A célula dos microrganismos é constituída basicamente de água (80-90%), sendo esse um dos fatores importantes para o desenvolvimento do microrganismo. Quanto aos nutrientes essenciais para microrganismos destacam-se seis não metais (C, H, O, N, P, S) e dois metais (K, Mg), compreendendo aproximadamente 98% do peso seco de bactérias e fungos (SARAGORI, 2013). Carbono, oxigênio e hidrogênio são fornecidos na forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água e o nitrogênio sob a forma adequada, orgânica ou inorgânica (CARLILE; WATKINSON, 1997).

No meio de cultivo, os macronutrientes que recebem maior destaque são o carbono e o nitrogênio. Carbono constitui aproximadamente 50% do peso seco de bactérias e fungos, enquanto que nitrogênio contabiliza de 8 a 14% do peso seco de bactérias e fungos. Quanto a micronutrientes, na maioria dos cultivos sua ausência não causará a falta de crescimento do microrganismo, apenas resultará em um aumento da fase de adaptação (fase *lag*) e diminuição na taxa de crescimento e rendimento de produção de metabólitos de interesse. Isso pode ocorrer devido à substituição da função parcial do elemento por outro elemento traço (SARAGORI, 2013).

Como mencionado anteriormente, as fontes de carbono são um dos compostos mais importantes do meio de cultivo, pois, além de ser uma fonte de energia para a fermentação, participam da produção de metabólitos. Os principais compostos utilizados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) (FLORES et al., 2000). Na natureza, encontram-se várias fontes complexas de carbono tais como: amido, celulose e quitina. Estes polissacarídeos podem ser usados como fontes de energia para a maioria dos organismos vivos (VAN DER MAAREL;

QUINTANA; WAY, 2002). Celulose e amido são amplamente utilizados como fontes de carbono pelos fungos (MILES et al., 1995).

Dentre as fontes de carbono, destaca-se a glicose. No entanto, dependendo das necessidades particulares do microrganismo é necessário utilizar alguns derivados, como lipídeos, alcoóis, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados orgânicos (MOO-YOUNG, 1985). Entretanto, podem ser empregados outros compostos orgânicos como fonte de carbono, como amido, celulose, hemicelulose, ou compostos que depois de hidrolisados possam oferecer açúcares que sustentem o crescimento dos microrganismos. Geralmente, fungos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que podem hidrolisar amido (amilases), celulose (celulases), lignina (lignase), quitina (quitinase), proteínas (proteases), entre outras, sendo a produção dependente da espécie fúngica e das condições de cultivo (CARLILE; WATKINSON, 1997).

O nitrogênio é outro composto de extrema importância na célula, pois para a realização da tradução do RNA é necessário haver aminoácidos, os quais são compostos nitrogenados (CRUZ et al., 2001). A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados (CARLILE; WATKINSON, 1997). O nitrogênio pode estar disponível na forma de amônia gasosa, sais de amônio, uréia, ou compostos nitrogenados orgânicos. A deficiência de nitrogênio na formação dos aminoácidos ou amino grupos dentro do composto ou meio de cultura frequentemente limita o rendimento micelial (SINDEN; SCHISLER, 1962).

Existe uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos que podem ser utilizados para suprir esse elemento em um meio de cultivo. Praticamente todas as bactérias e fungos conseguem metabolizar a amônia (NH_4^+), pois é essa a forma na qual o nitrogênio é incorporado a compostos orgânicos da célula. Ele é adicionado no meio de cultivo na forma de sais como sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e cloreto de amônio (NH_4Cl) (MOO-YOUNG, 1985). Sendo assim, a amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, é reprimida a utilização de outras fontes nitrogenadas como nitrato, aminoácido e proteína (CARLILE; WATKINSON, 1997; COLEN, 2006).

3.2.1 Fontes de macronutrientes

3.2.1.1 Celulose e hemicelulose

A celulose é um polissacarídeo natural, denominado o recurso renovável mais abundante disponível. Está amplamente distribuída na natureza, ocorrendo tanto nas plantas primitivas como nas altamente evoluídas e, geralmente, encontra-se associada a outras moléculas como hemicelulose e lignina (MACHUCA, 1991). É um polímero de glicose fotossintetizado por energia solar em várias plantas, além de atuar como base estrutural da parede celular (RICHARDSON; GORTON, 2003).

A celulose é amplamente utilizada como matéria-prima pela indústria de papel para a produção de papel e produtos de papelão (BACHHETI et al., 2010; DUTT et al., 2011). É um homopolímero linear e bastante rígido que consiste em unidades de D-anidroglicopirranose. Estas unidades estão ligadas em conjunto por ligações glicosídicas β -(1-4) formadas entre C-1 e C-4 de porções de glicose adjacentes (KLEMM et al., 2001). Possui energia coesiva interna extremamente alta, devido ao seu alto teor de funções de hidroxilos. Consequentemente, não se dissolve prontamente nem em solventes orgânicos comuns, nem em água. A exploração da função OH da celulose produziu um dos primeiros polímeros semi-sintéticos (acetatos de celulose, nitratos, etc.).

A hemicelulose é definida como a fração da parede celular que pode ser extraída com álcali (MOHR; SCHOPFER, 1995). As hemiceluloses das plantas são polissacarídeos cuja natureza química varia de tecido para tecido e de espécie para espécie. Estes polissacarídeos são formados por diversas pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-metil-glucurônico e ácidos galacturônicos), frequentemente acetilados e formando cadeias ramificadas (MARTÍNEZ et al., 2005). São derivadas principalmente de cadeias de pentose, e atuam como um material cimentante, mantendo unidas as micelas e fibras de celulose (DEMIRBAS, 2008). A xilana é o principal polímero desta fração, e consiste num polissacarídeo composto de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas, contendo ramificações de pentoses e hexoses (BEG et al., 2001).

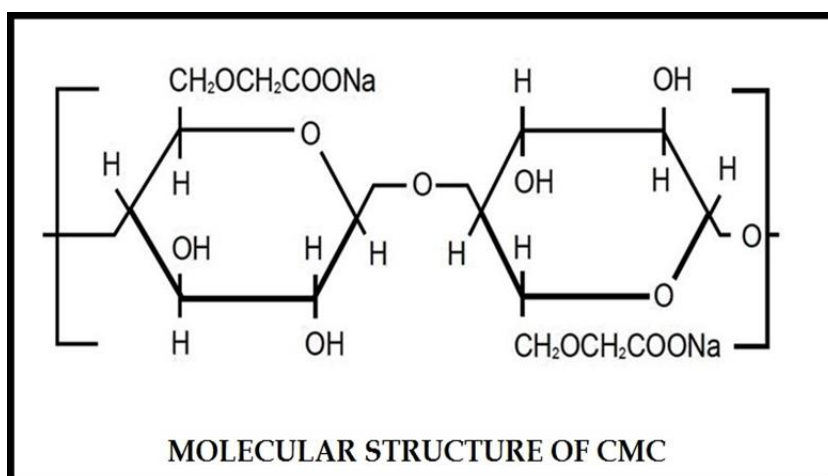
Os derivados de celulose que são sintetizados a partir de resíduos naturais possuem diversas propriedades físico-químicas possibilitando uma ampla gama de aplicações. Alguns dos derivados de celulose são carboximetilcelulose (CMC), metilcelulose,

hidroxipropil celulose e hidroxipropilmetil celulose (OLIVAS; BARBOSA-CANOVAS, 2005).

A celulose é comumente convertida em derivados úteis por esterificação. Dentre estes, encontra-se a carboximetilcelulose de sódio (CMCNa), a qual é obtida através da esterificação do grupo hidroxila de macromoléculas de celulose por ácido monocloroacético (MCA). A carboximetilcelulose (CMC) foi o primeiro derivado de celulose descoberto, por volta de 1920 a 1930, seguida de metilcelulose e hidroxietilcelulose. Estes três tipos de éter de celulose e suas misturas, derivados tais como metilhidroxietilo, metilhidroxipropilo e a hidroxipropilmetilcelulose, ainda dominam o mercado devido às suas propriedades multifuncionais.

Carboximetilcelulose geralmente conhecida como goma de celulose, sendo um polímero aniônico solúvel em água. Sua solubilidade em água é conseguida através da introdução de grupos carboximetilo ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) ao longo da cadeia de celulose, o que torna possível a hidratação da molécula (Figura 3.1). É insolúvel em muitos solventes orgânicos como metanol, etanol, propanol, acetona e assim por diante. Possui diversas aplicações, como em alimentos, indústrias têxteis e de papel, indústrias de cosméticos, farmacêuticas e de detergentes, além de aplicações agroindustriais (BARBA, 2002; BONO, 2009, MANSOURI et al., 2015). Após purificada, a CMC em forma de pó apresenta cor branca a creme, insípida, inodora (MARIO et al., 2005).

Figura 3.1: Representação esquemática da estrutura molecular de carboximetilcelulose (CMCNa).



Em virtude de suas propriedades físico-químicas e biológicas, a CMC possui diversas aplicabilidades, é muito útil em sistemas onde os colóides hidrofílicos estão envolvidos, apresenta capacidade de suspender sólidos em meio aquoso, estabilizar emulsões, absorver a umidade da atmosfera, solubilizar proteínas (proteínas do leite, proteínas do ovo), engrossar soluções (soluções açucaradas, tintas), revestimento (filmes), além de colóides protetores em indústrias alimentares, farmacêuticas, medicamentos, agricultura e tratamento de águas residuais. (DAPI; SANTOS; PARAJU et al., 2003; SAPUTRA et al., 2014).

Entre todos estes produtos celulósicos modificados, a CMC é fabricada em quantidades significativas devido às suas amplas aplicações comerciais em relação à demanda por volume. Logo, em razão da sua diversidade de aplicações, juntamente com seus preços baixos, a CMC, tornou-se um dos principais acionistas do mercado em todas as categorias de produtos de éter de celulose.

Existem dois processos principais ao sintetizar a CMC. Em primeiro lugar, é necessário isolar os compostos celulósicos presentes nas plantas aquáticas para que eles não interrompam a produção da CMC. *Eichhornia crassipes* é um tipo de planta que é muito rica em celulose e assim pode ser obtida com a finalidade de um produto mais valioso. Além das celulosas, as plantas aquáticas também são compostas de hemicelulosas, bem como de lignina. Esses dois compostos indesejáveis precisam ser removidos para que apenas as celulosas sejam adquiridas. Quando as celulosas são finalmente obtidas, o processo de conversão de celulose em um composto derivado pode ser montado. Existem duas reações principais para converter celulose em CMC: o primeiro procedimento é a alcalinização e a segunda reação é seguida pela carboximetilação (SAPUTRA, 2014).

Sendo assim, carboximetilcelulose (CMC) é um derivado químico de celulose que além do nome carboximetilcelulose, possui sinônimos como, sal de sódio carboximetil éter de celulose, carboximetilcelulose de sódio, glicolato de sódio celulose, sal de sódio de ácido celulose glicólico.

3.2.1.2 Papel como fonte de celulose

O papel é um composto de origem vegetal obtido à partir da sobreposição artificial de fibras celulósicas. Sua composição pode variar em função da matéria-prima utilizada para sua obtenção, entretanto de maneira geral, seu principal constituinte é a celulose, encontrado na parede celular das plantas (SOUZA; ALVES 2014).

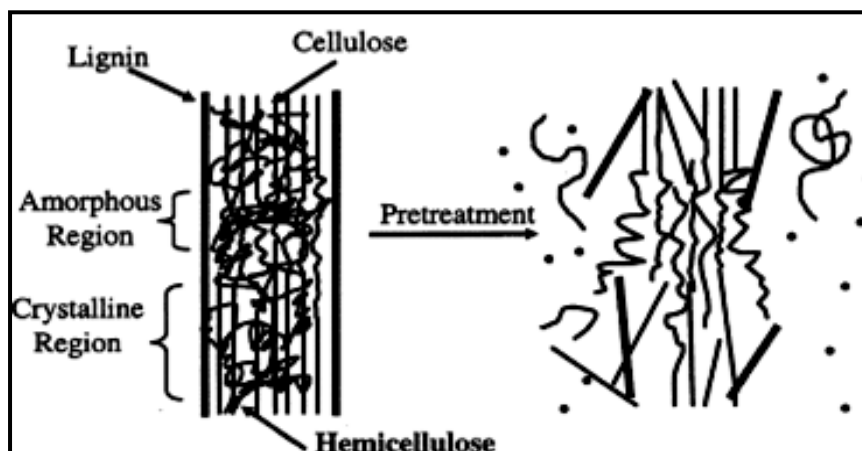
Os componentes majoritários do papel são celulose, hemicelulose e lignina. Tanto hemicelulose quanto lignina, também são macromoléculas encontradas na parede celular das plantas. A lignina confere a resistência ao papel, sendo assim, quanto maior a concentração de lignina maior a resistência do papel (LEAL, 2014). Spier (2005), ao analisar papéis residuais de escritório, encontrou a seguinte composição: 68% celulose, hemicelulose 12,4% e lignina, 11,3%.

O papel é um dos resíduos de biomassa celulósicas mais abundantes, produzidos em grande quantidade para diversos fins (GULSO; KUSTAS; ERENTUKK, 2013). Apesar de o papel poder ser reaproveitado, o número de vezes em que pode ser reprocessado nas indústrias de papel é limitado devido ao encurtamento do comprimento da fibra e à redução resultante da resistência à tração, destinando o restante do papel não aproveitado para aterros sanitários (ADHIKARI et al., 2008). Sendo assim, as fibras ricas em celulose, oriundas da fabricação de papel, são descartadas com as águas residuais do processo (NIKOLOV et al., 2000).

Visto que o material composto por resíduos celulósicos representa uma fonte em potencial de açúcares fermentescíveis, sua conversão em produtos, bem como substratos úteis para uso industrial, acarretaria a diminuição de diversos problemas socioeconômicos, além de proporcionar uma abordagem mais ecológica (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; TAHERZADEH; NIKLASSON; LIDEN, 1999; JOSHI et al., 2015).

Apesar de o material vegetal celulósico representar uma fonte ainda não utilizada de açúcares fermentáveis, existem muitos fatores físico-químicos estruturais e de composição que impedem a digestibilidade enzimática de celulose presente na biomassa lignocelulósica. Sendo assim, é necessário um pré-tratamento para alterar a estrutura da biomassa celulósica, a fim de tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis, como representado no diagrama esquemático da Figura 3.2. O objetivo é quebrar a lignina e perturbar a estrutura cristalina da celulose (SPIER, 2005).

Figura 3.2: Efeito do pré-tratamento sobre material lignocelulósico



A celulose do papel é de natureza altamente amorfa, portanto, ao contrário da celulose comercialmente disponível, é mais acessível a mudanças químicas (ADHIKARI et al., 2008). Em virtude dessa afirmação, Joshi et al., (2015) utilizaram biomassa rica em celulose, ou seja, papéis de escritório como uma matéria-prima alternativa para produção de CMC. O mesmo afirmou que, o papel misto de escritório possui alta celulose, baixo teor de lignina e menos teor de tinta em comparação com o desperdício de papel de jornal ou outros tipos de resíduos de papel, apresentando assim alto potencial para subutilização.

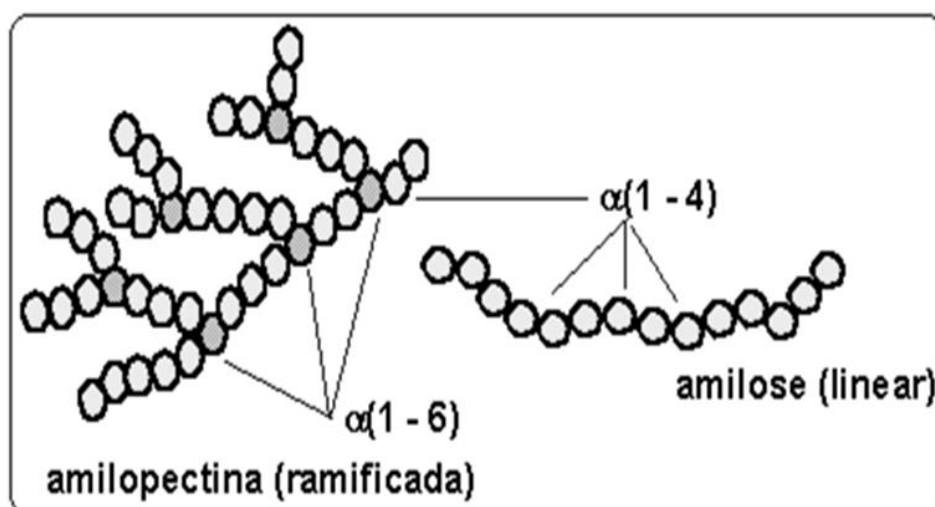
Ainda se tratando do trabalho de Joshi et al., (2015) os autores apresentaram um rendimento do produto CMC de 1,508g/g, obtido em condições otimizadas (NaOH 0,094M; SMCA 0,108M; temperatura 50°C, tempo de reação 3h), com viscosidade semelhante à carboximetilcelulose de qualidade comercial, DS máximo (1,07). Verificou-se que o pó de papel residual (tamanho de malha 60) contém teor de umidade ($8,28 \pm 0,63\%$), alfa celulose ($78,52 \pm 2,19\%$), pentosanas ($7,42 \pm 0,16\%$), lignina ($2,33 \pm 1,06\%$), cinza ($3,50 \pm 0,20\%$) e solubilidade em água quente ($2,10 \pm 0,20\%$). A presença de $78,52 \pm 2,19\%$ de teor de alfa celulose torna o papel de escritório uma matéria-prima prospectiva para produtos de celulose modificados, demonstrando assim um potencial de utilização imediato para o papel já utilizado, viabilizando a exploração desse material de uma maneira alternativa viável de sustentável.

3.2.1.3 Amido solúvel

O amido é um polímero de glicose de alta massa molecular, sendo juntamente com a celulose, um dos polímeros de origem vegetal mais amplamente disponível na natureza (BECK; ZIEGLER, 1989). Considerado como um dos principais componentes da dieta humana e de outros animais, o amido apresenta grande importância nutricional e industrial. O amido está presente na produção de quatro setores industriais: agroalimentar, papelero, químico e têxtil. Quando necessário, podem ser química, física ou enzimaticamente modificado (DENARDIM, 2009).

A legislação brasileira é uma das poucas do mundo a distinguir a fécula do amido. Nestas normas, considera-se amido a fração extraída da parte aérea das plantas e fécula é denominada a fração amilácea extraída de raízes, tubérculos e rizomas (LIMA et al., 2001). Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina (Figura 3.3). A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear. Enquanto que, a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4, sendo fortemente ramificada, com 4% a 6% das ligações em α -1,6. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006; TESTE; KAKKALAS; QI, 2004, VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004).

Figura 3.3: Representação das moléculas constituintes do amido



Geralmente, a amilose é composta de aproximadamente 1000 unidades de glicose e a amilopectina é composta de uma cadeia curta com ligações lineares (α -1,4) contendo de 10 a 60 unidades de glicose e um lado com uma cadeia contendo ligações α -1,6 com 15 a 45 unidades de glicose (SOCCOL et al., 2005).

Os parâmetros que estimulam a produção de amilases, as condições de crescimento microbiano e os substratos de carbono usados no meio de cultivo têm recebido atenção especial. Fontes de carbono como dextrina, frutose, glicose, lactose, maltose, amido solúvel, além de outras, encarecem sua produção (HAQ et al., 2002). No meio de cultivo, esses substratos podem ser substituídos por produtos e subprodutos agrícolas de baixo custo, o que torna a produção dessas enzimas mais viável economicamente, tais como farelo de trigo, resíduos de milho e mandioca (MINAFRA, 2007).

