



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Ariane Zanchetta

**Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e
submersa utilizando biomassa lignocelulósica**

São José do Rio Preto - SP

2012

Ariane Zanchetta

Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Alonso Bocchini Martins

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP

2012

Ariane Zanchetta

**Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e
submersa utilizando biomassa lignocelulósica**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Adriane Maria Ferreira Milagres

USP – Lorena

Prof. Dr. Maurício Boscolo

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de Março de 2012

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Vilma e José Luis por todo amor e incentivo em todos os momentos da
minha vida.

A minha irmã pelo carinho e paciência e ao Pedro por toda alegria que tem me
proporcionado nos últimos cinco anos.

Agradecimentos

À Deus e aos amigos espirituais que sempre me ampararam;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes, pelo privilégio e oportunidade concedidos, e, sobretudo, pela confiança, orientação e apoio para realização deste trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini-Martins pela amizade, auxílio e co-orientação;

Aos Profs Roberto da Silva e Maurício Boscolo pelas contribuições durante a realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe Torres pela concessão da cepa utilizada no trabalho;

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela dedicação no atendimento;

A Gabi, Larissa e Gisele, pela sincera amizade e companheirismo em nossa casa;

À Márcia Maria de Souza Moretti pela paciência e auxílio em todas as etapas do trabalho;

Aos meus colegas e amigos dentro e fora do laboratório, Ana Lúcia, Andréia, Ariane, Bárbara Bonine, Bárbara Garcia, Carol Bezerra, Celso, Cristiane, Ellen, Fabiana, Felipe, Fernanda, Gisele, Janaína, Josiane, Larissa, Márcia, Rafaela, Sara, Tássia e Thiago pela ajuda, incentivo e momentos felizes nos últimos anos. Em especial a Isabel, Diego e Olavo que participaram de forma mais efetiva neste trabalho;

A FAPESP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

INDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Gerais	2
2.2. Específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Biomassa lignocelulósica	3
3.2. Celulases e hemicelulases	5
3.3. Uso de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas microbianas por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm).....	7
3.4. Microrganismos e enzimas termofílicas.....	11
3.5. Pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Microrganismos.....	18
4.2. Meios de cultivo	18
4.2.1. Meio nutriente sólido	18
4.2.2. Meios de cultivo para fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm).....	18
4.2.3. Meio nutriente para fermentações submersas	19
4.3. Pré-inóculos.....	19
4.4. Processos fermentativos	19
4.4.1. Fermentação em estado sólido (FES).....	19
4.4.2. Fermentação submersa (FSm).....	20
4.5. Reuso do substrato lignocelulósico	20
4.6. Determinação das atividades enzimáticas	20
4.6.1. Xilanase.....	20
4.6.2. Endoglucanase (CMCase)	21

4.6.3. Avicelase	21
4.6.4. Beta-glicosidase	21
4.7. Determinação quantitativa de açúcares redutores da solução enzimática bruta obtida por FSm e do hidrolizado	22
4.8. Determinação da massa celular seca resultante da fermentação submersa– Estimativa de crescimento	22
4.9. Caracterização das enzimas.....	22
4.9.1 Efeito das variações no pH de reação e da temperatura de incubação sobre as atividades enzimáticas.....	22
4.10. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar.....	22
4.11. Hidrólise enzimática do material lignocelulósico	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Produção das celulasas e hemicelulasas por fermentação em estado sólido (FES).....	25
5.2. Influência do pH e granulometria do substrato utilizado como fonte de carbono para a produção de xilanase e celulasas por <i>Chaetomium sp.</i> N13 em FSm – ensaios preliminares. 33	
5.3. Avaliação da produção de celulase e xilanase em fermentação submersa (FSm).....	37
5.4. Produções de xilanase e celulasas por fermentação submersa utilizando duas fontes de carbono purificadas	51
5.5. Análise comparativa das produções de xilanase e celulasas por FES e FSm.....	55
5.6. Reuso do material lignocelulósico em uma nova FES	63
5.7. Produção dos extratos enzimáticos para a hidrólise	67
5.8. Efeito do pH e temperatura na atividade das enzimas produzidas por <i>Chaetomium sp</i> N13 e <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	68
5.9. Hidrólise enzimática do material lignocelulósico	70
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. APÊNDICE	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da parede celular secundária de um vegetal	3
Figura 2: Estrutura representativa das cadeias de celulose	4
Figura 3: Representação esquemática de um sistema celulolítico	6
Figura 5: Fatores que limitam a eficiência da hidrólise da celulose.	16
Figura 6: Produção de xilanase e celulasas por <i>Chaetomium sp.</i> N13 em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.....	26
Figura 7: Produção de xilanase e celulasas por <i>Humicola grisea var. thermoidea</i> em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.....	28
Figura 8: Produção de xilanase e celulasas por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> . N31 em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.	30
Figura 9: Perfil de produção de xilanase e celulasas por <i>Chaetomium sp.</i> N13 em diferentes substratos	35
Figura 10: Produção de xilanase e celulasas em diferentes faixas de pH	36
Figura 11: Produção de xilanase e celulasas por <i>Chaetomium sp.</i> N13 em diferentes substratos em fermentação submersa	39
Figura 12: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por <i>Chaetomium sp.</i> N13, utilizando diferentes fontes de carbono	40
Figura 13: Produção de xilanase e celulasas por <i>Humicola grisea var. thermoidea</i> em diferentes substratos em fermentação submersa.....	42
Figura 14: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por <i>Humicola grisea var. thermoidea</i> , utilizando diferentes fontes de carbono.....	43
Figura 15: Produção de xilanase e celulasas por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> . N31 em diferentes substratos em fermentação submersa.....	45
Figura 16: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31, utilizando diferentes fontes de carbono	46
Figura 17: Produção de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase por <i>Chaetomium sp.</i> N13 em FSm, utilizando fontes de carbono purificadas.....	52
Figura 18: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por <i>Chaetomium sp.</i> N13, utilizando carboximetilcelulose e celulose microcristalina (avicel) como fonte de carbono	53