Estudos sobre a possibilidade de indução de enzimas amilolíticas não são recentes, autores como Fellows (1994), Pandey et al. (1999) e Gupta et al. (2003), afirmam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer a indução da produção de amilases por fungos, leveduras e bactérias. Pesquisadores mais recentes como Anto, Trivedi e Vatel (2006), Brasiliano et al., (2013), Minafra (2007), Spier (2005) e Paris et al., (2012) também tem averiguado a importância de uma fonte de amido como indutor de amilase.

3.3 Enzimas

As enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores, animais superiores e microrganismos, de origem fúngica ou bacteriana. Dentre as enzimas se destacam as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulasas, fitases, e glicose-isomerases. As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam (HARGER; SPRADA; HIRATSUKA, 1982).

As enzimas obtidas de plantas e microrganismos são as mais utilizadas, por possuírem faixas mais amplas de pH, temperatura, especificidades de substrato e o menor custo de obtenção. Dentre os microrganismos, os fungos são reconhecidos como agentes da decomposição de matéria orgânica em geral e celulose, em particular, que produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas essenciais para suportar o seu crescimento (ARCHER; WOOD, 1994).

Em virtude da vasta possibilidade de aplicações das enzimas, tem-se intensificado os investimentos em pesquisa com a finalidade de aperfeiçoar seu processo de obtenção. A crescente demanda por enzimas vem sendo intensificada ainda pelas necessidades alimentares específicas, tendo como exemplo a incidência em distúrbio de enzimas digestivas, o que consequentemente potencializa o uso de enzimas nas indústrias de fármacos (BEHERA; RAY, 2016). Outro fator que colabora para o esperado crescimento de mercado de enzimas nos próximos anos é a disseminada consciência dos consumidores em relação à melhoria da qualidade de alimentos, juntamente com a alta base de população (GUZMAN, 2013; KUHAD et al., 2016).

3.3.1 Celulases

Dentre o grupo de enzimas destacam-se as celulases que, por virtude da sua eficaz capacidade de despolimerizar a biomassa de resíduos agrícolas em açúcares fermentáveis por meio de uma rota ecologicamente amigável, vêm adquirindo atenção na comunidade científica e tecnológica, visando como objetivo final a produção de biocombustíveis à partir de biomassa de planta, a qual está sendo uma alternativa sustentável para aumentar a produção de combustível sem afetar a disponibilidade de terras agrícolas para a produção de alimentos (CASCIATORI; LAURENTINO; ZANELATO, 2015).

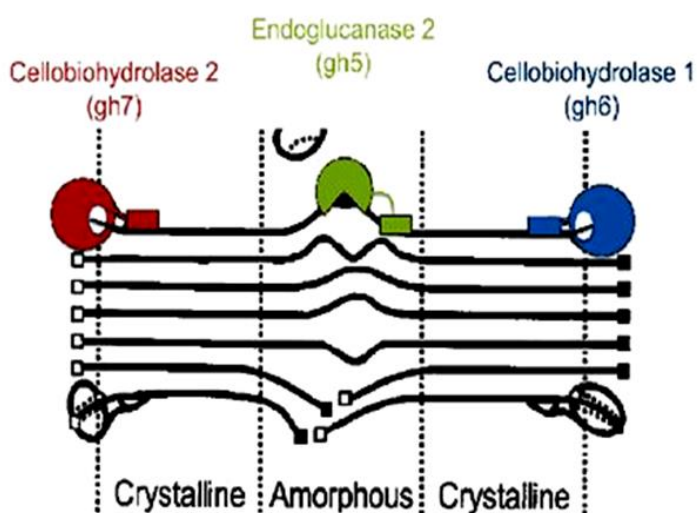
As enzimas celulolíticas estão amplamente distribuídas na natureza, são encontradas em plantas, insetos e microrganismos (BAYER, 2009). Os microrganismos são fontes preferenciais de celulases, devido à ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (YEOMAN et al., 2010). Entre os microrganismos, grande variedade possui a capacidade de secretar celulases, tais como bactérias aeróbias e anaeróbias, e fungos. Por apresentarem diversas vantagens em função do grande potencial de secreção desse grupo de enzimas, vêm apresentando específico interesse os fungos filamentosos (GOMES et al., 2007; ÖGEL et al., 2001).

Diversas são as aplicações das celulases, dentre as aplicações, tem despertado específico interesse nas indústrias de biocombustíveis, porém o alto custo das celulases é atualmente o fator limitante da produção de etanol de segunda geração (SIQUEIRA et al., 2011). Para solucionar este problema, algumas estratégias podem ser usadas, como o uso de microrganismos com altas taxas de produção das enzimas e a utilização de processos fermentativos com menor custo (GAO et al., 2008). Nesse aspecto, o cultivo em estado

sólido foi usado para produzir celulases, hemicelulases e ligninases de uma variedade de biomassas, como, bagaço de cana, farelo de trigo, palha de arroz, casca de soja, serragem, bagaço e casca de laranja, sabugo e palha de milho (CASCIATORI et al., 2015; KILIKIAN et al., 2014; MORETTI, 2012; PINTO, 2010; ZANCHETA, 2012).

Para a hidrólise eficiente de celulose, são necessários basicamente três tipos de enzimas que atuam em sinergia: endoglucanase (CMCases), responsável pela quebra das ligações glicosídicas internamente às cadeias poliméricas aleatoriamente à parte amorfa do substrato, resultando em rápida redução do grau de polimerização. As celobiohidrolases, igualmente nomeadas como exoglucanases, possuem a capacidade de atacar as extremidades cristalinas de celulose, resultando em celobiose (dímeros de glicose). E por fim, a β -glicosidade que hidrolisa a celobiose resultando monômeros de glicose, como pode ser visto na Figura 3.4 (LIU et al., 2012).

Figura 3.4: Representação esquemática do mecanismo de ação das celulases sobre a celulose



(extraído <http://www.cchem.berkeley.edu/>)

Vários estudos demonstram a existência de microrganismos produtores de celulases em diversos substratos. Entretanto, é difícil comparar as estirpes microbianas para a produção de celulase devido às diferenças nas condições de fermentação, da composição do meio e substratos utilizados, além da secreção de celulases ser influenciada por vários parâmetros do processo, incluindo o pH do meio, a temperatura de cultivo e nutrientes.

Outro fator limitante na comparação direta do rendimento das atividades das celulasas está vinculado a diferenças nos métodos de ensaio e a forma como as atividades são expressas (KUHAD et al., 2016).

3.3.2 Xilanases

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas responsáveis pela quebra das fortes ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose. A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de clivar as cadeias laterais. A endo β -1,4 xilanase forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana, trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI, STENDYE; RAO, 1999). De acordo com Biely (1985) e Polizeli et al., (2005), as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -1,4 xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase).

A hidrólise de diferentes xilanas por xilanases dão origem a diversos produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xiloses, xilobioses e xilotriosos liberadas, assim como a natureza dos açúcares com ácido urônico substituídos (BIELY, 1985). Os xilooligossacarídeos são os principais produtos formados pela ação desta enzima. As β -xilosidases atuam sobre a xilobiase e os xilooligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de xilose. É uma enzima importante no processo por evitar que as endoxilanases sejam inibidas pelos seus próprios produtos de degradação. Ainda existem as exo- β -L-arabinofuranosidase (hidrolisa as ligações das ramificações de arabinoses), endo-1,5- β -L-arabinofuranosidase (ativa apenas quando próxima às arabinoses lineares), β -D-glucuronidases, endo-1,4- β -D-mananases, β -manosidases, acetil xilana esterases, α -glucuronidases, α -galactosidases e esterases ácidas ferúlicas (JORGENSEN; KKISTENSEN, FERBY, 2007; POLIZELI et al., 2005).

3.3.3 Amilases

As fontes de carbono amiláceas são os principais substratos para secreção de enzimas amilolíticas (GUPTA et al., 2003). Devido às enzimas serem denominadas de

acordo com o substrato sobre o qual atuam, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%). Uma propriedade singular das enzimas hidrolíticas é a sua grande especificidade pelo substrato hidrolisando um substrato particular (HARGER; SPRADA; HIRATSUKA, 1982). Ao ser hidrolisado, o amido produz carboidratos de cadeia curta, tais como dextrinas, maltopentose, maltotetose, maltose e finalmente glicose (CRUEGER; CRUEGER, 1984).

Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações em alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel. Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial (GUPTA et al., 2003; PANDEY, 2003).

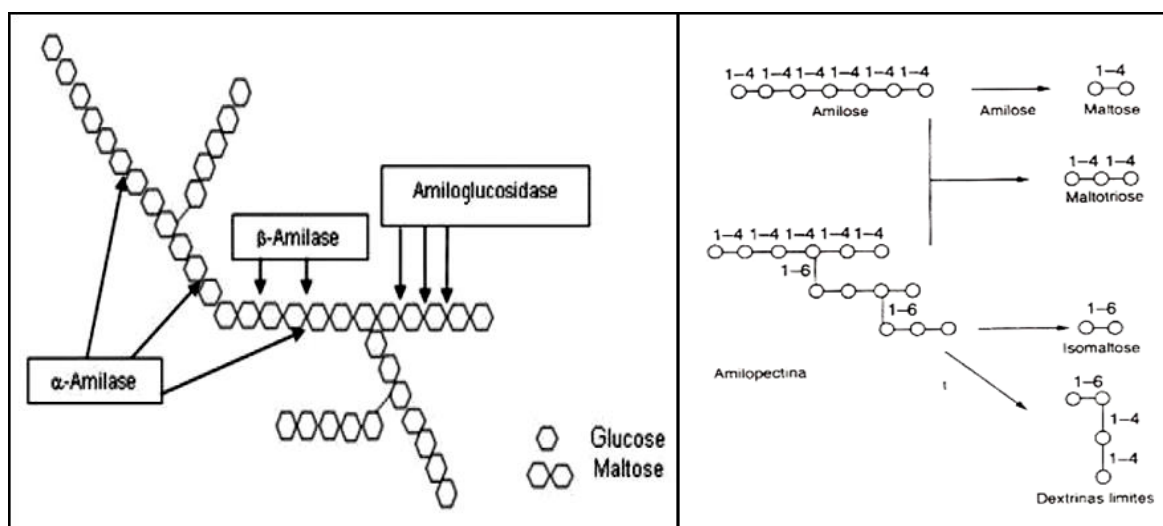
Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. As principais aplicações das enzimas extracelulares que degradam o amido consistem na conversão do amido em monossacarídeos como a glicose, em dissacarídeos como a maltose e em oligossacarídeos como as dextrinas. As enzimas que degradam o amido também são empregadas na obtenção de açúcares fermentescíveis utilizados nas indústrias cervejeiras, na produção de bebidas alcoólicas e na modificação de farinhas empregadas em panificação (WARD, 1989).

As amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam à partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos (GUPTA et al, 2003). Logo as amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (SPIER, 2005).

A Figura 3.5, mostra uma representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas sobre uma molécula de amido, que é considerada molécula polissacarídica. De uma forma mais explicativa, a α -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao

acaso as ligações α -1,4 por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glicose. A β -amilase ataca a extremidade não redutora da amilose, dando sucessivas unidades de maltose. A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. Desse modo, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original, denominado dextrina limite, é o produto dessas enzimas. Outra enzima, a α -1,6 glucosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glicose e maltose (CONN; STUMPF, 1975).

Figura 3.5:Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas (α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase)



Fonte: CONN; STUMPF, 1975

De maneira geral, as enzimas amilolíticas apresentam potencial de aplicação industrial em vários setores, como o alimentício na produção de xaropes e de ciclodextrinas, na panificação e na formulação de ração animal, e nos setores farmacêutico e químico. Dessa forma, microrganismos produtores de enzimas termoestáveis e com boa atividade amilolítica, os quais visem à diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade dos produtos de hidrólise, são interessantes para o setor industrial (BRASILIANO et al., 2013). Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo também têm sido utilizados para produção econômica de α -amilase por CES como também no cultivo líquido em superfície (GUPTA et al., 2003; TUNGA; TUNGA, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios desta dissertação foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP. A pesquisa foi realizada em parceria com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado em Campinas-SP.

4.1 Materiais

Foi utilizado o fungo filamentosso termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, pertencente ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE/UNESP, isolado de pilhas de bagaço de cana de açúcar de Olímpia – SP pela Prof. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins do IQ/UNESP – Araraquara – SP. As culturas-estoque do fungo foram mantidas em meio de cultura Agar-Sabouraud-Dextrose (ASD), em temperatura ambiente, sob óleo mineral.

4.1.1 Pré-inóculo e solução nutriente

Para o cultivo, foi feito um pré-inóculo em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio nutriente ASD inclinado. O microrganismo foi inoculado na superfície deste meio por estrias e incubado a 45°C por 96 horas. Após este período, o micélio foi suspenso em 100 mL de água destilada acrescida de Tween 80 (0,01%). Uma alíquota de 1mL dessa suspensão foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, sendo a concentração de esporos padronizada em 5.10^8 esporos por L^{-1} .

Para o cultivo submerso foi utilizada a solução nutriente adaptado de Mandels e Reese (1960), composta por ($g.L^{-1}$): KH_2PO_4 (2,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3), $CaCl_2$ (0,1), Tween 80 (2,0) e solução de sais composta por ($mg.L^{-1}$): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,00), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (1,56), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,40) e $CoCl_2$ (2,00). O pH do meio foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH ou HCL.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL do meio nutriente e uma alíquota da solução do pré-inóculo contendo 5.10^8 esporos por L^{-1} . O cultivo ocorreu a 45°C, durante 5 dias. Após os ensaios, os meios cultivados foram filtrados à vácuo, em filtro de papel (Whatman N°1), para garantir que toda biomassa fosse

retirada do Erlenmeyer este era lavado com água destilada e filtrado novamente. O filtro contendo o material cultivado foi seco a 100°C por 24 h, após o que foi utilizado como indicador do crescimento microbiano. O filtrado foi empregado como extrato enzimático bruto. Todos os experimentos e as análises foram realizados em triplicatas.

4.2 Método experimental

4.2.1 Ensaios preliminares

Estes ensaios foram realizados a fim de avaliar a influência de fonte orgânica e inorgânica de nitrogênio na obtenção de biomassa micelial e atividade enzimática.

Inicialmente foi realizado empregando-se 20 mL de solução nutriente (descrita no item 4.1.1) e farelo de trigo (10 g.L⁻¹) como fonte de carbono. Como fontes de nitrogênio (1 g.L⁻¹) foram empregados peptona (P) e sulfato de amônio (S), além da combinação peptona:sulfato (P+S) (proporção em peso 1:1). Os resultados foram avaliados em função de crescimento micelial (biomassa seca) e atividade enzimática de CMCase e xilanase. O micélio seco foi separado do farelo a partir da lavagem da biomassa com água destilada e posterior filtragem a vácuo.

Após este ensaio, o fungo foi cultivado tendo glicose (10 g.L⁻¹) como fonte de carbono e fixando concentração das fontes de nitrogênio em 0,5 e 1 g.L⁻¹, e variando a proporção destas fontes num total de três tratamentos, sendo as proporções P+S as seguintes: 2:1, 1:1 e 1:2. Como resposta foi determinada a biomassa micelial.

4.2.2 Variação da concentração da fonte de carbono glicose

Neste experimento o fungo foi cultivado tendo glicose como fonte de carbono em concentrações variadas e empregou-se a melhor combinação das fontes de nitrogênio obtidas no item 4.2.1, peptona e sulfato de amônio (P+S) de 1 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹, respectivamente. As concentrações de glicose empregadas foram 2,5; 5; 7,5 e 10 g.L⁻¹. Os resultados foram avaliados em termos de biomassa fúngica e açúcares redutores totais.

4.2.3 Variação das fontes de nitrogênio

Nestes ensaios foram empregados peptona (P) e extrato de levedura (E) como fontes de nitrogênio orgânico, com concentração fixa de sulfato de amônio (fonte inorgânica). Para que fosse feito o correto balanceamento do teor de nitrogênio de cada uma destas fontes, foram feitas análises do teor total de nitrogênio destes materiais pelo método de nitrogênio total de Kjeldahl. Além disso, estas fontes foram caracterizadas quanto à matéria mineral e açúcares redutores totais.

Após esta caracterização, foram elaborados quatro tratamentos, sendo estes determinados em função da concentração de nitrogênio presente na peptona e no extrato de levedura. A massa de substrato foi calculada a fim de oferecer concentrações de nitrogênio de 10 e 13%, proporcionando assim os seguintes tratamentos: P13% (1 g.L⁻¹), P10% (0,7692 g.L⁻¹), E13% (1,3 g.L⁻¹) e E10% (1 g.L⁻¹). Os experimentos foram realizados na concentração de 10 g.L⁻¹ de glicose. Foram avaliados biomassa micelial e açúcares redutores totais consumidos ao longo de 120 horas de cultivo.

4.2.4 Variação das fontes de carbono

Nesse experimento foi avaliado o efeito de diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L⁻¹) sobre o crescimento do fungo, sendo o cultivo realizado a 48, 84 e 120 horas. As fontes de carbono escolhidas foram amido solúvel, carboximetilcelulose (CMC) e papel de filtro. Como fontes de nitrogênio foram empregados peptona e sulfato de amônio, nas concentrações de 1 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹, respectivamente.

Posteriormente, avaliou-se a ação dessas fontes de carbono em conjunto com glicose, seguindo-se o mesmo procedimento. A concentração final da fonte de carbono escolhida, acrescida de glicose, foi de 10 g.L⁻¹, sendo as concentrações individuais (Fonte + Glicose) iguais feitas em uma série crescente de concentrações da fonte de carbono (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 g.L⁻¹) e outra decrescente (7,5; 5,0; 2,5 e 0 g.L⁻¹). Foram obtidos resultados de biomassa fúngica, açúcares redutores totais consumidos e atividade enzimática (celulase, xilanase e amilases).

4.2.5 Determinação da atividade enzimática

As enzimas avaliadas foram endoglucanase (CMCase), xilanase, e amilases, as quais são de interesse do nosso grupo de Bioenergia. Além de que, em função da composição dos substratos utilizados, os quais apresentavam em sua composição, celulose, hemicelulose, amilose e açúcares solúveis, favorecem a secreção dessas enzimas.

4.2.5 .1 Endoglucanases (CMCase)

A atividade de endoglucanase foi determinada pelo método proposto por Ghose e Bisaria (1987), sendo as amostras constituídas por 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de suspensão a 4% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC – Sigma-Aldrich) em tampão acetato (0,1 M, pH 5,0). A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3- dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959). Em seguida, essa solução foi mantida em água em ebulição por 10 minutos, sendo a reação interrompida com o abaixamento súbito da temperatura em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 8,0 mL de água destilada à solução e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de enzima foi calculada com base em uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação por mL de extrato enzimático.

4.2.5.2 Xilanases

A atividade de xilanase foi determinada pelo método proposto por Ghose e Bisaria (1987), a partir da reação entre 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de solução 4% (p/v) de xilana (Sigma-Aldrich) em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. A reação foi mantida a 70°C por 10 minutos, sendo interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados (MILLER, 1959). O açúcar redutor foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm, tendo uma curva padrão de glicose como referência. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de açúcar redutor do substrato por minuto.

4.2.5.3 α amilases

A atividade de α amilase foi determinada usando-se o método proposto por Bernfeld (1955), para quantificar açúcares redutores, expressos em glicose, liberados pela ação enzimática, a partir da reação entre 250 μ L do extrato enzimático bruto e 250 μ L de amido à 1% (p/v), dissolvido em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos, sendo interrompida pela adição de 100 μ L do reagente DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados. As amostras foram incubadas em banho fervente por 5 minutos, retiradas e levadas ao banho de gelo. Após o resfriamento, foi adicionado 1,0 mL de água destilada nos tubos. Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria a 540 nm, tendo uma curva padrão de glicose como referência. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de açúcares redutores do substrato por minuto.