Figura 19: Produção de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase, por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> em FSm, utilizando fontes de carbono purificadas	54
Figura 20: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> , utilizando carboximetilcelulose e celulose microcristalina (avicel) como fonte de carbono	55
Figura 21: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por <i>Chaetomium</i> sp. N13	64
Figura 22: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	65
Figura 23: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	66
Figura 24: Efeito do pH e temperatura na atividade de xilanase, CMCase e beta-glicosidase produzidas por FES em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	69
Figura 25: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática do bagaço de cana <i>in natura</i> . b) Peso seco do bagaço de cana <i>in natura</i> após hidrólise enzimática.	72
Figura 26: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática da palha de cana. b) Peso seco da palha de cana após hidrólise enzimática	73
Figura 27: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado. b) Peso seco do bagaço de cana pré-tratado após hidrólise enzimática.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Carga enzimática (U/g substrato seco hidrolisado) de POWERCELL e dos preparados enzimáticos de <i>Chaetomium sp</i> N13 e <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana <i>in natura</i> , pré-tratado e palha de cana <i>in natura</i>	24
Tabela 2: Comparação das produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase dos fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação em estado sólido.	32
Tabela3: Dados de literatura sobre as produções de xilanase, CMCase, β -glicosidase e exoglucanase de diferentes fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação em estado sólido.	33
Tabela 4: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase dos fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação submersa.	47
Tabela 5: Comparação entre as produções de xilanase, CMCase, beta-glicosidase por diferentes fungos cultivados em fermentação submersa com material lignocelulósico como fonte de carbono.	48
Tabela 6: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase do fungo <i>Chaetomium sp</i> . N13 cultivado em material lignocelulósico e fontes de carbono purificadas em fermentação submersa.	53
Tabela 7: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase do fungo <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> cultivado em material lignocelulósico e fontes de carbono purificadas em fermentação submersa.	55
Tabela 8: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por <i>Chaetomium sp</i> . N13 em FES e FSm em função do substrato utilizado. .	57
Tabela 9: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> em FES e FSm em função do substrato sólido utilizado.	59
Tabela 10: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em FES e FSm em função do substrato sólido utilizado.	61
Tabela 11: Atividade enzimática (U/g substrato seco utilizado na hidrólise) de POWERCELL e dos preparados enzimáticos de <i>Chaetomium sp</i> N13 e <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana <i>in natura</i> , pré-tratado e palha de cana <i>in natura</i>	70

RESUMO

O aumento no consumo de combustíveis fósseis e a crescente preocupação ambiental multiplicaram o interesse por tecnologias limpas e de baixo custo, para a obtenção de produtos de valor agregado para as indústrias química, energética e de alimentos. Neste contexto, as enzimas tem sido importantes ferramentas em diversos processos, principalmente no que diz respeito à produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Neste trabalho foi avaliado o perfil de produção enzimática dos fungos termofílicos *Chaetomium sp.* N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1, 1:9 ou 9:1), palha de milho e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1), cevada e farelo de trigo (9:1) e, somente farelo de trigo como substratos. No processo de fermentação em estado sólido, a maior produção de xilanase (1569,4 U/g ou 78,5 U/mL) foi obtida por *Chaetomium sp.* N13 em 240h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi o melhor produtor de CMCase (232,8 U/g ou 11,6 U/mL), avicelase (18,1 U/g ou 0,9 U/mL) e beta-glicosidase (124,9 U/g ou 6,2 U/mL) em 240h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), 192h de cultivo em cevada e farelo de trigo (9:1) e 288h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9), respectivamente. No processo de fermentação submersa, a maior produção de xilanase (35,4 U/mL) foi obtida por *Chaetomium sp.* N13 em 96h de cultivo em palha de milho e cevada (9:1). O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi o melhor produtor de CMCase (6,4 U/mL) e beta-glicosidase (1,4 U/mL) em 120h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). As produções de avicelase, por *Chaetomium sp.* N13 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foram semelhantes. A sacarificação da palha de cana e do bagaço de cana (*in natura* e pré-tratado), pela ação dos extratos enzimáticos brutos produzidos por *Chaetomium sp.* N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* além de uma enzima comercial, também foi avaliada. O maior rendimento de açúcares redutores, (111,7 mg/g peso seco) foi obtido pela ação da enzima comercial, seguido pelas enzimas de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (71,3 mg/g peso seco), sobre o bagaço de cana pré-tratado.

ABSTRACT

The increase in the consumption of fossil fuels and the growing environmental concern have increased the interest in clean and low-cost technologies for the obtaining of added value products for chemical, energy and food industries. In this context enzymes have been important tools in several processes, especially regarding to the production of ethanol from lignocellulosic material. This study the profile of enzyme production of the thermophilic fungi *Chaetomium* sp. N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* and *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 by solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) on sugar cane bagasse and wheat bran (1:1, 1:9 or 9:1), maize straw and wheat bran (9:1), straw of maize and barley (9:1), barley and wheat bran (9:1) and only wheat bran as substrates were evaluated. By SSF, the largest production of xylanase (1569,4 U/g or 78.5 U/mL) was obtained by *Chaetomium* sp. N13 at 240h of cultivation in sugar cane bagasse and wheat bran (1:1). The fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* was the best producer of CMCase (232.8 U/g or 11.6 U/mL), avicelase (18.1 U/g or 0.9 U/mL) and beta-glucosidase (124.9 U/g or 6.2 U/mL) at 240h of cultivation in sugar cane bagasse and wheat bran (1:1), 192h of cultivation in barley and wheat bran (9:1) and 288h of cultivation in sugar cane bagasse and wheat bran (1:9), respectively. By SF, the largest production of xylanase (35.4 U/mL) was obtained by *Chaetomium* sp. N13 at 96h of cultivation in straw of maize and barley (9:1). The fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* was the best producer of CMCase (6.4 U/mL) and beta-glucosidase (1.4 U/mL) at 120h of cultivation in sugar cane bagasse and wheat bran (1:1). The productions of avicelase by *Chaetomium* sp. N13 and *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 were similar. The saccharification of sugarcane straw and bagasse (*in natura* and pre-treated) by the action of the crude enzymatic extract produced by *Chaetomium* sp. N13 and *Humicola grisea* var. *thermoidea* and by a commercial enzyme was also evaluated. The highest yield of reducing sugars (111.7 mg/g of dry substrate) was obtained by the action of the commercial enzyme, followed by enzymes from *Humicola grisea* var. *thermoidea* (71.3 mg/g dry substrate), on the sugar cane bagasse pretreated.

1. INTRODUÇÃO

Com a escassez dos combustíveis fósseis e a decorrente necessidade em encontrar uma fonte alternativa de combustível e energia renovável, há um grande interesse na utilização de celulases e outras enzimas para bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis. As celulases correspondem as enzimas com a terceira maior produção industrial do mundo (SINGHANIA et al., 2010). Elas são amplamente aplicadas nas indústrias têxtil, de papel e celulose, extração de sucos, detergentes e nutrição animal. Essa utilização tenderá a um acentuado aumento se o etanol de biomassa lignocelulósica, produzido através de rotas enzimáticas, vir a ser um combustível de ampla utilização (SINGHANIA et al., 2010).

As celulases são enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, o principal componente da parede celular vegetal. As três principais celulases são endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, que agem de forma sinérgica para a completa hidrólise do polímero. As endoglucanases também designadas CMCase, hidrolisam regiões internas aleatoriamente, principalmente as regiões amorfas, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e consequentemente novas cadeias terminais. As exoglucanases (avicelases) agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras e não-redutoras do polímero de celulose, liberando glicose ou celobiose como principais produtos. As β -glicosidases hidrolisam celobiose e em alguns casos outros oligossacarídeos à glicose (LYND et al., 2002; YEOMAN, 2010).

Os microrganismos são fontes preferenciais de celulases, devido à ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (YEOMAN, 2010). Entre os microrganismos os fungos filamentosos apresentam diversas vantagens em função do grande potencial de secreção desse grupo de enzimas (ÖGEL et al., 2001; GOMES et al., 2007). A produção de etanol lignocelulósico através de rotas biológicas mostra-se atrativo por diversas razões, entre elas a natureza renovável, o baixo custo e a abundância da biomassa. A principal limitação no desenvolvimento de uma tecnologia viável de etanol lignocelulósico é o alto custo e os baixos níveis de produção da enzima. Portanto, a melhoria nos níveis de produção são altamente desejáveis para a conversão de biomassa (SINGHANIA et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Produção de celulasas por espécies fúngicas termofílicas em FES e FSm, utilizando biomassa lignocelulósica, visando a aplicação dessas enzimas na hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis a bioetanol.

2.2. Específicos

- Avaliar diferentes meios e suplementações para a produção de celulasas em FES e em FSm utilizando fungos termofílicos das culturas estoques do Laboratório;
- definir qual o melhor método de cultivo (FES ou FSm) para a produção de celulasas por cada um dos fungos a serem estudados;
- determinar o melhor tempo de cultivo para a máxima produção do complexo celulolítico excretado pelos diferentes fungos;
- avaliar a possibilidade de reuso do material sólido residual de uma fermentação como substrato para uma nova fermentação.
- avaliar o potencial de hidrólise do bagaço e palha de cana pelas enzimas produzidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biomassa lignocelulósica

A parede celular vegetal é uma estrutura biologicamente complexa, composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, além de pequena quantidade de pectina, proteínas, extrativos e cinzas (Fig.1). A proporção de cada componente do material vegetal varia de acordo com a espécie, maturidade e local de cultivo da planta (PRASAD et al., 2006).