4.2.6 Caracterização dos substratos

4.2.6.1 Análise de cinzas

Para a determinação de cinzas ou matéria mineral (MM), as amostras foram incineradas na temperatura de 550°C $\pm$ 10 por 24 horas. Após esta etapa, foram calculadas as percentagens de cinzas, resultados da calcinação (AOAC, 2005).

4.2.6.2 Análise de nitrogênio total

O nitrogênio total foi determinado pelo método Micro Kjeldahl (AOAC, 2005). As amostras utilizadas como fonte de carbono e de nitrogênio (0,5 g) foram digeridas em bloco digestor com H₂SO₄ concentrado e na presença de mistura de catalisadores. Após diluição com água, foi adicionado NaOH em excesso para converter o Nitrogênio fixo em NH₄OH, destilável. O destilado foi recolhido em solução de ácido bórico e titulado com solução padronizada de HCl 0,1 N. O conteúdo de nitrogênio na amostra foi determinado pela Equação 1.

$$N(\%) = Vol_{HCl} \times \frac{N}{10} \times 0,014 \times \frac{100}{Peso_{amostra}} \quad (1)$$

Onde, Vol_{HCl} é o volume gasto na titulação com HCl; $N/10$ é a normalidade de HCl 1N diluído 10 vezes; e 0,014 equivale ao fator do ácido H_2SO_4 a nitrogênio.

4.2.6.3 Determinação quantitativa de açúcares redutores totais

A determinação da concentração de açúcares redutores totais solúveis nos substratos foi realizada pelo método de Miller (1959).

4.2.6 .4 Umidade

A determinação de umidade foi realizada por meio de analisador de umidade, Ohaus MB45 (Ohaus Corporation, Parsippany, EUA). Foram pesados 1 grama de amostra utilizada como fonte de carbono ou de nitrogênio e inserida no analisador, o qual quantificou umidade em base seca.

4.2.7 Análises estatísticas

A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos empregados foi determinada através do teste de Análise de Variância (ANOVA), realizado com o *software Minitab versão 16.0* (Minitab Inc., State College, EUA) com nível de significância de 0,5 %. Comparações entre médias foram feitas através do teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) a 0.5 % de significância.

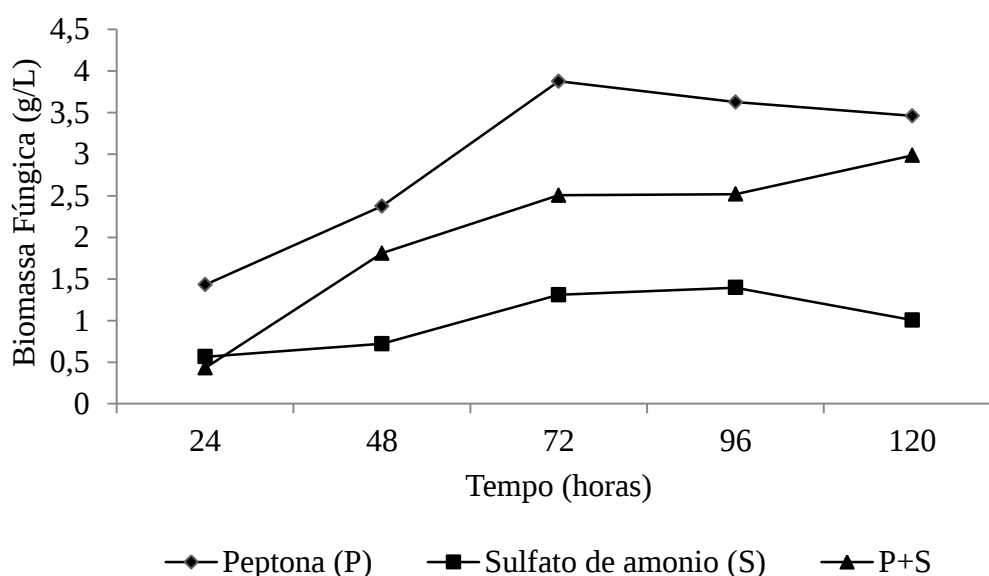
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaios preliminares

Nestes ensaios foram avaliados os efeitos de fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, peptona e sulfato de amônio, respectivamente, sobre a produção de biomassa fúngica, tendo farelo de trigo como fonte de carbono. No ensaio subsequente, as concentrações das fontes de nitrogênio foram variadas para a avaliação da síntese de enzimas.

Os resultados da primeira etapa são apresentados na Figura 5.1, onde é possível observar uma representação típica da curva de crescimento microbiano. A maior produção de biomassa foi observada no cultivo constituído por peptona, seguido pelo cultivo constituído pela combinação de peptona e sulfato de amônio. Segundo Gern (2005), a adição de nitrogênio inorgânico leva, em geral, a um decréscimo na produção biomassa, afirmação constatada na Figura 5.1, em que as concentrações de biomassa alcançada quando utilizado somente peptona é muito superior à alcançada quando usado somente sulfato de amônio.

Figura 5.1: Crescimento fúngico estimado pela quantificação de biomassa seca em cultivo semi-sólido com farelo de trigo, variando-se a fonte de nitrogênio



Nota-se que o resultado médio dos cultivos com a fonte de nitrogênio P foi 43,9% maior que com P+S, e este 105,41% maior do que com S, demonstrando que a fonte de nitrogênio orgânica contribuiu para o crescimento da biomassa. O fato da biomassa ter se reduzido após as 72 h para a fonte P pode estar relacionado às restrições na oferta de nitrogênio e a provável autólise das hifas mortas do fungo.

Os efeitos das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico sobre a produção de biomassa também foram avaliados por Burns et al. (1994), no cultivo líquido de *Pleurotus sp. florida*, em diferentes fontes de carbono como glicose, galactose e lactose, e fontes de nitrogênio como extrato de levedura e fosfato de potássio, onde foram observados melhores resultados em termos de biomassa quando maiores concentrações de nitrogênio orgânico foram utilizadas. Os autores relatam também que a substituição do nitrogênio orgânico (asparagina e fenilalanina) por nitrogênio inorgânico (tartarato de amônio) levou a resultados bem inferiores. Comportamento semelhante foi observado por Xu et al. (2003), cultivando *Paecilomyces tenuipes* C240 com extrato de levedura, fosfato de amônio, nitrato de potássio, peptona, dentre outras, atuando como fonte de nitrogênio em cultivo submerso também em diferentes fontes de carbono, os quais observaram um decréscimo na concentração de biomassa quando fontes de nitrogênio inorgânico (tartarato de amônio e nitrato de potássio) foram utilizadas em substituição às fontes orgânicas.

Os resultados obtidos neste experimento corroboram aos descritos por Tonial et al. (2000), que observaram para os meios compostos apenas por nitrogênio inorgânico uma menor produção de biomassa micelial de *Volvariella volvacea* em cultivo submerso com resíduo de batata e mandioca. Pita (2012), ao analisar a influência das fontes de nitrogênio (como sulfato de amônio, glutamato, glutamina ou prolina) na fisiologia e expressão gênica da levedura *Dekkera bruxellensis* em cultivo em estado sólido com farelo de trigo, encontrou melhores valores em termos de produção máxima de biomassa quando as concentrações de nitrogênio orgânico eram superiores à concentração de nitrogênio inorgânico.

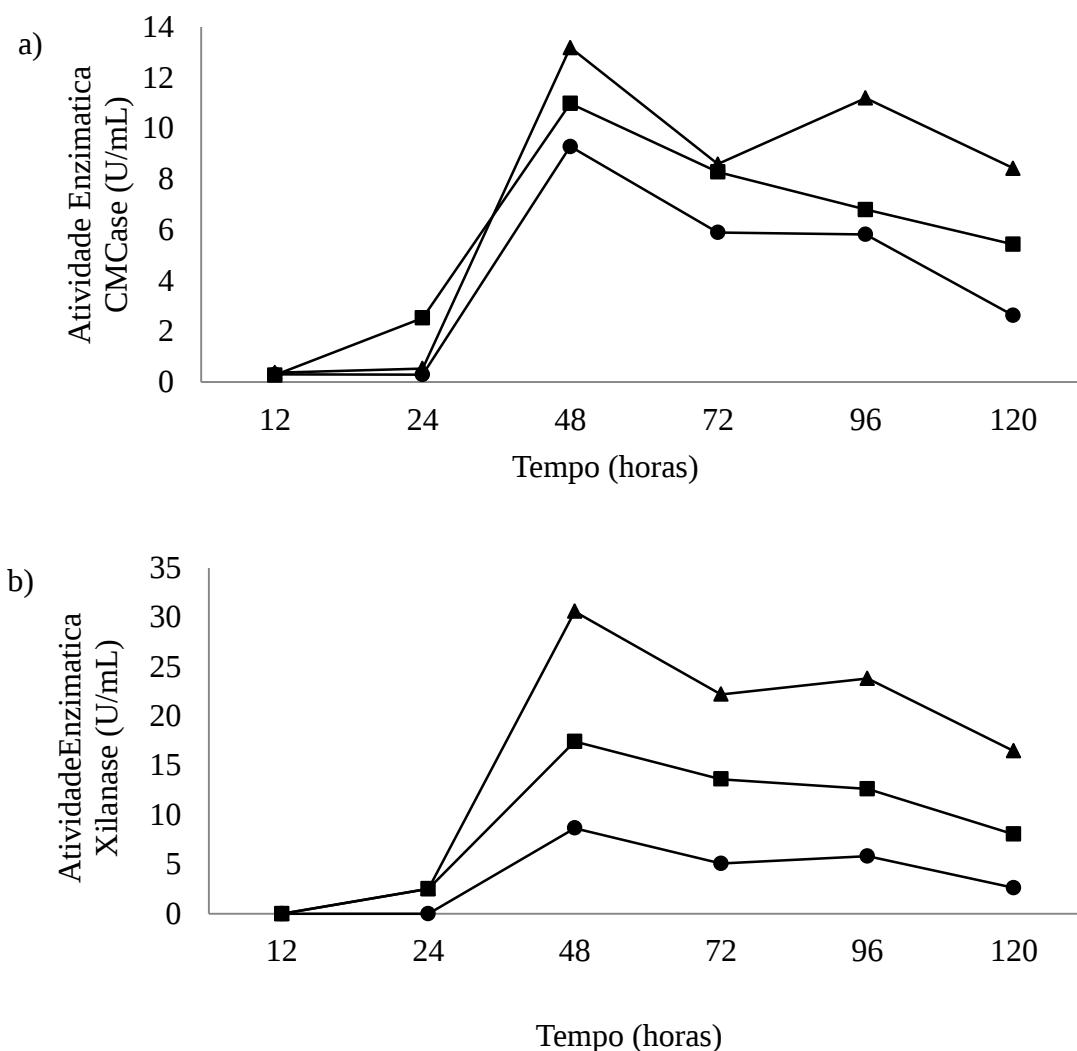
Jonathan e Fasidi (2001) avaliaram o efeito nitrogênio orgânicos e inorgânicos (peptona, extrato de levedura, uréia, extrato de malte e hidrolisado de caseína, nitrato de sódio e sulfato de amônio) sobre o crescimento de *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), em cultivo submerso. Das fontes de nitrogênio testadas, o melhor rendimento micelial foi registrado no meio que continha extrato de levedura, seguido de extrato de malte, enquanto

que foi identificado crescimento inferior com nitrato de sódio e sulfato de amônio. Com base nos dados obtidos nesse experimento e das referências apresentadas, foi possível identificar que o *Myceliophthora thermophila* I-1D3b apresenta decréscimo na produção de biomassa quando adicionado nitrogênio inorgânico, sendo favorecida a produção de biomassa em presença de nitrogênio orgânico.

Para uma análise mais específica da influência das fontes orgânica e inorgânica de nitrogênio, foram realizadas análise de atividade enzimática de CMCase e xilanase, sintetizadas pelo fungo, sendo os resultados apresentados na Figura 5.2. Segundo a literatura, o farelo de trigo contém elevado teor de proteína, amido, açúcares e fibras. Com o decréscimo da quantidade de fontes de carbono facilmente assimiláveis, intensifica-se a secreção de celulasas e hemicelulasas pelo fungo, dentre elas a endoglucanase e a xilanase, que responderiam pela degradação da celulose e da hemicelulose presentes no farelo de trigo (SANTOS, 2015).

Simultaneamente ao observado para a produção de biomassa, a síntese das enzimas nos cultivos com a fonte de nitrogênio S foi afetada negativamente, demonstrando que a introdução de nitrogênio orgânico estimula o crescimento através das sínteses de enzimas. No entanto, apesar dos maiores valores de biomassa terem sido encontrados nos tratamentos em presença de peptona, o mesmo comportamento não foi observado para secreção de enzimas, para as quais a composição P+S resultou em maiores atividades. Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam estudos anteriores, os quais demonstraram que fontes orgânicas atuando conjuntamente com fontes inorgânicas influenciam positivamente a produção de enzimas (DONG et al., 2005; PEDRI et al., 2015).

Figura 5.2: Atividade de (a) CMCase e (b) Xilanase, em função das fontes de nitrogênio (●) peptona (P), (■) sulfato de amônio (S) e (▲) P+S, em cultivo semi-sólido com farelo de trigo



Ao analisar a secreção de CMCase e xilanase, observa-se produção elevada nos períodos iniciais (48 h de cultivo). Esse comportamento pode estar vinculado ao fato do farelo de trigo ser constituído de uma concentração considerável de açúcares e amido, fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, as quais ao se esgotarem forçam o microrganismo a secretar enzimas capazes de degradar celulose e hemicelulose.

Santos (2015) cultivou *Myceliophthora thermophila* M.77 em farelo de trigo e constatou que a sequência de liberação de enzimas ao longo do cultivo em estado sólido foi primeiro as amilases, seguido de xilanase e CMCase. As três enzimas foram liberadas simultaneamente, mas a atividade de α -amilase atingiu o máximo primeiro, vindo a diminuir particularmente no restante do cultivo, enquanto que as atividades de CMCase e xilanases cresceram continuamente até 96 h de cultivo. Sendo o farelo de trigo constituído de amido, açúcares redutores e fibras, dentre outros constituintes, a estratégia do microrganismo para degradação do material se inicia das fontes mais simples de carbono (açúcares e amido), para as mais complexas (fibras).

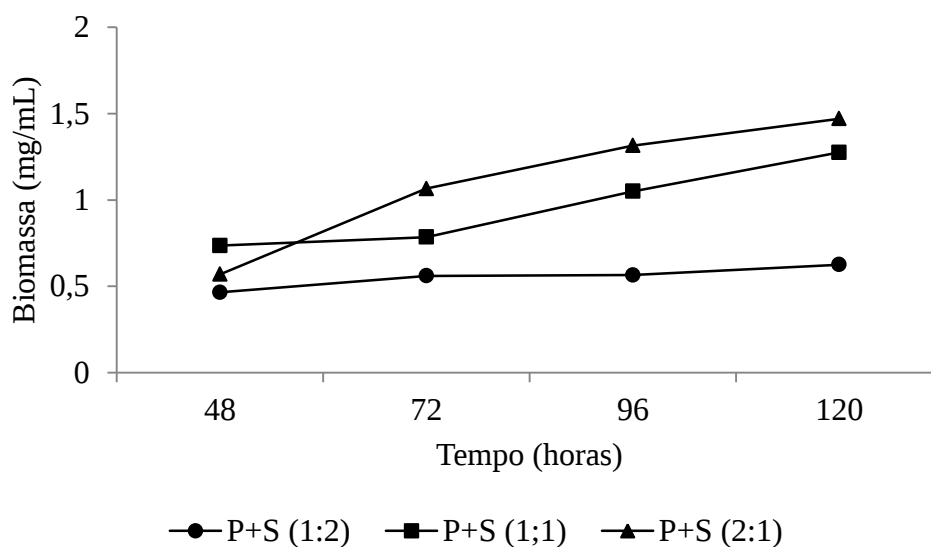
Considerando-se que o cultivo no presente estudo preliminar foi realizado com excesso de água (cultivo semi-sólido), pode-se considerar que a fração de amido e os açúcares podem ter sido diluídos no meio aquoso, sendo rapidamente assimilados, o mesmo não ocorrendo com a porção fibrosa, insolúvel, que somente foi atacada mais intensamente após as 48 h de cultivo, como mostra os máximos das atividades enzimáticas apresentada na Figura 5.2.

Tendo em vista que as fontes orgânicas de nitrogênio apresentaram melhores resultados para a produção de biomassa, enquanto sulfato de amônia (fonte inorgânica) apresentou queda expressiva, esperava-se que o tratamento constituído de P+S resultasse em atividade enzimática intermediária, no entanto, a combinação P+S foi a mais favorável para a secreção de enzimas. Sendo assim, pode-se inferir que para maiores resultados de atividade enzimática é requerida uma fonte simples e ao menos uma complexa de nitrogênio.

Nesse trabalho foi realizada a caracterização de farelo de trigo, a fim de compreender a influência das fontes de nitrogênios acrescidas. Foi encontrado 2,71% de nitrogênio total em farelo de trigo e $0,67 \text{ mg.mL}^{-1}$ de açúcares redutores totais (ART), resultados condizente com Zanelato et al. (2012), os quais encontraram valores similares de nitrogênio total. Desta forma, tornou-se difícil separar os efeitos da fonte de nitrogênio presente no farelo das demais adicionadas. Portanto, foi realizado um novo ensaio com uma fonte de carbono mais simples (glicose), com ausência de nitrogênio em sua composição.

Neste experimento subsequente, empregou-se uma fonte simples de carbono, glicose, na concentração de 10 g.L^{-1} e combinações das fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (peptona e sulfato de amônio) nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2, numa concentração global de 1 g.L^{-1} , sendo os resultados deste ensaio apresentado na Figura 5.3. Nota-se que na proporção P+S igual a 2:1 foi observada a maior concentração de biomassa ($1,47 \text{ g.L}^{-1}$), seguido da proporção 1:1 ($1,28 \text{ g.L}^{-1}$) e 1:2 ($0,63 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 5.3: Produção de biomassa em cultivo submerso, em diferentes proporções de peptona com sulfato de amônio, (●) 1:2 P+S, (■) 1:1 P+S e (▲) 2:1 P+S, tendo glicose como fonte de carbono



Os efeitos da suplementação das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico também foram analisados por Manu-Tawiah e Martin (1987), por cultivo submerso de extrato de turfa por *Pleurotus ostreatus*, observando-se baixa produção de biomassa quando sulfato de amônio foi utilizado e maior produção com extrato de levedura ($4,98 \text{ g.L}^{-1}$).

Os resultados obtidos nesse experimento sugerem uma forte preferência deste fungo por compostos nitrogenados orgânicos, visto que, maior concentração de peptona favoreceu o crescimento micelial de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Logo, dentre as fontes avaliadas, a proporção 2:1 (peptona:sulfato) apresentou maior destaque, sendo essa selecionada para dar continuidade aos experimentos.

5.2 Caracterização dos substratos

A composição centesimal visou identificar os principais componentes dos substratos, Tabela 5.1, utilizados no cultivo do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, a fim de melhor compreender a influência desses substratos nos resultados obtidos.

Tabela 5.1: Caracterização dos substratos.