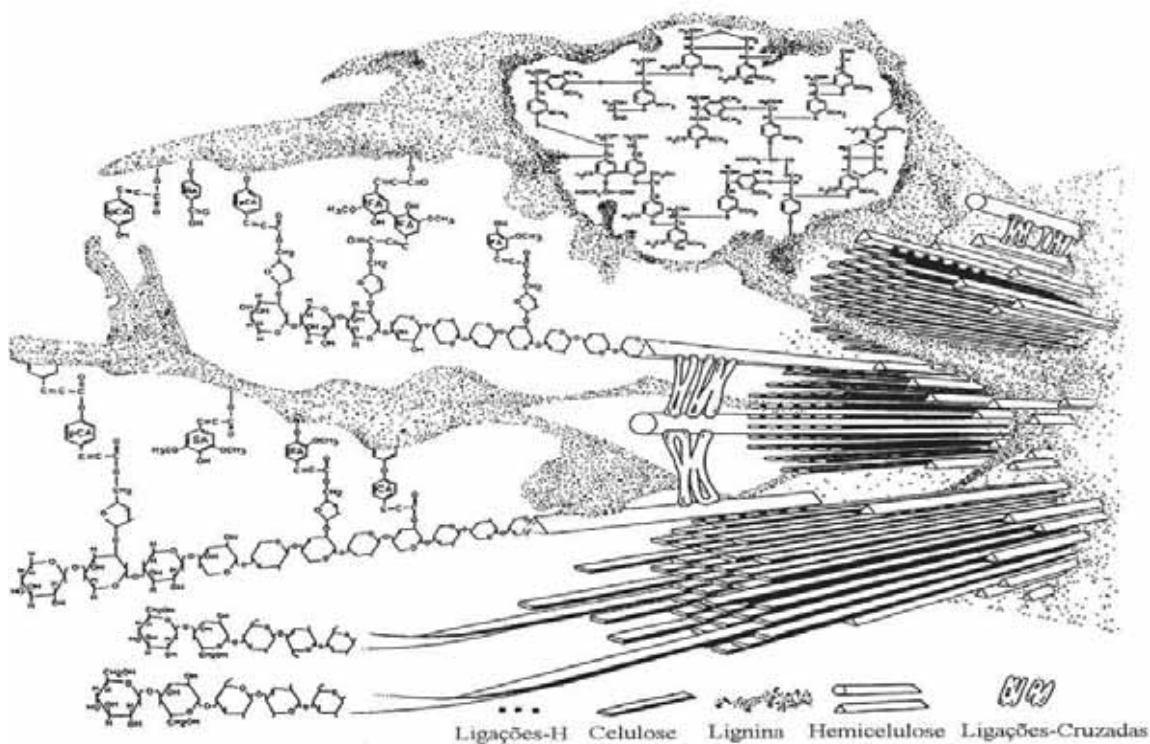


Figura 1: Representação esquemática da parede celular secundária de um vegetal mostrando as cadeias lineares da celulose e as ramificadas da hemicelulose imersas em uma matriz de lignina (BIDLACK et al., 1992).

A celulose é um polímero linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (ZHANG et al., 2006; CHAMPAGNE; LI, 2009) (Fig. 2). As moléculas de celulose ligam-se umas as outras por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando fibrilas (SÁNCHEZ, 2009). Várias fibrilas de celulose são agregadas umas as outras formando as microfibrilas. Estas microfibrilas são constituídas

por regiões cristalinas rigorosamente ordenadas e por regiões amorfas menos ordenadas (SÁNCHEZ, 2009). Microfibrilas formam as macrofibrilas e estas formam fibras. A celulose pode ser hidrolisada por tratamentos ácidos ou enzimáticos (BALAT; BALAT, 2009), resultando em produtos solúveis, de baixo peso molecular como hexoses e celobioses (ROMERO et al., 1999; CAMASSOLA; DILLON, 2009) que podem ser fermentados para a produção de etanol (SUN; CHENG, 2002; CHEN et al., 2008).

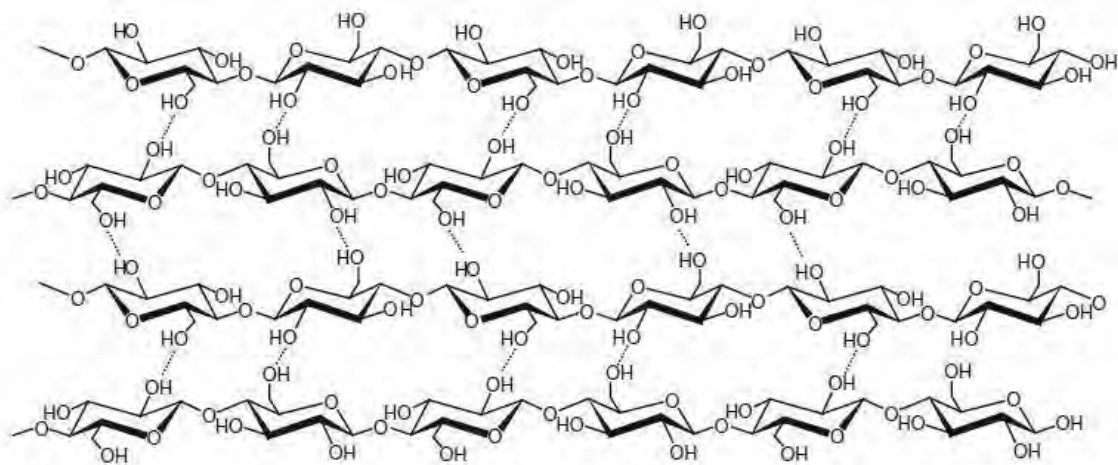


Figura 2: Estrutura representativa das cadeias de celulose (Yeoman et al,2010) com modificações.

O segundo constituinte mais importante do material lignocelulósico é a hemicelulose (BALAT et al., 2008). A hemicelulose é um polímero heterogêneo que representa de 15 a 35% da biomassa vegetal. Pode ser constituído por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e/ou ácidos urônicos. Outros açúcares como ramnose e fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades e, os grupos hidroxil dos açúcares podem ser substituídos por grupos acetil. As xilanas são os principais componentes da hemicelulose da parede celular secundária, constituindo de 20 a 30% da biomassa de madeiras duras e plantas herbáceas (YEOMAN et al, 2010).