Substrato	N total (%)	Umidade (%)	AR (%)	Matéria Mineral (g/g substrato)
Extrato de levedura	10,5	6,19	0	0,10
Peptona	13,6	3,95	0	0,12
Glicose	0,23	6,92	88,6	0,20
Carboximetilcelulose	0,06	9,47	0	0,16
Farelo de Trigo	2,71	12,61	6,7	4,80
Amido solúvel	0,07	4,66	0,8	0,18
Papel filtro	0,08	1,41	0	0,17

Nota: N – nitrogênio, AR- Açúcar redutor

Os substratos peptona e extrato de levedura apresentaram elevada concentração de nitrogênio, sendo as concentrações de nitrogênio para glicose, amido solúvel, carboximetilcelulose e papel de filtro extremamente baixas, portanto serão admitidas desprezíveis. A partir dos resultados anteriores, optou-se para os experimentos seguintes por adicionar uma fonte de nitrogênio inorgânica, uma concentração fixa de sulfato de amônio ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), às fontes orgânicas ao meio de cultivo.

A concentração de nitrogênio total encontrada em farelo de trigo foi condizente com Zanelato (2011), o qual encontrou 2,84% de nitrogênio total. Para o amido solúvel, encontrou-se na literatura 3,12% umidade, $0,21 \text{ g.g}^{-1}$ de matéria mineral (cinza), resultados similares encontrados nesse trabalho.

As fontes de carbono são caracterizadas por serem inodoras e apresentarem coloração branca, ao passo que, as fontes de nitrogênio apresentavam coloração amarela.

Figura 5.4: Fontes de carbono utilizadas no cultivo submerso de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b



5.3 Influência das fontes de nitrogênio na presença de glicose como fonte de carbono

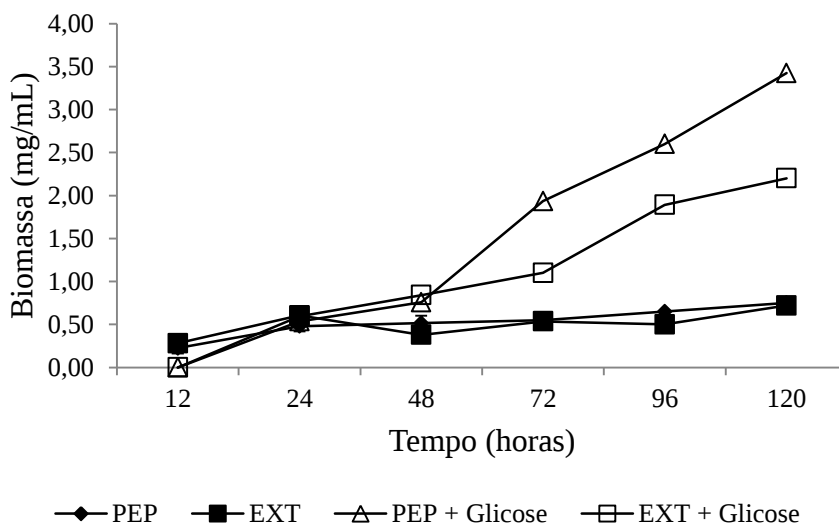
Nesse experimento, foi avaliada a influência da fonte de nitrogênio em termos de qualidade da fonte e de sua concentração na obtenção de biomassa fúngica tendo glicose como única fonte de carbono. Alguns ensaios foram realizados com e sem glicose e outros com e sem a fonte de nitrogênio. Segundo Delabona et al. (2013) e Large (1986), o metabolismo do carbono e do nitrogênio envolve mecanismos complexos de regulação e para efeito de clareza experimental é indicado que os estudos sejam realizados com um único composto como fonte de nitrogênio e/ou de carbono. Em virtude dessa afirmação, optou-se por avaliar a influência da fonte de nitrogênio e carbono separadamente.

Os dados apresentados correspondem à biomassa micelial obtida através de cultivo submerso fixando sulfato de amônio ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e variando a fonte de nitrogênio orgânico, peptona (PEP) ou extrato de levedura (EXT), ambas fixadas em 1 g.L^{-1} , cultivados com e sem glicose (10 g.L^{-1}).

A Figura 5.5 apresenta os resultados para ensaios feitos com e sem glicose e em presença de peptona ou extrato de levedura, na qual é possível observar que, de maneira geral, maiores valores de biomassa foram obtidos em presença de glicose. Entretanto, observa-se que, independente a presença da fonte de carbono, ambos os cultivos não diferem expressivamente quanto à produção de biomassa até as primeiras 48 horas. Sabe-se que tanto a peptona quanto o extrato de levedura contém fontes de carbono

metabolizáveis, sendo justificável o crescimento do microrganismo mesmo sem a presença de glicose (CORREA, et al 2009).

Figura 5.5: Produção de biomassa fúngica, variando-se as fontes de nitrogênio em extrato de levedura e peptona, na concentração de 1 g.L^{-1} , acrescidas de sulfato de amônio a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$



No presente trabalho, foi obtido melhor concentração de biomassa fúngica no cultivo com peptona em combinação com glicose. Fasidi e Olorunmaye (1994), ao avaliarem a influência das fontes de nitrogênio peptona, uréia, extrato de levedura e caseína no crescimento micelial de *Pleurotus tuber-regium* em cultivo líquido, obtiveram melhor resultado com extrato de levedura, sendo que a glicose apresentou melhores resultados quando comparado com manitol, maltose e dextrina. Cardoso, Assis e Nahas (2009), avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, incluindo fontes orgânicas e inorgânicas, na nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* e observaram que essas fontes influenciaram tanto na nutrição quanto no crescimento, sendo que o extrato de levedura resultou em maior rendimento de biomassa comparado à peptona.

A partir dos resultados encontrados no experimento anterior, foram elaborados ensaios mantendo-se fixa a concentração de peptona em $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ juntamente com sulfato de amônio ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e variando-se a concentração de glicose em 2,5; 5,0; 7,5 e $10,0 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados de biomassa fúngica estão apresentados na Figura 5.6.

Foi possível identificar maiores valores de biomassa micelial em meio de cultivo constituído de carbono com nitrogênio (C+N), com valor máximo de $2,38 \text{ g.L}^{-1}$ a 120 h, frente a $1,88 \text{ g.L}^{-1}$ a 120 h em presença apenas de carbono (C). As concentrações de 10 g.L^{-1} de glicose promoveram maior produção de biomassa fúngica para ambos os cultivos. Quando comparado o cultivo constituído somente de glicose ($1,88 \text{ g.L}^{-1}$ a 120 h) com cultivo constituído apenas por nitrogênio ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$ a 120 h) constatou grande diferença de rendimento de biomassa. Inferindo-se assim que, apesar da importância de uma fonte de nitrogênio, a fonte de carbono é o fator que determina maiores rendimentos de biomassa fúngica.

Na Figura 5.6, observa-se que ambos os resultados obtidos em ausência e presença da fonte de nitrogênio apresentam comportamento similar, diferindo apenas na quantidade de biomassa produzida. Observa-se que baixas concentrações de carbono foram limitantes para maiores rendimentos de biomassa, visto que, ao fim do cultivo para concentração de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose não se observou evolução pronunciada da concentração de biomassa, como pode ser visualizado na Tabela 5.2, que apresenta a quantidade de AR consumidos a cada tempo de cultivo.

O fato de haver biomassa para a concentração nula de glicose já havia sido observado em ensaios preliminares, sendo que foi observado o desenvolvimento do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b apenas em solução nutriente, em ausência de fonte de carbono e nitrogênio. A presença de biomassa micelial foi atribuída ao arrastes de meio de cultivo do pré-inoculo para o cultivo submerso, servindo como mínimo de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. Entretanto, não foi observado aumento na concentração de biomassa ao longo do período de cultivo.

Gern (2005) avaliou o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em diferentes concentrações de glicose (5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e $15,0 \text{ g.L}^{-1}$) com peptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, verificando crescimento de biomassa nas diferentes concentrações de glicose, seguido de decréscimo em alguns tratamentos, apoiando-se na probabilidade de uma provável autólise celular. Comportamento similar foi observado no presente trabalho pela queda nas concentrações de biomassas apresentadas na Figura 5.6.

Figura 5.6: Rendimento de biomassa em relação à concentração de carbono, apenas carbono e carbono com nitrogênio, para três tempos de cultivo (a) 48 h, (b) 84 h e (c) 120 h

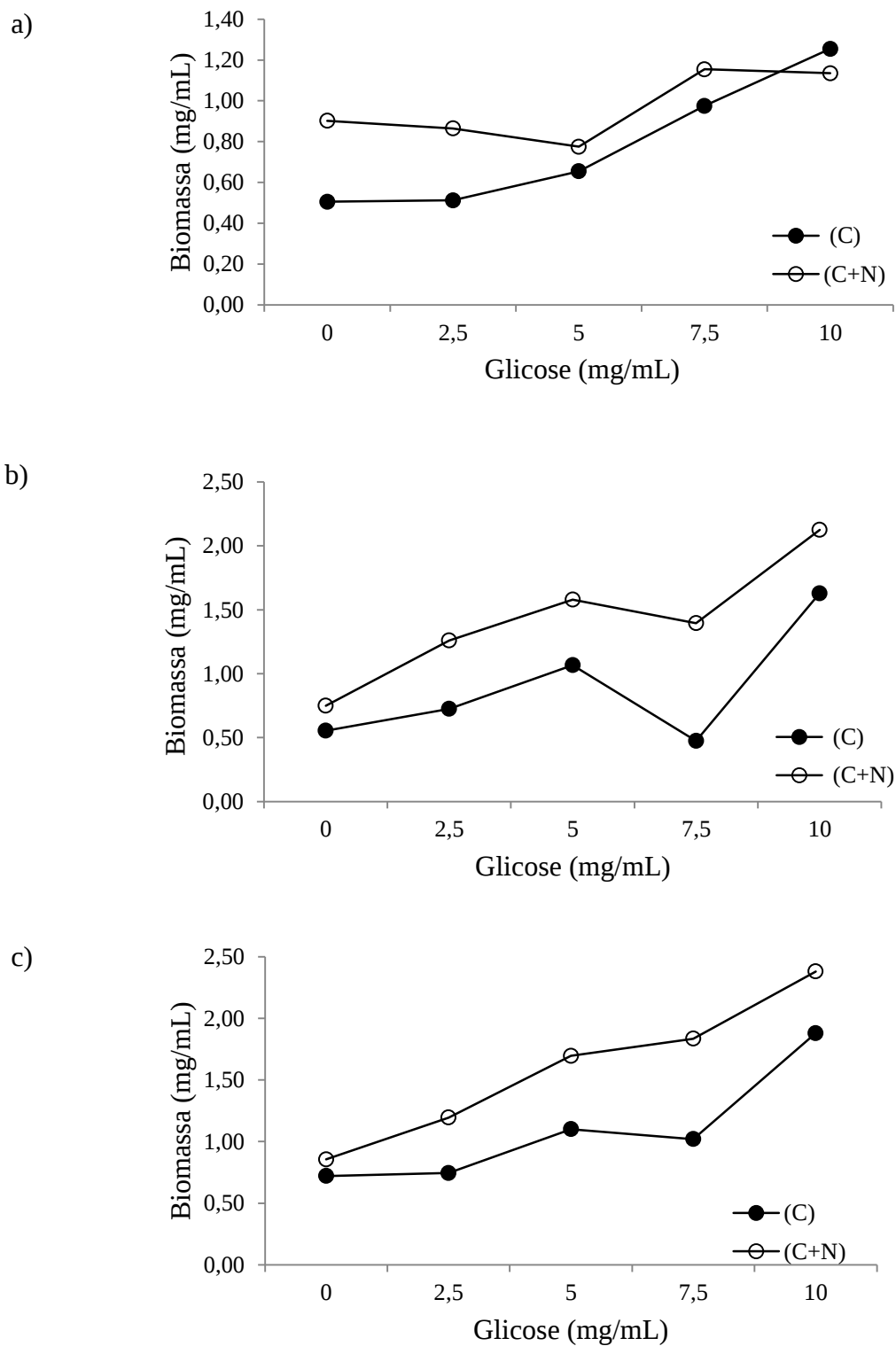


Tabela 5.2: Açúcar redutor consumido para obtenção de biomassa fúngica em presença e ausência de nitrogênio

Concentração de carbono (C)	Fonte C			Fonte C+N		
	48h	84h	120h	48h	84h	120h
2,5	2,46	2,48	2,49	1,90	1,99	2,50
5,0	4,76	4,94	4,96	3,91	4,19	4,70
7,5	5,38	6,74	7,40	5,29	6,49	7,19
10	7,22	7,71	9,52	7,33	8,80	9,31

Gern (2005), ao analisar a concentração de substrato para a concentração de 5,0 g.L⁻¹ de glicose em cultivo líquido com crescimento de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, evidenciou-se que a mesma foi totalmente consumida, chegando ao fim após 96 h de cultivo. Comportamento similar foi identificado na Figura 5.6, onde não se identifica grande diferença na concentração obtida de biomassa seca para os tempos 84 h e 120 h, para concentração de glicose até 5,0 g.L⁻¹. Esse baixo aumento na produção de biomassa seca pode estar vinculado à escassez de nutriente.

Através dos dados apresentados na Tabela 5.2, foi possível identificar que na ausência de fonte de nitrogênio, a glicose foi quase que totalmente consumida nas concentrações mais baixas (2,5 e 5,0 g.L⁻¹) já nas primeiras 48h de cultivo, enquanto que em presença de nitrogênio a glicose só foi totalmente consumida ao final de 120 h de cultivo. Segundo a análise centesimal realizada (Tabela 5.1), não há registro de açúcares redutores nas fontes de nitrogênios utilizadas. Entretanto não se descarta a possibilidade da existência de uma fonte secundária de carbono presente na peptona.

De forma geral, os dados obtidos demonstraram que ocorreu um aumento de biomassa fúngica na medida em que se aumentou a concentração de substrato inicial, comportamento observado nos experimentos com e sem a presença da fonte de nitrogênio. Observou-se também que os tratamentos em presença de nitrogênio apresentam maiores valores de biomassa. Assim, constata-se a importância de uma fonte de nitrogênio para obter maior rendimento de biomassa fúngica, entretanto ficou explícito que a fonte de carbono é o fator determinante para se obter maiores rendimentos de biomassa fúngica.

5.4 Influência das fontes de nitrogênio e de sua concentração no crescimento microbiano

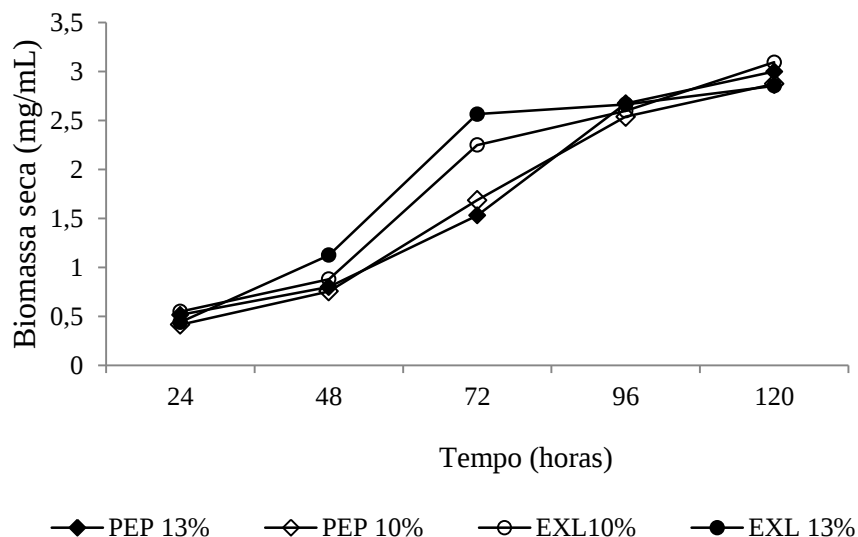
Nessa etapa, foram realizados experimentos para identificar a influência da fonte de nitrogênio, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, na obtenção de biomassa fúngica, com uma concentração fixa de glicose de 10 g.L^{-1} .

5.4.1 Influência da concentração de nitrogênio na obtenção de biomassa micelial

Inicialmente foram caracterizados os substratos em termos de nitrogênio presente nas amostras, Tabela 5.1, onde foram encontrados valores de 13% de nitrogênio para peptona e 10% para extrato de levedura. Após caracterização, foram elaborados quatro tratamentos, sendo estes determinados em função da concentração de nitrogênio e não em termos de concentração do substrato nitrogenado. A massa das fontes de nitrogênio, peptona e extrato de levedura, foram calculados a fim de oferecer as respectivas concentrações de nitrogênio 10 e 13%, proporcionando assim os seguintes tratamentos: P10% ($0,7692 \text{ g.L}^{-1}$), P13% (1 g.L^{-1}), E10% (1 g.L^{-1}) e E13% ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$).

Na Figura 5.7 estão apresentadas as concentrações de biomassa em função do tempo de cultivo nas diferentes concentrações de nitrogênio presentes no substrato. Como se pode observar, há uma tendência de aumento da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação, embora não tenha havido diferença muito expressiva entre os tratamentos realizados com as duas fontes de nitrogênio nas diferentes concentrações, sendo que apenas para o tempo de 72 h o extrato de levedura nas duas concentrações resultou em maior concentração de biomassa. Para comprovação dessas observações, foi realizada análise de variância a 95% de nível de significância, verificando-se diferença significativa entre as médias pelo teste de Tuckey entre os tratamentos E13% ($2,37 \pm 0,09a$) e E10% ($2,25 \pm 0,03b$), para 72 h de cultivo. A maior produção de biomassa micelial foi obtida em 120 h de cultivo para todos os tratamentos, sendo valor máximo em torno $3,00 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 5.7: Concentração de biomassa micelial em função da concentração e da fonte de nitrogênio presente no substrato para concentração de glicose igual a 10 g.L^{-1}



Geralmente, os microrganismos assimilam uma ampla variedade de fontes de nitrogênio. No entanto, apresentam preferência na utilização de determinados compostos. (KUHAD et al., 2016; MAGASANIK; KAISER, 2002). Observações similares são feitas por Barbosa et al. (2004), que realizaram revisão da literatura sobre exopolissacarídeos fúngicos, ressaltando a hipótese de que existem preferências específicas quanto à fonte de nitrogênio, sendo estas preferências diretamente vinculadas ao metabolismo de cada microrganismo. Todavia, ao analisar a biomassa fúngica nesse experimento de maneira geral, não se pode afirmar que o extrato de levedura proporciona uma produção de biomassa superior à peptona.

Manu-Tawiah e Martin (1987), em estudo com *Pleurotus ostreatus*, compararam o cultivo com extrato de levedura e com peptona. A concentração das diferentes fontes foi calculada de forma a fornecer $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de fonte de nitrogênio, em um meio sintético e em um meio composto por extrato de turfa. Observaram que extrato de levedura mostrou ser a melhor fonte de nitrogênio adicionada ao meio de extrato de turfa. Entretanto, esse estudo não foi realizado levando em consideração a concentração de nitrogênio presente no substrato, e sim em termos de concentração da fonte de nitrogênio.

Apesar da maioria dos trabalhos da literatura indicarem possível preferência do microrganismo a determinada fonte de nitrogênio, os resultados obtidos nesse trabalho não indicam dependência das fontes de nitrogênio ou de suas concentrações, de modo que para *Myceliophthora thermophila* I-1D3b a síntese de biomassa parece estar mais relacionada à concentração da fonte do que à qualidade da fonte.