A lignina é o componente não-carboidrato mais importante da biomassa lignocelulósica. Este polímero é composto por unidades de fenilpropano (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) conectadas por diferentes ligações C-C e ligações C-O-C (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007) e tem como principal função conferir rigidez à parede celular. A lignina geralmente está distribuída junto com a hemicelulose no espaço entre as microfibrilas de celulose em ambas as paredes

celulares, primária e secundária, e na lamela média, para adesão celular (ERIKSSON; BERMEK, 2009). Essa estrutura aromática, altamente estável, é um dos maiores obstáculos para a hidrólise enzimática da lignocelulose (PRASAD et al., 2006; KO et al., 2009). A lignina forma um escudo de proteção em torno da celulose e da hemicelulose, protegendo esses polissacarídeos da degradação enzimática (DAWSON; BOOPATHY, 2007; LI et al., 2009).

3.2. Celulases e hemicelulases

As enzimas envolvidas na hidrólise da celulose correspondem ao complexo enzimático celulolítico que é constituído por enzimas com diferentes especificidades para hidrolisar ligações glicosídicas (SÁNCHEZ, 2009). As três principais celulases são: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.9.1) e β -glucosidases (EC 3.2.1.2.1) (GRAY et al., 2006; GAO et al., 2008) que atuam de forma sinérgica para degradar celulose à glicose (ÖGEL et al., 2001; LEVIN et al., 2008). As endoglucanases atacam regiões de baixa cristalinidade das fibras de celulose, criando novas cadeias terminais livres ao acaso (PRASAD et al., 2006). As exoglucanases degradam a molécula removendo unidades de celobiose das cadeias terminais livres (ZHOU et al., 2008). As β -glucosidases hidrolisam celobiose a glicose (LYND et al., 2002; BALAT et al., 2008) (Fig. 3). A natureza insolúvel e recalcitrante da celulose representa um desafio para o sistema celulolítico.

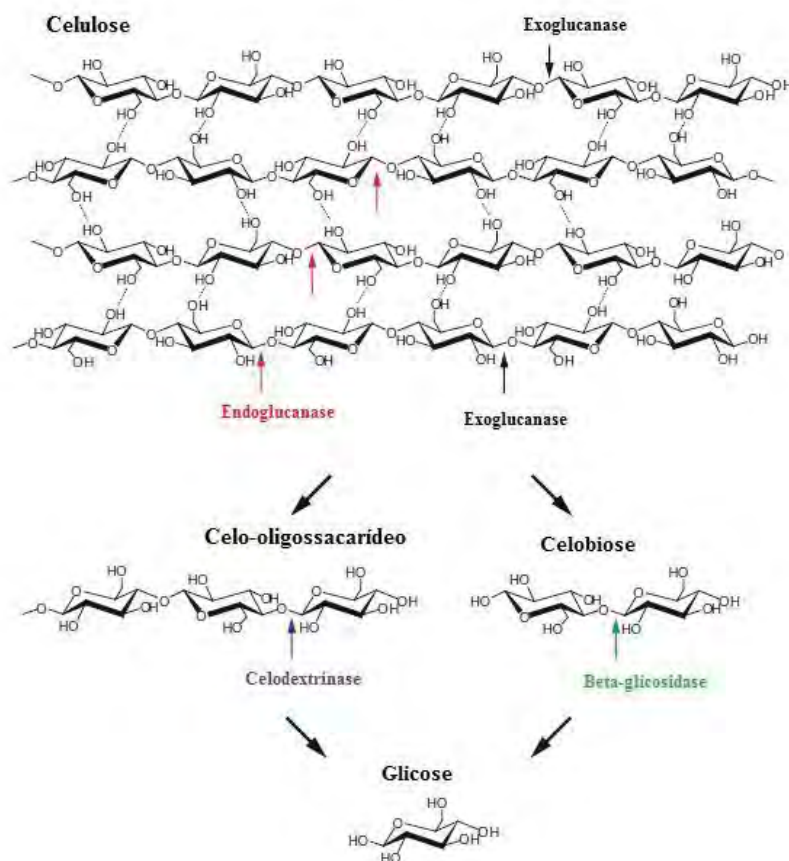


Figura 3: Representação esquemática de um sistema celulolítico.(Yeoman et al.,2010)

As enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose são as xilanases, que assim com as celulasas, apresentam ação sinérgica para promover a hidrólise do polímero a açúcares simples (KESHWANI; CHENG, 2009). As endo- β -1,4 -xilanases (EC: 3.2.1.8) atacam o esqueleto estrutural da molécula, e as β -xilosidades (EC: 3.2.1.3.7), hidrolisam pequenos xilooligosacarídeos em xilose. (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; KESHWANI; CHENG, 2009).

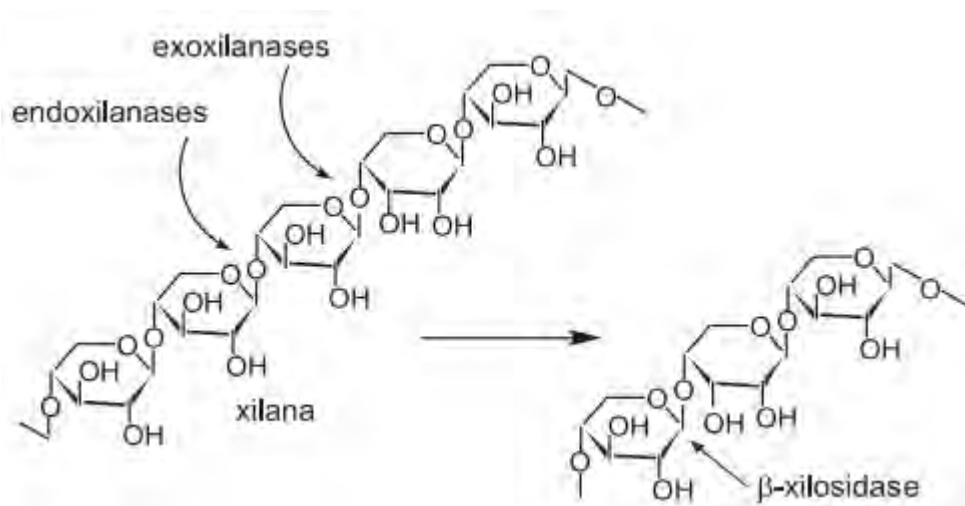


Figura 4: Estrutura da molécula de xilana e ação das xilanases. Endo- β -1,4-xilanases hidrolisam as ligações glicosídicas β ,1-4 internas das moléculas de xilana liberando xilooligossacarídeos, enquanto que as exo- β -xilanases liberam xilose a partir das extremidades não-redutoras das xilanas; as β -xilosidases liberam xilose a partir da xilobiose ou xilooligossacarídeos curtos (GOMES et al., 2007).

Celulases e hemicelulases comerciais têm sido usadas em diversas aplicações, incluindo indústrias têxteis e de detergentes, indústrias de polpa e papel, ração animal, extração de sucos de frutas e vegetais, processamento do amido e produção de etanol (HEBEISH et al., 2009; DOGARIS et al., 2009; WILSON, 2009). Entretanto, o principal gargalo para a aplicação abrangente da celulase na indústria é o alto custo de produção da enzima (AHAMED; VERMETTE, 2008; SOHAIL et al., 2009). 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; SUKUMARAN et al., 2009).

3.3. Uso de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas microbianas por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm).

O principal obstáculo para a aplicação abrangente da celulase na indústria é o alto custo de produção da enzima (AHAMED; VERMETTE, 2008; SOHAIL et al., 2009). A fonte de carbono utilizada no cultivo dos microrganismos tem sido apontada como um dos fatores que mais afetam o rendimento e o custo de produção das mesmas (GAO et. al., 2008; DAWSON; BOOPATHY, 2007).

A biomassa lignocelulósica, especialmente resíduos agrícolas, são conhecidos como excelentes fontes de carbono para crescimento fúngico (SÁNCHEZ, 2009). Esse crescimento só se viabiliza com a secreção de enzimas lignocelulolíticas pelas hifas para hidrólise do substrato e fornecimento de açúcares para a sustentação do crescimento microbiano (ELISASHVILI et al., 2008).

O substrato lignocelulósico ideal deve ser barato, de fácil processamento, disponível em grande quantidade e, sua composição deve ser adequada tanto para a hidrólise quanto para a produção das enzimas celulolíticas (JUHÁSZ et al., 2005).

Existem diversos estudos sobre o uso de resíduos agrícolas, florestais e municipais na produção de enzimas que podem ser utilizadas em importantes bioprocessos industriais (ROMERO et al., 1999; WANG; YANG, 2007). Vários subprodutos agroindustriais como, farelo de trigo, palhiços, sabugo e talos de milho, polpa de frutas, resíduos de tubérculos, cascas de sementes e farelos residuais da obtenção de óleos, podem ser explorados por meio de fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas uma vez que contêm, além de fonte de carbono, diversos nutrientes essenciais para o crescimento microbiano como fósforo, nitrogênio e potássio (DOGARIS et al., 2009; ÖGEL et al., 2001).

Grandes quantidades de biomassa vegetal são produzidas pela agroindústria. No Brasil a agroindústria de milho, cana de açúcar, arroz, mandioca, trigo, citrus, coco e gramíneas, geram coletivamente 597 milhões de toneladas de resíduos por ano (FERREIRA-LEITAO et al, 2010). O ideal seria o uso desses recursos renováveis para a produção sustentável via cultivo microbiano de produtos químicos. Caso essa biomassa não seja utilizada na geração de produtos de alto valor agregado, ela permanecerá no fluxo de resíduos, necessitando de tratamentos caros ou precisando ser eliminada (WANG; YANG, 2007). Dessa forma, a utilização desses resíduos como substratos para a produção de enzimas através de fermentação em estado sólido e fermentação submersa tem se mostrado muito interessante.

O processo de fermentação em estado sólido desde a muito tem sido aplicado na produção de alimentos (WANG; YANG, 2007). A FES envolve sólidos na ausência ou quase ausência de água livre entre as partículas do substrato, porém, com umidade suficiente para o crescimento e metabolismo microbianos (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009). Este processo simula as condições de vida dos fungos filamentosos, que crescem sob materiais sólidos, produzindo enzimas para degradá-lo e

assim utilizar seus nutrientes para sua sobrevivência. Portanto, esta técnica reproduz processos microbiológicos naturais como a compostagem e a ensilagem (SINGHANIA et al., 2009).

Atualmente existe um grande interesse em relação à FES, devido a potencial aplicação em bioprocessos. A técnica pode ser utilizada em biorremediação, biodegradação de compostos recalcitrantes, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, bioconversão de biomassa, biotransformação de resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional, biopolpação e produção de produtos de alto valor agregado, tal como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento vegetal, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biosurfactantes, biocombustíveis, etc. (SINGHANIA et al., 2009; WANG; YANG, 2007).