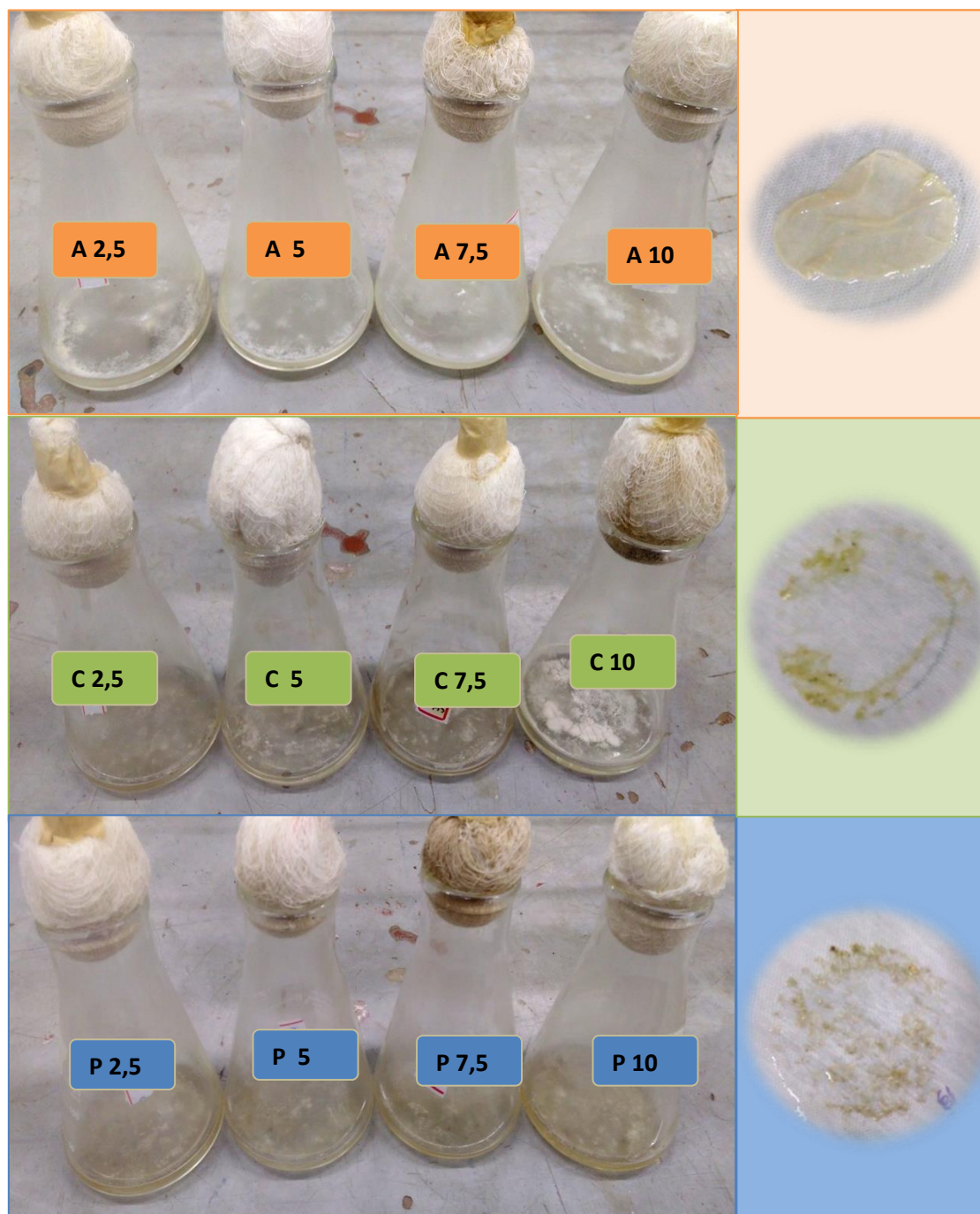
5.5 Influência das fontes de carbono e de suas concentrações no crescimento microbiano e nas atividades enzimáticas

Nesse experimento, foi avaliado o efeito de diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L⁻¹) sobre o crescimento micelial do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, para três tempos de cultivo (48, 84 e 120 horas). As fontes de nitrogênio foram fixadas em 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio e 1 g.L⁻¹ de peptona. Para esse fim, foram escolhidos amido solúvel, carboxmetilcelulose (CMC) e papel de filtro (Whatman) como fontes de carbono.

5.5.1 Influência de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa micelial

Constatou-se inicialmente que o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b apresentou capacidade de se desenvolver e produzir biomassa micelial em meio de cultivo submerso contendo como única fonte de carbono amido solúvel, CMC e papel de filtro, em diferentes concentrações, como pode ser observada na Figura 5.8. Ao final de 120 h de cultivo, foi possível observar completa colonização do meio. Entretanto, nos tratamentos constituídos de CMC ou papel de filtro, o crescimento do fungo se limitou à formação de uma fina camada de micélio na superfície do meio de cultivo, apresentando uma biomassa menos consistente, de aspecto esfarelado, enquanto que a biomassa obtida em 84 horas de cultivo em amido solúvel apresentava aspecto gelatinoso e mais consistente que os demais tratamentos. Vale lembrar que para esse experimento, o papel de filtro foi batido com água destilada em liquidificador comercial na mesma velocidade e tempo de batimento pra cada concentração, posteriormente foi filtrado, utilizando apenas o sobrenadante pra o cultivo líquido.

Figura 5.8: Aspecto da biomassa micelial tendo como fonte de carbono amido solúvel (A), CMC (C) e papel de filtro (P)



Segundo Gong e Tsao (1979), a resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo de indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. O indutor de origem celulósica possui duas

funções, ou seja, pode servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese enzimática.

Na Figura 5.9, são apresentados os resultados da concentração de biomassa e AR obtidos no cultivo submerso em função da concentração da fonte de carbono e tempo de cultivo. Com base no perfil temporal de produção de biomassa, foi possível observar que, conforme aumento na concentração de fonte de carbono, observa-se aumento na quantidade de biomassa presente no meio de cultivo, sendo esta elevação mais intensa para amido solúvel. Essa mesma tendência também foi constatada por Casciatori (2015), no cultivo de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar.

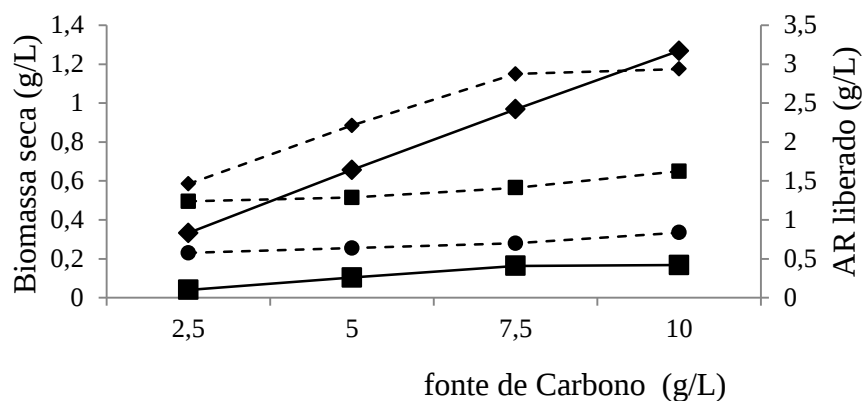
Não foi possível confirmar que o *Myceliophthora thermophila* I-1D3b possui especificidade para uma determinada fonte de carbono, visto que, as fontes testadas possuem características distintas, como maior viscosidade da solução constituída de CMC, dificuldade de solubilização do papel de filtro, além da complexidade dos constituintes de cada fonte.

Foram realizadas análises de AR nas soluções preparadas com os substratos utilizados antes do cultivo, de modo que, foram pesados os substratos nas concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L⁻¹, solubilizados em água destilada, e mantidos sob agitação por 1 h e autoclavados, a fim de para manter as condições de cultivo. A solução de amido solúvel apresentou 0,12; 0,37; 0,62 e 0,84 g.L⁻¹ de AR para as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g.L⁻¹ de amido, respectivamente, enquanto que as soluções de CMC e de papel de filtro não apresentaram açúcar redutor solúvel em sua composição, independente a concentração de substrato. Também foram analisados Açúcares redutores liberados ao longo do cultivo submerso. Desta forma, para o período inicial de cultivo, o meio de cultivo contendo amido dispõe de fonte de carbono facilmente assimilável.

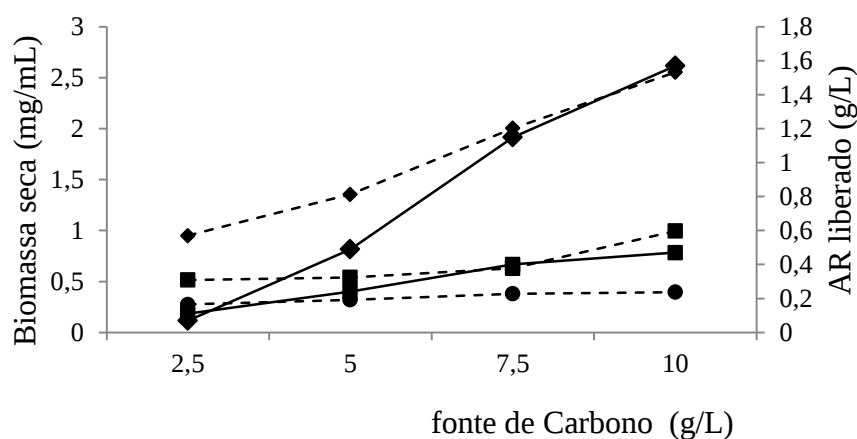
Observa-se na Figura 5.9 que a liberação de açúcar foi proporcional à concentração de amido adicionado no meio de cultivo. A partir das 48 h observa-se uma queda na concentração de AR, que está vinculada ao consumo do açúcar para conversão de biomassa micelial, visto que, valores crescentes de biomassa são acompanhados do decréscimo de açúcar presente no meio. Santo (2007) fez associações do consumo de açúcar com o crescimento micelial do fungo *Aspergillus Níger* CCT 0916, para produção de pectinase sob cultivo em estado sólido com pedúnculo de caju, onde observou consumo acelerado de açúcar entre 8 e 32 h de cultivo.

Figura 5.9: Concentração de Biomassa fúngica (---) e açúcares redutores (—) obtidos no cultivo do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em função da concentração da fonte de carbono, amido (◆) CMC (■) e Papel de filtro (●), com as fontes de nitrogênio fixadas. Em três tempos de cultivo (a) 48 h, (b) 84 h e (c) 120 h

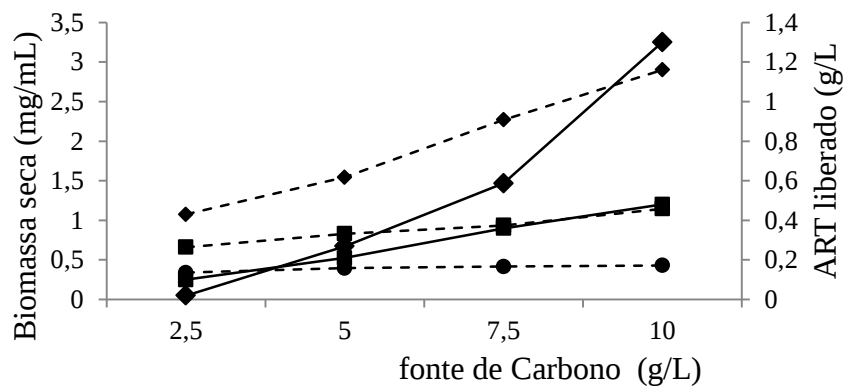
a)



b)



c)



--◆-- Amido --■-- CMC --●-- Papel Filtro —◆— Amido —■— CMC

Valores maiores de biomassa fúngica foram encontrados em cultivo constituído de amido solúvel, sendo o valor máximo de biomassa seca (2,9 g.L) obtido a 120 h de cultivo, em concentração de 10 g.L⁻¹ de amido. O amido solúvel se manteve melhor fonte para obtenção de biomassa ao longo de todo o tempo de cultivo, comparado aos demais tratamentos.

Em análise as curvas referentes à CMC e papel de filtro, observa-se que ambas apresentaram valores de biomassa muito próximos, sem grande crescimento ao longo de todo o cultivo. Em análise atenta da Figura 5.9, observou que nas concentrações de 2,5 a 7,5 g.L⁻¹, os tratamentos constituídos de CMC e papel filtro apresentaram baixo crescimento na produção de biomassa, ou seja, a quantidade de biomassa ao longo do tempo de cultivo até concentração de 7,5 g.L⁻¹ permaneceu quase que constante, ao passo que, em concentração de 10 g.L⁻¹ o tratamento constituído de CMC apresentou um ligeiro aumento na quantidade de biomassa micelial, enquanto que papel filtro se manteve constante.

O baixo crescimento de biomassa, observado no tratamento constituído de papel filtro, pode ser atribuído à estrutura altamente cristalina da celulose neste material ou até mesmo a dificuldade de dissolver o papel ao meio de cultivo, uma vez que, após trituração com água destilada em liquidificador, o material foi filtrado para manter o meio mais homogêneo, de modo que possivelmente, não ocorreu completa extração dos componentes que constituíam o papel de filtro. Vale salientar que, tanto no substrato quanto no cultivo composto por papel de filtro não foram encontrados açúcares redutores, independente da concentração de substrato, sendo este um outro fator que pode ter contribuído para baixa obtenção de biomassa, uma vez que falta um indutor facilmente assimilável para as fases iniciais de crescimento.

No cultivo com CMC, apesar de não ser registrada a presença de AR solúvel no substrato, identificou-se liberação de açúcar redutor ao longo do cultivo, mesmo que em baixas concentrações, indicando provável ação de enzimas. Nas curvas de açúcar redutor referente à CMC, observa-se que em 48 h de cultivo encontra-se maior concentração de AR e que após este período ocorre decréscimo do açúcar presente ao meio, indicando consumo do mesmo, exceto para a concentração de 10 g.L⁻¹, onde observa-se aumento na concentração de AR. Entretanto, a variação ao longo do cultivo não ocorre de forma pronunciada. Conforme mencionado anteriormente, em concentração de 10 g.L⁻¹ o

tratamento composto por CMC apresentou ligeiro aumento na quantidade de biomassa micelial quando comparado a outras concentrações do mesmo substrato.

Nesse experimento referente à obtenção de biomassa micelial, variando-se a fonte de carbono, tendo sulfato de amônio (0.5 g.L^{-1}) e peptona (1 g.L^{-1}) com fonte fixa de nitrogênio, amido solúvel mostrou ser a melhor fonte de carbono na obtenção de micélio fúngico, proporcionando a mais alta concentração de biomassa quando comparado as outras fontes. Essa constatação pode ser associada à de Zanchetta (2012), quando avaliou a produção de celulasas fúngicas por cultivo em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica, afirma que os fungos consumiram na primeira fermentação os açúcares solúveis e com isso atingiram um nível maior de miceliação.

5.5.2 Influência de diferentes fontes de carbono nas atividades enzimáticas

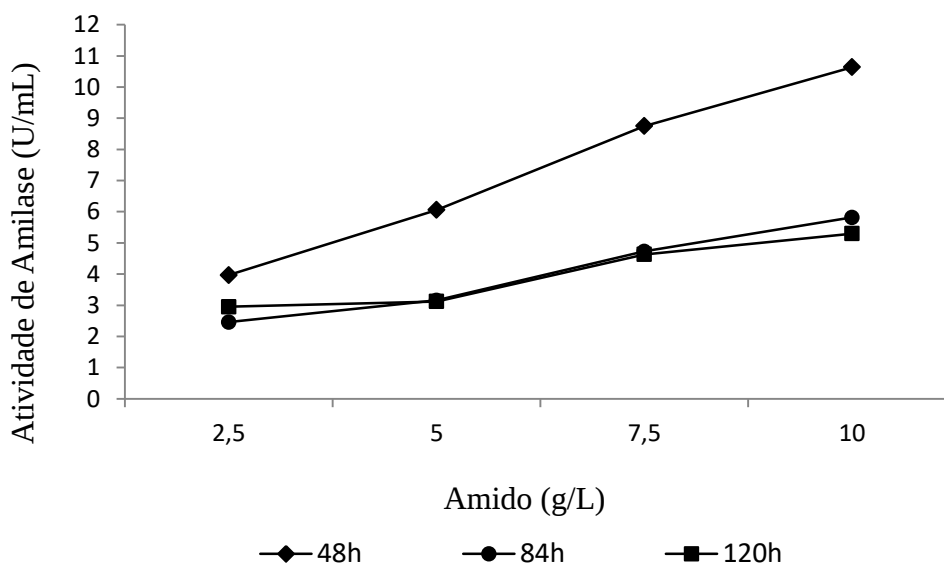
Para avaliar a influência das fontes de carbono sobre a síntese de biomassa, foi necessário explorar como o microrganismo atacava o substrato, de modo que se procedeu à uma análise das atividades das enzimas amilase, CMCase e xilanase.

Alguns autores como Fellows (1994), Pandey et al. (1999) e Gupta et al. (2003), afirmaram a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer a secreção da produção de amilases por fungos, leveduras e bactérias. Os microrganismos não assimilam diretamente moléculas complexas como é o caso do amido, CMC e papel de filtro. Na falta de um componente assimilável no meio de cultivo, o microrganismo passa a sintetizar enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples, garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

5.5.2.1 Atividade de amilase

Observa-se na Figura 5.10 que maiores atividades de α -amilase foram obtidas em 48 h de cultivo, enquanto que, em 84 h e 120 h, os valores de atividade enzimática além de mais baixas foram muito próximas, indicando uma queda de atividade que pode ter sido ocasionada por enzimas proteolíticas.

Figura 5.10: Atividade enzimática de amilase em presença de amido solúvel como fonte única de carbono, com as fontes de nitrogênio fixadas em sulfato de amônio ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e peptona (1 g.L^{-1}). Dados obtidos em três tempos de cultivo (♦) 48 h, 84 h (●) e 120h (■)

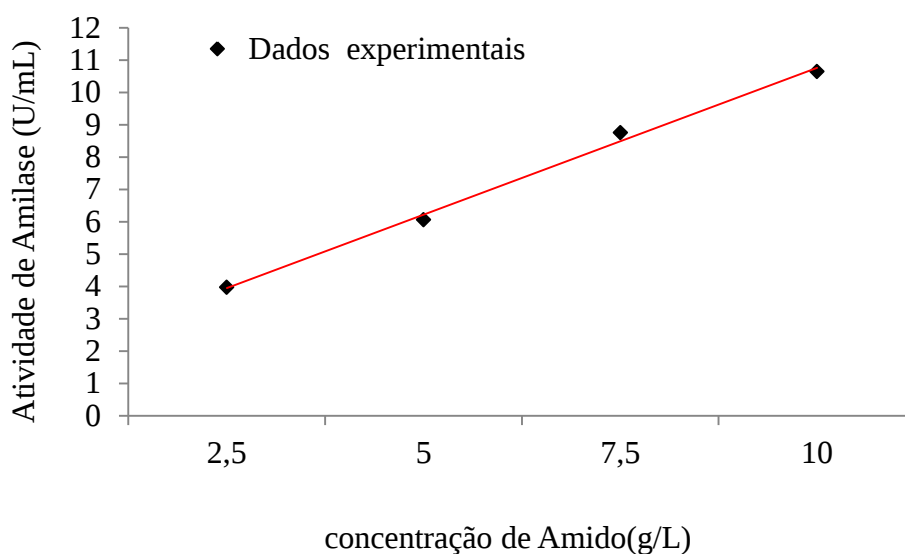


Ao confrontarmos os resultados obtidos para a biomassa fúngica e açúcares redutores, Figura 5.9, pode-se inferir que há uma possível relação direta entre biomassa e atividade α -amilase. Nas primeiras 48 h ocorreu baixa concentração de biomassa, enquanto que ocorreu maior atividade de α -amilase, para tempos superiores observou-se aumento na concentração de biomassa e de açúcar presentes no meio com o aumento do tempo de cultivo. Em contrapartida, com o aumento do tempo de cultivo, ocorreu um decréscimo na atividade enzimática e quase não se observou variação na concentração de açúcar liberado. Sendo assim, pode-se supor que, devido à baixa disponibilidade de energia prontamente assimilável ocorreu maior secreção de amilase nas primeiras 48 h, a fim de quebrar as moléculas de amido em cadeias menores, explicando o aumento de açúcar redutor encontrado no meio de cultivo, possibilitando assim o desenvolvimento do fungo e consequentemente maior produção de biomassa.