A FES possui diversas vantagens biotecnológicas e ambientais. As vantagens biotecnológicas envolvem maior produtividade, maior concentração de produtos finais, maior estabilidade dos produtos, menor repressão catabólica, cultivo de microrganismos especializados em substratos insolúveis em água, ou cultivo de misturas de vários fungos (SINGHANIA et al., 2009). Além dessas vantagens, os esporos fúngicos produzidos por FES mostram maior estabilidade e maior resistência à seca, além de maiores taxas de germinação do que os esporos produzidos por FSm (HÖLKER; LENZ, 2005).

As vantagens ambientais da FES se devem ao fato do processo ser conduzido em baixa quantidade de água, resultando no mínimo consumo de água e, portanto menor geração de efluentes. Além disso, como o processo é realizado em atividade de água abaixo de 1, o crescimento de bactérias e leveduras contaminantes é minimizado. Outra vantagem ambiental é a possibilidade do uso de resíduos agrícolas como fonte de carbono e energia. A produção de enzimas e ácidos orgânicos frequentemente usa resíduos vegetais como fontes de carbono e indutores ou mediadores (HÖLKER; LENZ, 2005). Se por um lado, a utilização de resíduos agrícolas de baixo custo em FES aumenta a viabilidade econômica do processo, por outro, resolve os problemas de poluição causados pelo acúmulo desses resíduos (SINGHANIA et al., 2009).

Fatores como temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, natureza do substrato sólido empregado, etc., são importantes para o estabelecimento da FES. Destes, a umidade e a natureza do substrato são os fatores que mais afetam o processo de FES. A seleção da umidade depende do microrganismo empregado e também da

natureza do substrato. Fungos necessitam de uma umidade menor, 40 a 60% de umidade podem ser suficientes, mas a seleção do substrato depende de diversos fatores principalmente os relacionados com o custo e disponibilidade e, portanto, podem envolver a seleção de diversos resíduos agroindustriais (SINGHANIA et al., 2009). A alta porcentagem de umidade resulta em baixa porosidade do substrato, o qual por sua vez impede a penetração de oxigênio, no entanto, a baixa umidade pode levar a uma pobre acessibilidade dos nutrientes resultando em dificuldades para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009).

A principal razão para que a FES ainda não tenha sido amplamente escolhida são problemas relacionados à engenharia dos bioreatores, dificuldade de padronização do processo e a limitada reprodutibilidade dos resultados. O aumento de escala representa o ponto chave para a utilização do processo de FES, uma vez que diferenças nos gradientes de temperatura, umidade, concentração de substrato e outras mais, podem surgir ao longo do processo e, podem ter um efeito adverso. A interrelação entre os fatores ambientais tal como conteúdo de oxigênio nível de umidade e temperatura contribuem para dificultar a regulação desses parâmetros (HÖLKER; LENZ, 2005). O crescimento microbiano sob condições aeróbias em biorreator resulta em considerável produção de calor, causando um rápido aumento na temperatura. Este efeito que é desejável em compostagem geralmente é fatal para os processos biotecnológicos, porque a grande parte das enzimas produzidas durante a fermentação podem ser desnaturadas pelo calor até o fim do processo (MULLER DOS SANTOS et al., 2004). Na ausência de água livre, a remoção do calor produzido é dificultada. Como alternativa o processo de resfriamento é realizado através da evaporação, o que requer uma taxa muito maior de aeração, uma vez que o aumento da atividade metabólica, associado à maior produção de calor, tem que ser super-recompensado por uma alta intensidade de aeração (HÖLKER; LENZ, 2005). Entretanto, avanços têm sido realizados nesta área. Com o advento da engenharia bioquímica, diversos bioreatores têm sido desenvolvidos, os quais podem superar os problemas no aumento da escala e também monitorar diversos parâmetros como a transferência de massa e calor (SINGHANIA et al., 2009).

Outros desafios dessa técnica são a purificação dos produtos finais e a estimativa da biomassa. A separação da biomassa, essencial para estudos cinéticos, é outro grande desafio para a FES. Contudo, métodos indiretos têm sido utilizados, como a estimativa de glucosamina, ergosterol, proteína (kjeldahl), DNA, peso seco e CO₂, mas todos têm suas próprias deficiências. Embora os processos para a recuperação e

purificação dos produtos sejam mais caros empregando suportes naturais, a economia geral obtida por esse processo, determina a viabilidade em propostas específicas. Este sistema é especialmente sustentável para a produção de produtos de alto valor agregado como enzimas. Existem aplicações onde a concentração dos preparados enzimáticos é mais importante que sua pureza, por exemplo, a bioconversão de biomassa por celulasas (SINGHANIA et al., 2009).

Existem diversos estudos relatando as vantagens da FES sobre a FSm em relação à produção enzimática (HÖLKER; LENZ, 2005). No geral, a produção de enzimas é maior em FES do que em FSm quando comparadas as mesmas linhagens e o mesmo tipo de produto (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; JECU, 2000). A comparação direta entre a FES e FSm é difícil devido às diferenças dos processos (SINGHANIA et al., 2010). Muitos fatores, incluindo considerações econômicas, qualidade do produto e regulações governamentais para eliminação de resíduos, podem ajudar na determinação de qual processo fermentativo usar, entretanto, os processos não são intercambiáveis (FAZENDA et al., 2008).