Na Figura 5.11 são apresentados os dados experimentais obtidos na determinação da atividade amilásica obtidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em diferentes concentrações de amido solúvel em cultivo líquido após 48h de cultivo. O comportamento da curva é tipicamente linear e o coeficiente de determinação (R^2) da regressão linear foi elevado, igual a 0,9958. Para os demais tempos os ajustes foram

igualmente satisfatórios, indicando que não houve restrição ao crescimento fúngico em virtude de falta de fontes de nitrogênio, cuja concentração inicial foi mantida constante em todos os ensaios, e não houve geração de compostos inibitórios à ação das enzimas.

Figura 5.11: Comparação entre concentração de amido e atividade amilásica obtida em cultivo com amido solúvel para 48 h de cultivo, tendo amido solúvel como fonte única de carbono e com as fontes de nitrogênio sulfato de amônio (0.5 g.L^{-1}) e peptona (1 g.L^{-1})

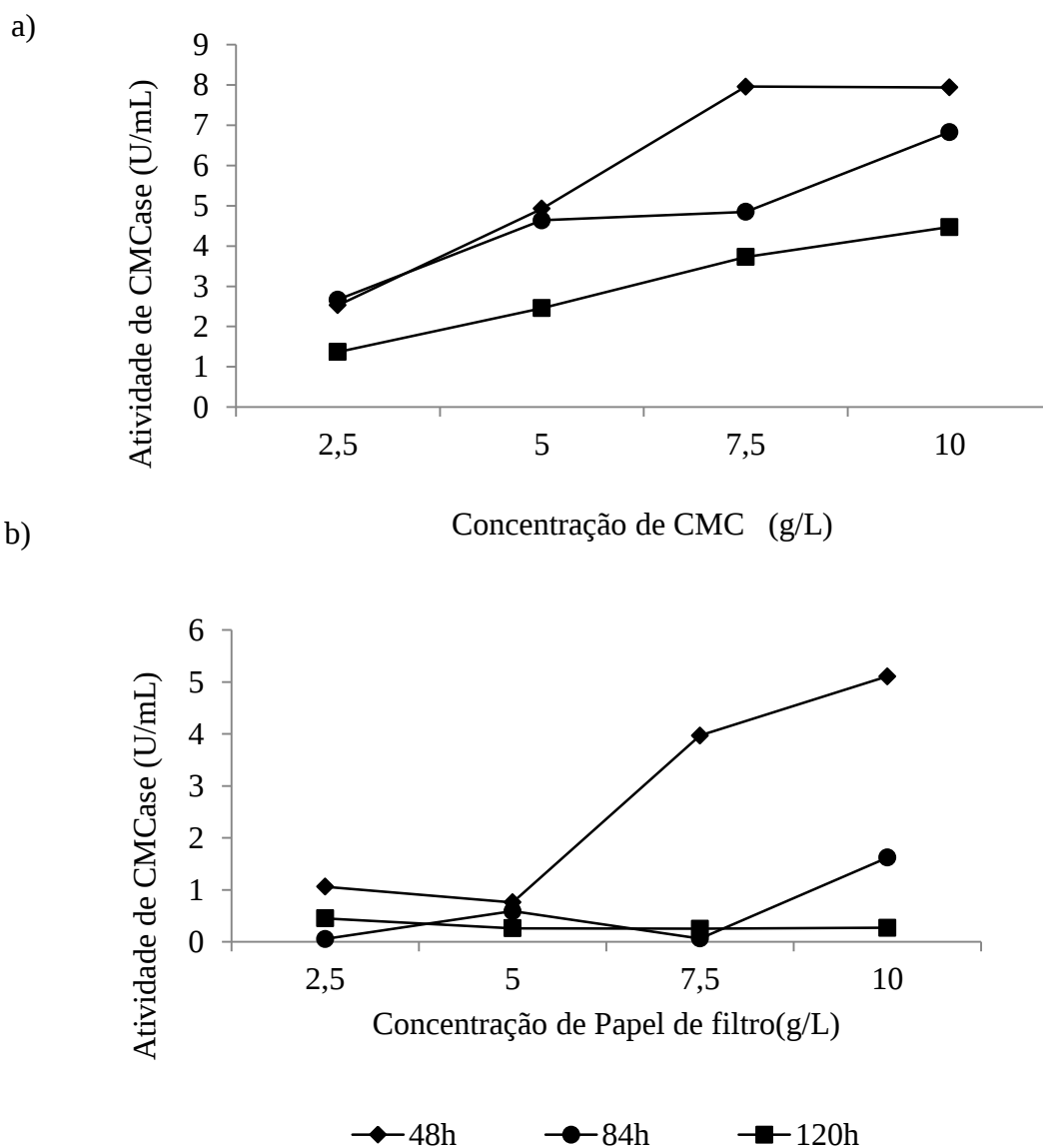


5.5.2.2 Atividade de CMCase

Microrganismos celulolíticos apresentam estratégias diferentes para a hidrólise da celulose, sendo importante a escolha do tipo de celulose que será adicionada ao meio de cultura. Na figura 5.12 estão apresentados os resultados de CMCase obtidos em cultivo com CMC e papel de filtro. Observa-se que, dentre estes substratos, a CMC foi a melhor indutora de CMCase. Não foi possível observar comportamento geral para as atividades de endoglucanase com a concentração de CMC, embora se possa dizer que há uma tendência de aumento das atividades com o aumento da concentração de substratos para os três tempos de cultivo. Para o meio de cultivo papel de filtro, exceto para o tempo de 48 h, as atividades foram muito baixas e quase que independentes da concentração de substrato. Comparando-se a cinética de síntese de biomassa, Figura 5.9, com a cinética de atividade de CMCase em função da concentração de CMC, observa-se que ambas são crescentes, com o aumento da concentração de substrato, embora a cinética de crescimento de

biomassa não seja tão acentuada como a observada para amido solúvel, confirmando a dificuldade em se clivar as moléculas de celulose.

Figura 5.12: Atividade de CMCase no cultivo do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em função da concentração da fonte de carbono, (a) CMC e (b) e Papel de filtro e com as fontes de nitrogênio sulfato de amônio (0.5 g.L^{-1}) e peptona (1 g.L^{-1}). Dados obtidos em três tempos cultivo 48, 84 e 120 h.



O mesmo comportamento obtido para atividade de amilase foi obtida para CMCase, visto que, maior atividade enzimática é observada em 48 h de cultivo, seguido de decréscimo nos tempos subseqüentes. Como citado anteriormente na falta de um componente prontamente assimilável no meio de cultivo, o microrganismo passa a sintetizar enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples, explicando assim a alta concentração de enzimas celulolíticas nas primeiras 48 h de cultivo, tanto para o substrato CMC, como para papel de filtro.

Segundo Pereira (2013), o papel de filtro é composto em sua maior parte de celulose microcristalina e em menor parte de celulose amorfa, essa celulose microcristalina se caracteriza por ser insolúvel em água. Segundo Ogeda e Petri (2010), a baixa atividade das enzimas celulolíticas obtidas pode estar vinculada a dois fatores: à estrutura altamente cristalina da celulose (dificulta o acesso aos sítios ativos) ou a presença de lignina que adsorve a celulase, restringindo a hidrólise.

Assim como resultados obtidos para amilase os ajustes lineares foram satisfatório para CMCase em CMC como fonte de carbono, apresentando $R^2=0,9901$, $R^2=0,92892$ e $R^2=0,8965$ para os tempos 48, 84 e 120 horas, respectivamente. Entretanto para a atividade de CMCase em papel de filtro apresenta grande variação conforme maior concentração de substrato e o coeficiente de regressão foi de relativamente baixo $R^2=0,8504$ para os tempos 48 h, à valores muito baixo de $R^2=0,5359$ e $R^2=0,5545$ para os tempos 84 e 120 horas, respectivamente. De maneira que não demonstra possível relação entre a produção de biomassa e atividade de CMCase para papel de filtro.

Santos (2015), ao analisar o fungo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 em cultivo no estado sólido com bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, afirma que com o decréscimo da quantidade de fontes de carbono facilmente assimiláveis, intensifica a secreção de celulasas, dentre elas a endoglucanase, uma das enzimas do complexo celulolítico que responde pela degradação da celulose presentes na CMC e papel de filtro. Essa afirmação foi constatada no presente experimento para as atividades de CMCase do tratamento constituído de CMC, no cultivo de 48 h, em todas as concentrações. Pereira (2013), ao analisar celulasas e xilanases por fungos isolados a partir do Bioma Cerrado, utilizando CMC e avicel (celulose microcristalina) em cultivo submerso, identificou maior atividade celulolítica em CMC, o autor atribuiu essa maior atividade em virtude da sua solubilidade em água.

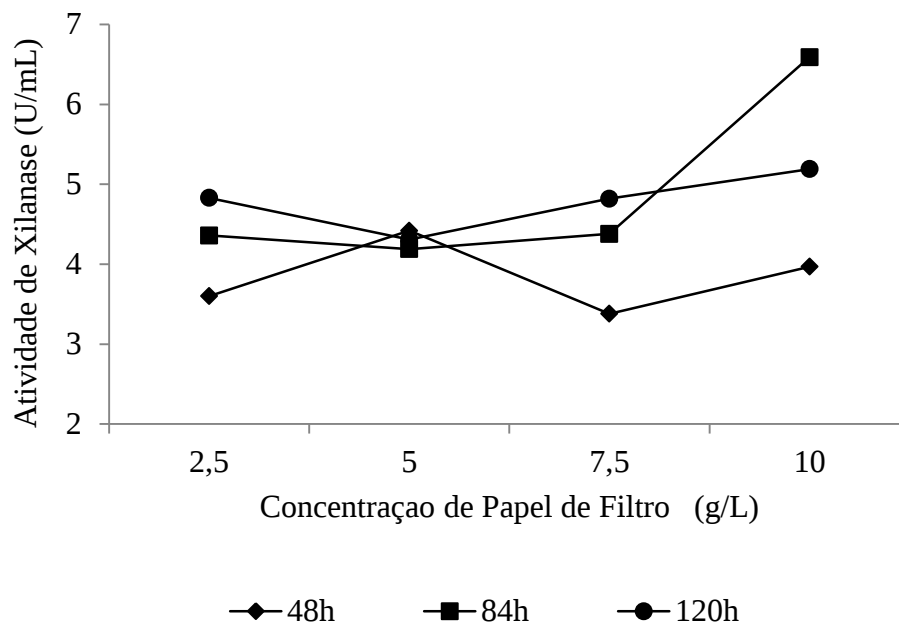
Segundo Marco (2012), ao avaliar a produção e caracterização de celulase produzida por um isolado de *Bacillus* sp., altos níveis da enzima CMCase foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de carbono. Entretanto, a composição do substrato não é o único fator determinante na secreção de um determinado grupo de enzimas, mas também o microrganismo utilizado, visto que Vitti e Silva (1988), ao estudarem a capacidade de produção e atividade total da celulase (FPA), carboximetilcelulase (CMCase) e beta-glicosidade em 5 fungos isolados de bagaço de cana, verificou que o desenvolvimento de *Penicillium funiculosum* UV49 em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetilcelulose foi pequeno e a atividade celulolítica baixa. Entretanto o autor salienta que apesar desses substratos não serem facilmente hidrolisados pelas celulasas, os mesmos parecem ser os melhores substratos para induzir a secreção de celulase.

5.5.2.3 Atividade de Xilanase

Dados referentes à secreção de xilanase estão apresentados na Figura 5.13. Dentre todas as fontes de carbono avaliadas, o cultivo com papel de filtro apresentou menores atividades enzimáticas, bem como menor produção de biomassa fúngica.

Apesar da ausência de açúcar solúvel e nenhum registro de açúcar redutor ao longo do cultivo constituído de papel de filtro, o crescimento do microrganismo pode ter sido favorecido mediante ação de CMCase e xilanase. Entretanto, diferentemente das celulasas e amilases, a xilanase apresentou comportamento distinto, ou seja, a maior atividade de xilanase não ocorreu em 48 h de cultivo e sim em 120 h na concentração de 10 g.L⁻¹ de papel filtro. Como o papel de filtro deve conter baixo conteúdo de hemicelulose, este comportamento é justificável, uma vez que o microrganismo não teria estímulo para instigar a produção de uma enzima para degradar um substrato em baixa concentração. Assim, não foi encontrada uma correlação entre a concentração de biomassa e a atividade de xilanase.

Figura 5.13: Atividade de enzimática de xilanase no cultivo do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em função da concentração de papel de filtro. Dados obtidos em três tempos de cultivo (♦) 48 h, (●) 84 h e (■) 120 h



Através dos resultados obtidos quando analisada a influência das fontes de carbono sobre atividade enzimática e crescimento fúngico, constata-se que as fontes de carbono surtem efeitos diferentes pra cada substrato, os quais estão vinculados à composição dos substratos e à acessibilidade dos componentes neles presentes. Os resultados encontrados demonstram que as atividades de amilase e CMCase estão relacionadas com o crescimento fúngico e com a concentração do substrato, o mesmo sendo observado para xilanase.

5.6 Influência da fonte de carbono em combinação à glicose na obtenção de biomassa

Nesse experimento, avaliou-se o crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em presença de diferentes fontes de carbono, amido solúvel (AS), carboximetilcelulose (CMC) e papel de filtro (PF), em diferentes concentrações (0, 2,5; 5,0; 7,5; 10 g.L⁻¹), em combinação com a glicose em concentração inversamente proporcional (10; 7,5; 5,0 e 2,5 g.L⁻¹), de maneira a oferecer 10 g.L⁻¹ de substrato atuando como fonte de carbono. Sendo assim, um tratamento 10:0 CMCG corresponde a 10 g.L⁻¹ de CMC e 0 g.L⁻¹

¹ de glicose, assim como 2,5:7,5 PFG corresponde à 2,5 g.L⁻¹ de papel de filtro, combinado a 7,5 g.L⁻¹ glicose.

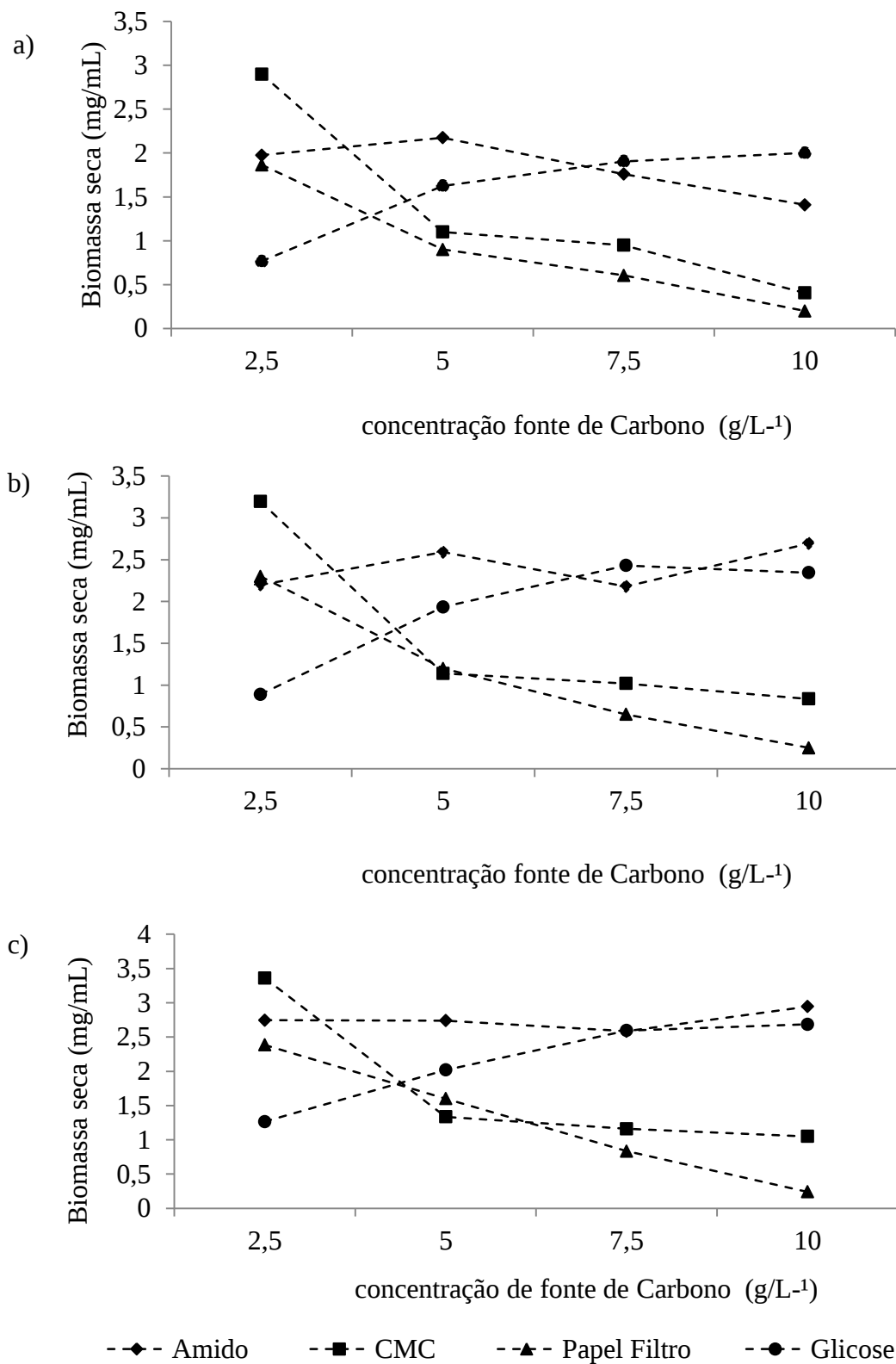
Resultados referentes ao crescimento micelial estão apresentados na Figura 5.14. Observa-se maior produção de biomassa (3,36 g.L⁻¹) no tratamento composto por 2,5:7,5 CMCG, em 120 h de cultivo, seguido por 2,9 g.L⁻¹ de biomassa obtida no tratamento composto por 2,5:7,5 ASG, ambos em 120 h de cultivo. Quando o tratamento foi constituído somente por glicose, maior produção de biomassa (2,69 g.L⁻¹) foi observada na concentração de 10 g.L⁻¹ em 120h de cultivo e a mínima de 0,77 g.L⁻¹ em 48h de cultivo.

De maneira geral, maiores valores de biomassa são obtidos em maiores concentrações de glicose. Geralmente a glicose é usada como uma boa opção para o crescimento em condições laboratoriais. No entanto, dependendo das necessidades particulares do microrganismo, é necessário utilizar alguns outros nutrientes, como lipídeos, álcoois, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados orgânicos (MOO-YOUNG, 1985).

Os resultados para o tratamento constituído de amido solúvel combinado com glicose apresentaram comportamento diferente dos de CMC e papel de filtro, uma vez que os valores de biomassa não foram proporcionais à concentração de glicose presente no meio de cultivo, sendo a biomassa pouco afetada pela presença da glicose. O mesmo não se pode dizer dos meios compostos por CMC e papel de filtro, uma vez que houve aumento expressivo da biomassa com o aumento da concentração de glicose.

Os resultados para a combinação amido:glicose parecem estar relacionados ao fato de o amido já ser uma fonte de carbono facilmente assimilável como visto anteriormente, produzindo maiores concentrações de biomassa do que os cultivos com CMC e papel de filtro. As razões pelas quais não houve aumento de biomassa com a introdução da glicose devem estar relacionadas, então, com outros mecanismos de cultivo que não os puramente biológicos, tal como a velocidade de difusão dos açúcares na solução. Para CMC e papel de filtro, a glicose introduzida atuou como um indutor inicial de crescimento, possibilitando que o microrganismo já desenvolvido pudesse sintetizar as enzimas necessárias para quebrar as moléculas do substrato mais complexo.

Figura 5.14: Produção de biomassa fúngica em função da concentração de substrato fonte de carbono em combinação à glicose, sendo (♦) amido + glicose, (■) CMC + glicose, (▲) Papel filtro + glicose e (●) somente glicose em (a) 48, (b) 84 e (c) 120 h de cultivo



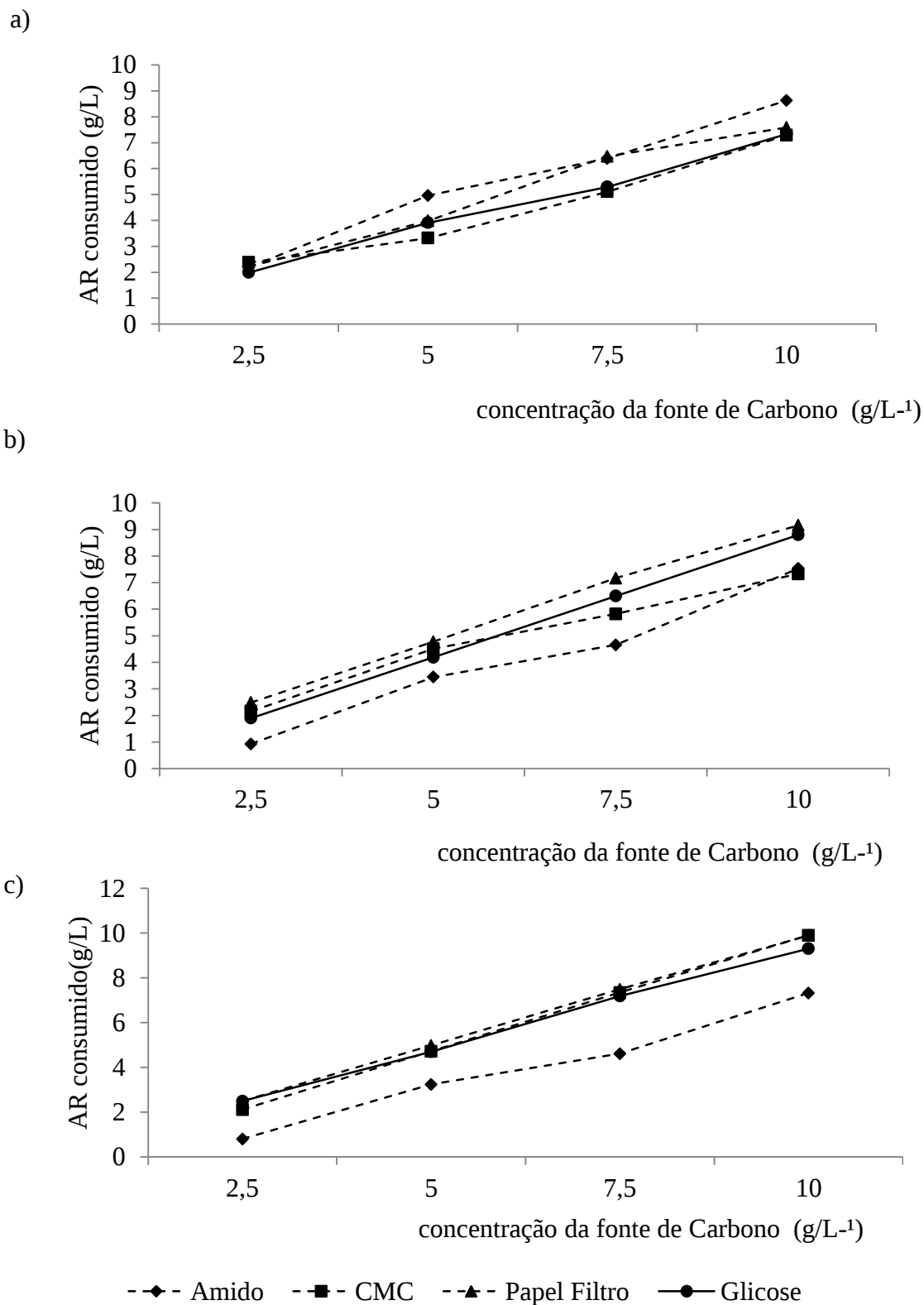
De maneira geral nos tratamentos constituídos de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato fonte de carbono mais $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, maiores valores de biomassa foram observados no tratamento CMCG, em contrapartida não foram observadas grandes diferenças entre os tratamentos PFG e ASG. Nos tratamentos combinados à $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, maiores valores de biomassa foram obtidos na seguinte ordem ASG e G, seguidos por CMCG e PFG.

Na Figura 5.15, referente ao açúcar redutor presente no cultivo, foi possível observar que todas as curvas apresentam comportamento similar ao da curva constituída somente por glicose. Ao comparar-se o crescimento micelial com o consumo de açúcar presente no meio de cultivo, verifica que o padrão de crescimento micelial e a liberação de açúcar são correspondentes, ou seja, à medida que o açúcar é consumido a produção de biomassa aumenta. Para os cultivos com glicose e com glicose acrescida de amido, a taxa de consumo de açúcar é similar, da mesma forma que a produção de biomassa. Por outro lado, quando são avaliadas as fontes de carbono CMC e papel filtro em baixas concentrações de glicose, a quantidade de biomassa obtida é baixa, mesmo em 120h de cultivo, conforme pode ser visto na Figura 5.14.

Observa-se também que mesmo em 48h de cultivo, o açúcar presente no meio foi praticamente esgotado, demonstrando que o açúcar foi um fator limitante na obtenção de biomassa micelial. Ao confrontarmos a Figura 5.15 com a Figura 5.14, pode-se observar que a combinação de CMC:glicose e amido:glicose, em concentração de (2,5:7,5 e 5:5) apresentou uma quantidade de biomassa superior cultivo em 10 g.L^{-1} apenas com glicose, esses resultados estão associados provavelmente a ação das enzimas específicas sobre o substratos, CMC e amido, liberando glicose, a qual em conjunto com a glicose adicionada potencializou a produção de biomassa.

Guimarães (2006), em estudo da obtenção de biomassa do *Agaricus blazei Murrill* em diferentes meios de cultura, constatou que por ser um açúcar prontamente assimilável, 1% de glicose foi suficiente para o metabolismo do fungo, enquanto que para sacarose, essa concentração foi insuficiente, provavelmente, em função do gasto de energia envolvido para a síntese da enzima sacarase, responsável por sua degradação. Nesse experimento, observamos que todas as concentrações de substratos analisados foram capazes de sustentar o desenvolvimento do *Myceliophthora thermophila* I-1D3b.

Figura 5.15: Açúcares redutores totais consumidos durante cultivo submerso em função da concentração de substrato fonte de carbono em combinação à glicose, sendo (♦) amido + glicose, (■) CMC + glicose, (▲) Papel filtro + glicose e (●) somente glicose em (a) 48 h, (b) 84 h e c) 120 h



Quando comparado o comportamento dos substratos combinados à glicose e cultivo constituído somente de glicose, Figura 5.14, em função do tempo de cultivo, discriminados pelas concentrações, observa-se que as curvas de biomassa apresentam o mesmo comportamento ao longo de todo o tempo de cultivo, variando apenas em termos de quantidade de massa fúngica. Foram observados que em ausência de glicose prontamente assimilável (0:10), maiores valores de biomassa foram obtidos na seguinte ordem de tratamento: AS, CMC e PF, resultados que corroboram com os resultados observados no item 5.5.1.1. Morey et al. (2009), ao avaliar as fontes de carbono e nitrogênio na produção de fumonisina B1 por *Fusarium verticillioides* em meio líquido definido, observaram a existência da tendência de maior produção de biomassa em meios contendo glicose como fonte de carbono.

Nessa etapa do trabalho, observou-se que resultados com alta concentração de glicose apresentaram valores menores do que aqueles com baixa concentração. Observou-se também que a concentração de glicose no meio foi reduzida rapidamente quando a concentração adicional de glicose era baixa. Outra observação está nos resultados de glicose com amido, os quais foram menos afetados pela concentração de glicose na composição de biomassa do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b.

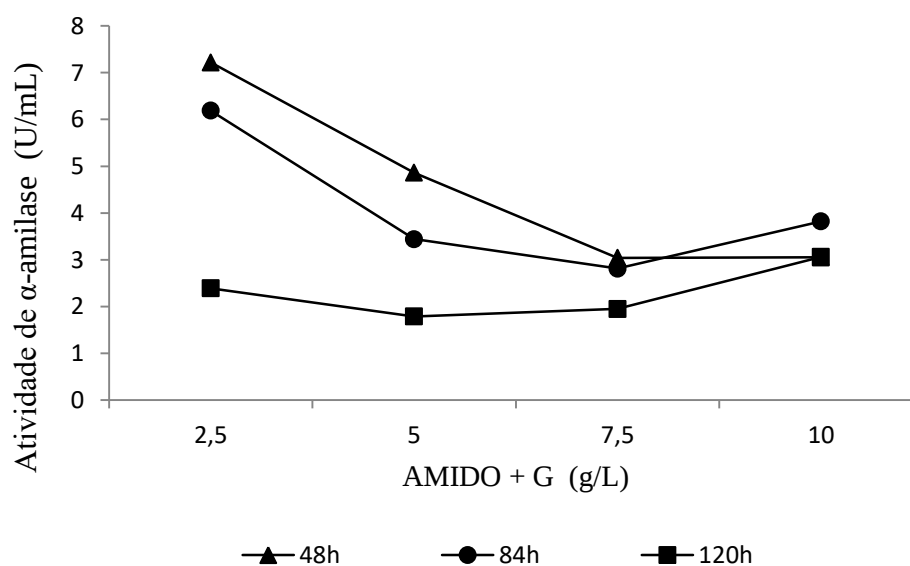
5.6.1 Influência da fonte de carbono em combinação com glicose sobre as atividades enzimáticas

Para avaliar a influência das fontes de carbono combinadas à glicose, foi necessário explorar o mecanismo do microrganismo de secreção das enzimas amilase, CMCase e xilanase. De acordo com Griffin (1994), o metabolismo dos compostos de carbono oferece uma estrutura básica para a biossíntese de metabólitos intermediários, suprimento da necessidade de energia metabólica e poder de redução. Carboidratos que produzem glicose são os mais abundantes e amplamente utilizados como fontes de carbono e energia para os fungos, por essa razão o metabolismo do carbono é visto inicialmente como o metabolismo da glicose. Sendo assim, optou-se por averiguar a influência da glicose na secreção de enzimas, em combinações de fonte de carbono que além de oferecer energia para sustentar o crescimento do microrganismo pudesse atuar como indutor nas atividades enzimáticas.

5.6.1.1 Atividade de Amilase

Na Figura 5.16 esta apresentada atividade de amilase. Salientando que amido solúvel e glicose encontram-se em concentração inversamente proporcional, a Figura 5.16 esta representada em função da concentração de amido. No cultivo constituído por amido e glicose (ASG) foram observadas maiores atividades quanto maior concentração de glicose, seguidos de decréscimo da atividade ao longo do tempo de cultivo. A atividade máxima de amilase foi obtida em 2,5:7,5 ASG ($7,2 \text{ U.mL}^{-1}$), seguida de 5:5 ASG ($4,86 \text{ U.mL}^{-1}$) e 10:0 ASG ($3,82 \text{ U.mL}^{-1}$). Valores muito superiores foram encontrados quando amido solúvel foi empregado como fonte única de carbono (Figura 5.10), sendo obtidos os seguintes valores de amilase nas concentrações de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de amido ($3,97 \text{ U.mL}^{-1}$), seguida de 5 g.L^{-1} de amido ($6,06 \text{ U.mL}^{-1}$), $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de amido ($8,75 \text{ U.mL}^{-1}$) e 10 g.L^{-1} ($10,64 \text{ U.mL}^{-1}$). Segundo Gupta et al. (2003), a produção de α -amilase geralmente é induzida pela presença de amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose, enquanto que a glicose e outros açúcares como xilose e frutose podem reprimir a sua produção. Ao estudar a produção de amilases extracelulares através da fermentação no estado sólido de farelo de trigo por *Aspergillus oryzae*, Tunga e Tunga (2003) verificaram que a suplementação do meio com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose e lactose) não contribuíram para o aumento da atividade desta enzima.

Figura 5.16: Atividade de α -amilase para o cultivo com amido solúvel e glicose como fonte de carbono. Dados obtidos em três tempos de cultivo ($\blacktriangle$) 48 h, 84 h ($\bullet$) e 120h ($\blacksquare$)



O decréscimo na atividade de amilase, ao longo do cultivo constituído de ASG, pode ser associado à liberação de glicose no meio, uma vez que a produção ou a liberação da glicose devido à degradação do amido utilizado como indutor e como fonte de carbono, pela ação de amilases excretadas pelos microrganismos, pode inibir a produção da enzima (FERNANDES et al., 2007). Como discutido anteriormente, a inibição da produção de amilase pela presença de glicose em solução é conhecida como repressão catabólica (MONTEIRO; ULHOA, 2006; FERNANDES et al., 2007; BARATTO et al. 2011).

5.5.4.2 Atividade de CMCase

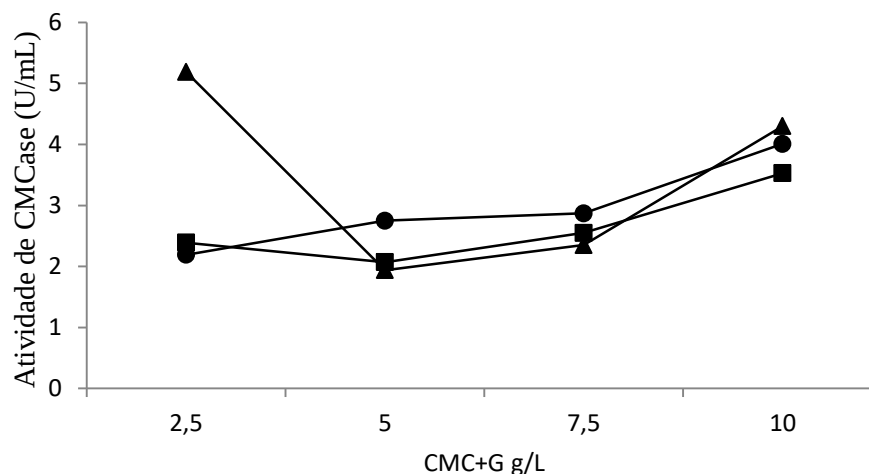
Na figura 5.17, é apresentada a atividade de CMCase para cultivo em CMC. Não será apresentada a figura referente à atividade de CMCase para cultivo em papel de filtro, pois o cultivo não apresentou valores relevantes.

Da Figura 5.17, para atividades de CMCase em cultivo constituído de CMC e glicose (CMCG), observa-se maior atividade enzimática em 48h de cultivo na concentração de 7,5:2,5 CMCG ($5,19 \text{ U.mL}^{-1}$), comportamento similar obtido em cultivo constituído de papel de filtro e glicose (PFG).

Foi observado comportamento similar para os resultados de CMC como fonte única de carbono, maiores atividades em 48 h, seguida de decréscimo, quanto maior tempo de cultivo, enquanto cultivo constituído de CMCG apresentou dois comportamentos distintos, para os tratamentos referentes a concentração de 2,5:7,5 CMCG e 10:0 CMCG observou-se maiores atividade nos tempos de 120, 84 e 48 h, respectivamente, o qual se assemelha ao comportamento obtido no item 5.2.2.2, enquanto tratamentos referentes à concentração de 7,5:2,5 e 5:5 de CMCG apresentam maiores valores de biomassa em 84, 120 e 48 h, respectivamente. A queda da atividade de CMCase no cultivo 10:0 e 2,5:7,5 de CMCG ocorre por duas razões. A primeira corresponde ao cultivo 10:0, onde, segundo Suto e Tomita (2001), ao analisar os mecanismos de indução e repressão de catabólitos da celulase em fungos, após o microrganismo reconhecer a existência da celulose, ele aciona a transcrição do gene da celulase mediada por proteínas ativadoras e elementos de ativação, causando degradação da celulose à glicose, favorecendo o crescimento. Com o aumento da concentração de glicose ocorre repressão catabólica, impedindo o fungo de sintetizar uma quantidade excessiva de celulasas em circunstâncias em que há abundância de fonte de carbono facilmente assimilável. Por essa razão, observa-se menor atividade de

CMCase, quanto maior tempo de cultivo em altas concentrações do indutor. Já para a concentração de 2,5:7,5 de CMCG, ocorre a repressão de CMCase em virtude da grande concentração de fonte de carbono prontamente assimilável.

Figura 5.17: Atividade enzimática de CMCase em presença de CMC + glicose como fonte de carbono. Dados obtidos em três tempos de cultivo (▲) 48 h, 84 h (●) e (■) 120 h



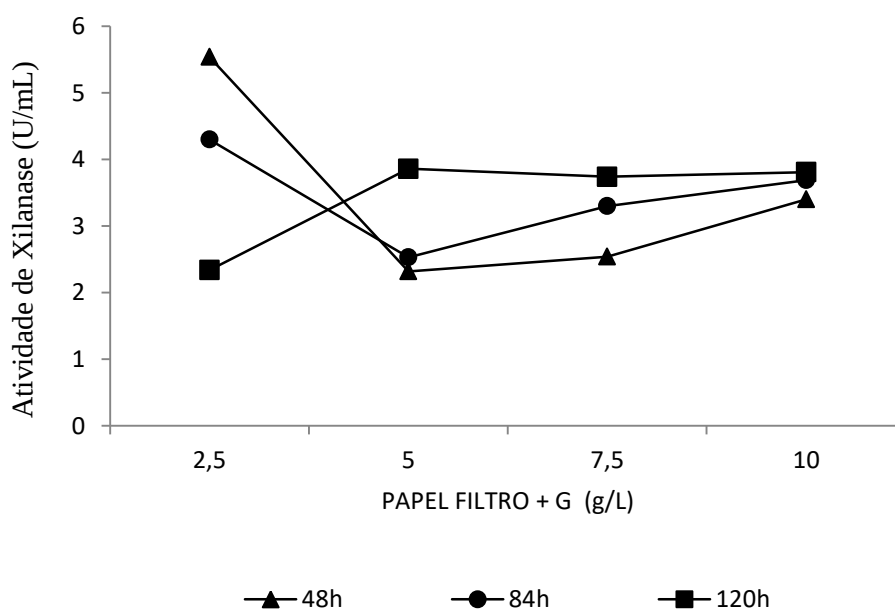
Quando comparados valores de atividade de CMCase obtidos em cultivo constituído de CMC como fonte única de carbono (Figura 5.12), observou-se maiores atividades de CMCase em relação aos tratamentos constituído de CMC combinado a glicose (Figura 5.14). Esses resultados se assemelham aos reportados por de Goyal e Soni (2011), que em cultivos submersos não suplementados de *Pleurotus florida* apresentaram maiores níveis de produção de celulasas em meio contendo CMC do que em meio com outras fontes de carbono, como farelo de trigo.

As atividades enzimáticas obtidas em cultivo constituído de papel de filtro, foram relevantes apenas na concentração de 10 g.L⁻¹ de papel de filtro em ausência de glicose, sendo encontrado valores de 0,8 U.mL⁻¹ para 48 horas de cultivos, 0,9 U.mL⁻¹ e 0,91 U.mL⁻¹ para os tempo de 84 e 120 horas de cultivos, respectivamente. As atividades observadas são muito baixas, o que pode estar vinculado à possível ação da glicose atuando como inibidor da atividade de CMCase, como já descrita por Goldbeck et al. (2012), ou simplesmente pela complexidade da composição do papel de filtro.

5.6.4.3 Atividade de Xilanase

Na Figura 5.18 são apresentados os resultados de atividade de xilanase obtidos à partir do cultivo em papel de filtro combinado à glicose. A atividade máxima foi obtida em 2,5:7,5 PFG ($5,54 \text{ U.mL}^{-1}$), em 48h de cultivo, seguida de 2,5:7,5 PFG ($4,43 \text{ U.mL}^{-1}$), em 84 h de cultivo. De maneira geral, observou-se que em 48 h e 84 h de cultivo as combinações constituídas de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ papel de filtro com $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose resultaram em maior produção de xilanase, comparados aos demais tratamentos também combinados à glicose.

Figura 5.18: Atividade enzimática de xilanase em presença de CMC + glicose como fonte de carbono. Dados obtidos em três tempos de cultivo ($\blacktriangle$) 48 h, 84 h ($\bullet$) e 120 h ($\blacksquare$)



Quando comparados os tratamentos constituídos de papel de filtro como fonte única de carbono (Figura 5.13), com os resultados obtidos quando a mesma fonte de carbono, nas mesmas concentrações, mas combinadas à glicose (Figura 5.18), observou-se que maiores valores de xilanase foram obtidos em tratamentos constituídos apenas de papel de filtro em concentração igual e superior à $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de papel de filtro, enquanto que para os tempos de 48 h e 84 h na concentração de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ papel de filtro apresentam maiores valores de xilanase quando combinados à glicose. Entretanto esse comportamento é justificável, uma vez que o microrganismo não teria estímulo para sintetizar uma enzima para degradar um substrato em baixa concentração. Zanchetta (2012), ao analisar a produção de xilanase em

meio de cultivo semi-sólido, tendo como fonte de carbono bagaço de cana e farelo de trigo na proporção (1:1), suplementados com 0,2% de glicose, observou que os resultados indicaram que a adição de glicose no meio de cultivo foram favoráveis a produção de xilanase e celulasas.

De maneira geral, observou-se que maiores atividades de xilanase foram obtidas em cultivo constituído somente de papel de filtro, como pode ser constatada na Figura 5.13, no entanto, quando o papel de filtro foi combinado à glicose as atividades reduziram, o que pode ter ocorrido devido repressão catabólica.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos em cultivo submerso do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, foi possível avaliar a influência dos macronutrientes sobre a geração de biomassa fúngica e da secreção das enzimas amilase, CMCase e xilanase. As principais conclusões que se pôde obter foram:

- Foi observada maior concentração de biomassa fúngica quando utilizada uma fonte de nitrogênio orgânico, enquanto que maiores atividades enzimáticas de CMCase, xilanase e amilase foram obtidos quando utilizada combinação de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio.
- A concentração das fontes de nitrogênio peptona e extrato de levedura não produziram diferença significativa na quantidade de biomassa micelial produzida. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho, não indicaram dependência das fontes de nitrogênio ou de suas concentrações, de modo que para *Myceliophthora thermophila* I-1D3b a síntese de biomassa parece estar mais relacionada à concentração da fonte do que à qualidade da fonte. Quanto as atividades enzimáticas, a secreção de CMCase foi afetada pelas fontes de nitrogênio, sendo que maiores atividades foram observadas em maior concentração de nitrogênio no cultivo com peptona. Para as atividades de amilase e xilanase não foi possível identificar uma relação entre as fontes de nitrogênio e as atividades enzimáticas.
- No estudo das fontes de carbono, mostrou-se como melhor fonte de carbono na obtenção de biomassa fúngica o amido solúvel. Através dos resultados obtidos quando analisada a influência das fontes de carbono sobre atividade enzimática e crescimento fúngico, constatou-se que as fontes de carbono surtem efeitos diferentes para cada substrato, os quais estão vinculados à composição dos substratos e à acessibilidade dos componentes neles presentes.

- Maiores atividade de CMCase e xilanase foram obtidas em cultivo constituído de carboximetilcelulose, e amilase em cultivo com amido solúvel. Para o cultivo com papel de filtro, não verificou-se possível relação entre a produção de biomassa e atividade de CMCase. Nesse trabalho, ficou evidente que cada fonte de carbono serviu como iniciador para as enzimas específicas, dada sua composição química e estrutural.
- Quando as fontes de carbono foram combinadas à glicose, para CMC e papel de filtro, a glicose introduzida atuou como um instigador inicial de crescimento. Entretanto, observou-se repressão catabólica para maioria das atividades enzimáticas analisadas.
- De maneira geral, não foi possível confirmar que o *Myceliophthora thermophila* I-1D3b possui especificidade para uma determinada fonte de carbono, visto que as fontes testadas possuem características distintas, além da complexidade dos constituintes de cada fonte.

7. REFERÊNCIAS

- AGUILAR USCANGA, M.; DELIA, M. L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 2v. 2005.
- ARCHER D. B.; WOOD D. A. Fungal exoenzymes. En: Gow NAR, Gadd GM, editores. **The growing fungus**. London: Chapman & Hall. p. 473, 1994.
- ADHIKARI, et al., 2008. Recovery of precious metals by using chemically modified waste paper. **New J. Chemistry**. n 32, p.1634–1641.
- BACHHETI, R.K., JOSHI, A., KHOLIYA, D. Lignocellulosic material – a source of fermentable sugar for conversion into ethanol as biofuel. **J. Graphic Era Univ.** v.1, p.311–314, 2010.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v.11,p.15-28, 2011.
- BARBA, et al. Synthesis and characterization of carboxymethylcelluloses (CMC) from non-wood fibers I. Accessibility of cellulose fibers and CMC synthesis. **Cellulose**, v. 9, p. 319-326, 2002.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 12, 2004.

BAYER, E. A. HENRISSAT, B. LAMED, R. The cellulosome: a natural bacterial strategy to combat biomass recalcitrance, biomass recalcitrance, in: M.E. Himmel (Ed.), *Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, Blackwell Publishing Ltd., England, pp. 407–435, 2009,

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.95-117, 1989.

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

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methodology Enzymology**. v.1, p. 149-158, 1955.

BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BONO et al., Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Palm Kernel Cake. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 3, p. 5-11, 2009.

BRASILIANO, R. A. P.; CASTRO, M. C.; SENNA, S. N.; ALVES-PRADO, H. F. Seleção de micro-organismos produtores de amilase isolados em áreas de Cerrado-MS. In: Encontro de Ciências da Vida, 7, 2013, Ilha Solteira. **Anais Ilha Solteira: UNESP**, 2013.

BURNS, P. J.; YEO, P.; KESHAVARZ, T.; ROLLER, S.; EVANS, C. S. Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp. *florida*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, n. 34, p. 566-572, 1994.

CARDOSO, E.R.; ASSIS, L.C; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.267-272, 2009.

CARLILE, M.;J.; WATKINSON, S.C. *The fungi*. London: Academic Press, 1997. 460 p.

CASCIATORI, Fernanda Perpétua. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo. 2015. 176 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of agro-industrial solid by-products applied in solid-state fermentation for cellulase production. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114-123, 2015.

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

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. **Italian Journal of Food Science**, p.9-15, 1992.

CHEN, W.Q., LOU, D.P., Synthesis of sodium carboxymethyl cellulose based on pretreated bamboo shaving. *Adv. Mater. Res.* 997, p.169–172, 2014.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006, 206 f. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CONN, E. E.; STUMPF F, P. K. Introdução à Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, p. 447, 1975.

CORRÊA, C.A.R. et al. Eng Sanit Ambient. **Eng Sanit Ambient.** v.14 n.4, p559-568, 2009.

CRUEGER, W. and CRUEGER, A. 1984. Biotechnology A Text Book of Industrial Microbiology. Translated by Caroline Haessly. Science Tech. Madison.

CRUZ, et al. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2459-64, 2001.

DAPIA, S.; SANTOS, V.; PARAJO, J. C. Carboxymethyl cellulose from totally chlorine free-bleached milox pulps. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 289-296, 2003.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; LIMA, D. J.; PRADELLA, J. G. Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 401-405, 2013.

DENARDIM, C. C. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, p. 945-954, 2009.

DEMIRBAS A. New liquid biofuels from vegetable oils via catalytic pyrolysis. *Energy Education Science and Technology* 2008;21:1–59.

Energy Sources, v. 27, p. 327-33, 2005. DONG, JL, et al. Influência das condições de cultivo sobre a produção de lacase e padrões isoenzimáticos na brancorot fungo *Trametes gallica*. **Journal of Microbiology basic**, vol. 45, no. 3, p. 190-198, 2005.

DUTT, D., TYAGI, C.H. Comparison of various eucalyptus species for their morphological, chemical, pulp and paper making characteristics. *Ind. J. Chem. Technol.* 18, p.145–151, 2011.

ELIASSON, A. C. Starch in food – Structure, function and applications. New York: Boca Raton, CRC, 200, p. 605, 2004

FASIDI, I. O.; OLORUNMAIYE, K. S. Studies on the requirement for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian mushroom. **Food chemistry**, v. 50, p. 397-401, 1994.

FAZENDA, M. L.; SEVIOUR, R.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Chapter 2. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 63, 2008.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia. p. 172-177, 1994.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERREIRA, N. R. **Micotecnologia aplicada à produção de 5-Hidroxi-2-Hidroximetil- γ -Pirona: uso potencial na indústria de alimentos**. 2006. 101f .Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Pará, 2006.

FLORES, R. A; QUINTANA, H; WAY, M. J. Deconstructing Abell 3266: A major merger in a quiet cluster. **The Astrophysical Journal**, v. 532, p. 206-213, 2000.

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

GERN, R. M. M. Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacádídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. 2005. 156f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities – Part I: Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**. 2012.10.034, 2012.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONG, C.S.; TSAO, G.T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. (Ed.). **Annual reports on fermentation process**. New York: Academic, 1979. v.3, p.111-139.

GOYAL, M.; SONI, G. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 1131-1136, 2011.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. 2. ed., New York: Wiley-Liss, 1994. 425p.

GUIMARÃES, João Borges. Produção de biomassa do *Agaricus blazei* Murrill em vários meios de cultura e desempenho e qualidade da carne de frangos de corte alimentados com ração suplementada com esse fungo. 2006. 140 f., Lavras : UFLA, 2006

GULSOY, S. K.; KUSTAS, S.; ERENTURK, S. The effect of old corrugated container (occ) pulp addition on the properties of paper made with virgin softwood Kraft pulps. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 5842-5849, 2013.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

GUZMAN, D. BASF to acquire enzymes biz verenum .company initiatives, investments, 2013. Disponível em: <<http://greenchemicalsblog.com/2013/09/23/basf-to-acquire-enzymes-biz-verenum>>

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

HAQ, I.; ASHRAF, S.; OMAR, S.; QADEER, M. A. Biosynthesis of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.5, p. 962-964, 2002.

HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. **Aamilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective co-fermentation of glucose and xylose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1852-1859, 1998.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

JONATHAN, S.G. and FASIDI, I.O. (2001) Effect of Carbon, Nitrogen and Mineral Resources on Growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian Edible Mushroom. **Food Chemistry**, 72, 479-483.

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

JOSHI, G. et al., Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from office waste paper: a greener approach towards waste management. **Waste Management**, v. 38, p. 33-40, 2015.

KLEMM, D., PHILIPP, B., HEINZE, T., HEINZE, U., WAGENKNECHT, W., 2001. Comprehensive cellulose chemistry fundamentals and analytical methods. **Wiley-VCH, Weinheim**, vol. 1, 2001.

KILIKIAN,B.V.; AFONSO,L.C.; SOUZA,T.F.C.; FERREIRA,R.G.; PINHEIRO,I.R.;Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. *Brazil Journal Microbiology*. v.45 n.1, 2014

KUHAD, R; DESWAL, D; SHARMA , S; BHATTACHARYA ,A; JAIN, K. K; KAUR, A; PLETSCHKE, B. I; SINGH, A; KARP, M. Revisiting cellulase production and refining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 411-456, 1999.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 648, 2006.

LARGE, P. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. **Yeast**, v.2,p. 1-34, 1986.

LEAL, J. B . Química do papel, 2014. Acessado em: 18 de julho de 2017. Disponível em: <https://13moleculasapular.wordpress.com/2014/01/10/quimica-do-papel/>.

LEIFA, F. et al. **Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biomassa de *Agaricus blazei* LPB03 em fermentação submersa.** VII Encontro Regional Sul de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Paraná, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. Coleção Biotecnologia Industrial. v. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos, Edgard Blücher, São Paulo, 2001 .593 p.

LIU, Z. et al. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 311–317, 2012.

MACENO, M. A. C. Resíduo de palma como substrato para a produção do complexo enzimático celulolítico. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MACHUCA, A. *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos de crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. 1991. 110f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene** v. 290, p. 1–18, 2002.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v.79, p.816-826, 1960.

MANSOURI, S.; KHIARI, R.; BETTAIEB, F.; EL-GENDY, A. A.; MHENNI, F. Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose from Tunisian Vine Stem: Study of Water Absorption and Retention Capacities. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 190-198, 2015.

MANU TAWIAH, W.; MARTIN, A. M. *Pleurotus ostreatus* requirements for P, K, Mg and Mn in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 34, p. 620-624, 1987.

MARCO, Evilin Giordana de Produção e caracterização de celulasas produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. Porto Alegre. 97f, 2012.

MARIO, P.; ADINUGRADA, D. W.; HARYADI, M. Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from Cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT). **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 164-169, 2005.

MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MILES TR, et al., Alkali deposits found in biomass power plants. A preliminary investigation of their extent and nature. Report of the National Renewable Energy Laboratory (NREL/TZ-2- 11226-1; TP-433-8142). Golden, CO, USA; 1995.

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

MINAFRA, C. S. **Produção e suplementação com alfa amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade.** 2007. 124f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. Springer-Verlag, 629 p., 1995. MONSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 92-99, 2006.

MOO-YOUNG, M., ed. Comprehensive biotechnology. **Oxford, Pergamon Press**, 1985. v.3. p.861-914

MORAES, Paula Louredo. A importância dos fungos para os seres humanos; Brasil Escola. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/a-importancia-dos-fungos-para-os-seres-humanos.htm>>. Acesso em 02 de agosto de 2017.

MORETTI, M. M. de S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

MOREY A. T.; MELQUIADES, F. L.; SANTOS-YABE, M. J.; ONO, M. A.; HIROOKA, Y. E.; ONO, E. Y. S. Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de fumonisina B1 por *Fusarium verticillioides* em meio líquido definido. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 647-654, 2009.

NIKOLOV, T.; BAKALOVA, N.; PETROVA, S.; BENADOVA, R.; SPASOV, S.; KOLEV, D. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 1-4, 2000.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática De Biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, p. 1549-1558, 2010.

ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanases production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 689-695, 2001.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Edible coatings for fresh-cut fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 657-70, 2005.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; ALENCAR, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, p.97-109, 2012.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149-161, 1999.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARIS, D.; SCHEUFELE, F. B.; JÚNIOR, A. T.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, p. 193-200, 2012.

PATERSON, R. R. GANODERMA – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, p.1985-2001, 2006.

PEDRI, ET al Influência das Fontes de nitrogênio Na Atividade enzimática e Crescimento de *Lentinula edodes* na biomassa de *eucalipto benthamii*. *Braz. J. Biol.* vol.75 no.4 São Carlos novembro 2015 Epub 10 de novembro de 2015

PEREIRA, D. E. P. Análise de celulasas e xilanasas por fungo isolado a partir do Bioma. 2013, 101f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia, 2013.

PEREIRA, et al. Thermophilic fungi as new. sources for production of cellulases and xylanases with potential. *J. Appl. Microbiol.* 118, 928–939.

PEREIRA, et al. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol Production. *Bioresource Technology* v.204, p.122–129, 2016

PINTO, T. O. P. Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e Aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos. 2010. 91f.

PITA, Will de Barros Estudo do metabolismo e influência de fontes de nitrogênio na fisiologia e expressão gênica da levedura *Dekkera Bruxellensis* / Will de Barros Pita. – Recife. 98 f, 2012

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

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology. 5th edition**. The McGraw-Hill Companies, p.1139, 2002.

PUTZKE, Jair; PUTZKE, Marisa Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**, 5^a.ed. Worth Publishers, New York, 1992.

RICHARDSON, S.; GORTON, L. Characterization of the Substituent Distribution in Starch and Cellulose Derivatives. **Analytica Chimica Acta**, v. 497 p. 27-65, 2003.

ROSADO, F. R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E. R.; DA COSTA, S. M.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* florida (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 230-237, 2003.

SANTOS, Sharline Fllorentino de Melo. Estudo em produção de pectinase por fermentação em estado sólido de caju como substrato, 2007, 151f. Natal, RN, 2007.

SANTOS, Ana Carolina Gomes dos. Cinética de crescimento do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 em cultivo no estado sólido. 2015. 94 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

SAPUTRA, A. Hb.; QADHAYNA, L.; PITALOKA, A. B.; Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose (CMC) from Water Hyacinth Using Ethanol-Isobutyl Alcohol Mixture as the Solvents. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, p. 36-40, 2014.

SILVEIRA, Marcia Luciana Lange. **Comparação entre o desempenho do inóculo sólido e inóculo líquido para cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SINDEN, J. W.; SCHISLER, L. C. Nutrient supplementation of mushroom compost at spawning. *Mushroom Science*. Oxford, v. 5, p. 267-280, 1962.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010

SIQUEIRA, F.G. de; SIQUEIRA, L.G. de; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FERREIRA FILHO, E.X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.20-26, 2011

SOCCOL, C. R.; ROJAN, P. J.; PATEL, A.; K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p. 221-230.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast, **BioResources**. 3(1): 234-246. 2008.

SOUZA, L. A.; ALVES, L. Composição química do papel. *Curiosidades químicas*, 2014. Disponível em: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/composicao-quimica-papel.htm>. Acessado em: 18 de julho de 2017.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUTO, M., & TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 305-311, 2001.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fedbatch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 59-66, 1999.

TERÇARIOLI, G. R.; BAGAGLI, E.; PALEARI, L.; O incrível mundo dos fungos; Editora: Unesp Temas: Microbiologia, Reino Fungi, Biologia P 128 , 2010.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004.

TONIAL, T. M; SOCCOL, C. R.; RAMOS, L. P.; CHIARELLO, M. D. (2000). Utilization of *Volvariella volvacea* to produce biomass from potato and cassava processing residues, by submerged fermentation. **Indian J. Microbiol.** v.40: p.35-40.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia.10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, cap. 6: Crescimento microbiano, p. 156-174.

TUNGA, R.; TUNGA, B. S. Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation. **International Center for Biotechnology**, p. 12, 2003.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p.137-155, 2002.

VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p. 245-266, 2004.

VITTI, Lina Silber Schmidt; SILVA, Darcy Martins da. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo Aspergillus sp e de seus mutantes isolados do bagaço de cana.** Piracicaba, 1988.

WANG, L.; YANG, S. T. Chapter 18. Solid state fermentation and its applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p. 465-471, 2007.

WISBECK, E.; ROBERT, A. P.; FURLAN, S. A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal**, v. 3, p. 07-10, 2002.

ZANCHETTA, A. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica.- São José do Rio Preto : [s.n.], 100 f, 2012.

ZANELATO, A. I. celulolíticas produção de enzimas por fermentação em estado sólido em um biorreator de leito fixo. São José do Rio Preto, Brasil, 113p. 2011.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMÉO, J.C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, 1536-1544, 2012.

XU C. P, et al. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1025-1030, 2003.

YEOMAN, Y. et al. Thermostable Enzymes as biocatalysts in the biofuel industry, **Adv. Appl. Microbiol.** v. 70, p. 1–55, 2010.