A FSm consiste na utilização de um meio fermentativo líquido no qual os nutrientes encontram-se dissolvidos ou suspensos. Esta técnica tornou-se o método fermentativo preferido para as aplicações comerciais, sendo utilizada pela maioria das indústrias de bioprodutos. A FSm é intrinsecamente menos problemática, nela a transferência de massa, calor e oxigênio são facilitadas e a homogeneidade geralmente é superior. Portanto, este processo é mais confiável e reproduzível, facilmente monitorado e o controle dos parâmetros chaves são mais flexíveis (FAZENDA et al., 2008). Entretanto, o custo de operação e o grande volume de resíduos líquidos gerados encarecem o processo (WANG; YANG, 2007).

A maioria dos relatos de produção microbiana de celulasas utiliza a tecnologia de fermentação submersa. Entretanto, na natureza, o crescimento e utilização de celulose por microrganismos aeróbios, produtores de celulasas, provavelmente assemelha-se mais a fermentação em estado sólido do que a fermentação líquida (SINGHANIA et al., 2010).

3.4. Microrganismos e enzimas termofílicas

Microrganismos que crescem em altas temperaturas podem ser classificados como termofílicos (temperatura ótima de crescimento em torno de 45°C) e hipertermofílicos (temperatura ótima de crescimento em torno de 80°C) (MADIGAN et al., 2003). Poucas espécies de eucariotos conseguem crescer entre 45° e 55°C (MAHESHWARI et al., 2000). Essa termolabilidade deve-se a adaptações da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica (GOMES et al., 2007).

Microrganismos termofílicos são de grande interesse científico, pois apresentam um grande potencial para aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas termoestáveis, amplamente aplicadas em diversos processos industriais. Vários fungos são potenciais fontes de enzimas celulolíticas termoestáveis.

Enzimas, no geral, são moléculas protéicas com precisas estruturas primária, secundária e terciária, baseadas em sua sequência de aminoácidos. Elas podem possuir estrutura quaternária se forem formadas por mais de uma subunidade. O calor pode desnaturar a enzima, isto é, fazer com que elas percam suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias (se presente), que são essenciais para sua atividade (SAQIB et al., 2010).

As enzimas termoestáveis (enzimas que mantêm sua integridade estrutural acima de 55°C) possuem muitas vantagens em relação às suas homólogas mesofílicas (YEOMAN et al., 2010). Elas geralmente apresentam maior atividade específica e maior estabilidade, permitindo um maior tempo de hidrólise e uma menor quantidade de enzimas necessárias para a sacarificação. Além disso, essas enzimas reduzem os custos ao reduzir ou eliminar o processo de resfriamento e, reduzem os riscos de contaminação por outros microrganismos (YEOMAN et al., 2010). Finalmente, essas enzimas podem ser armazenadas em temperatura ambiente sem perda de atividade. Essas vantagens são significativas, pois cerca de metade das despesas projetadas para o processo de conversão de biomassa estão associados com a produção de enzimas. Portanto, esses benefícios atribuídos às enzimas termoestáveis resultam na economia global do processo (YEOMAN et al., 2010).

3.5. Pré-tratamento e hidrólise do material lignocelulósico

O material lignocelulósico não contém monossacarídeos prontamente disponíveis para a bioconversão. Pelo contrário, este material possui polissacarídeos

como a celulose e hemicelulose, que necessitam de tratamentos ácidos ou enzimáticos para serem hidrolisados a açúcares fermentescíveis (CARDONA et al., 2010). A hidrólise enzimática é um modo promissor para a obtenção de açúcares do material lignocelulósico, mas a baixa acessibilidade das enzimas à celulose nativa é um problema no processo de obtenção do etanol celulósico. A celulose presente na biomassa vegetal está intimamente associada à hemicelulose e lignina. A lignina esta em parte covalentemente ligada a hemicelulose, portanto, ela previne o acesso dos agentes hidrolíticos à celulose. Além disso, a própria estrutura cristalina da celulose já representa um obstáculo extra ao processo de hidrólise. Dessa forma o pré-tratamento é necessário para a remoção da lignina e hemicelulose, além da redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material. Isto permite o acesso das enzimas às fibras, tornando a hidrólise mais eficiente.

Um pré-tratamento eficaz deve evitar a degradação ou perda de carboidratos, formação de co-produtos inibidores das etapas subsequentes (hidrólise e fermentação), além de ter um baixo custo de realização (SUN; CHENG, 2002)

Diversos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica têm sido investigados: explosão a vapor (RUIZ, 2008), ozonólise (GARCÍA-CUBERO, 2010), extração utilizando solventes (SUN:CHEN, 2008), pré-tratamentos térmicos utilizando ácidos ou bases (MOSIER et al., 2005) e pré-tratamentos biológicos (CAMASSOLA; DILLON, 2009).

Dentre os métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a ozonólise mostra-se interessante pela degradação efetiva da lignina. O pré-tratamento é geralmente efetuado à temperatura ambiente e não leva a formação de compostos inibitórios (VIDAL; MOLINIER, 1988). O ozônio é altamente reativo para compostos com duplas ligações conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons. Portanto, o mais provável a ser oxidado na ozonização de materiais lignocelulósicos é a lignina, devido ao seu alto conteúdo de $C = C$. O ozônio oxida a lignina liberando compostos solúveis de baixo peso molecular, principalmente ácidos orgânicos como o ácido fórmico e acético, que pode resultar em uma queda no pH de 6,5 para 2,0 (GARCÍA-CUBERO, 2009). A hemicelulose é pouco afetada neste processo, pois o ozônio degrada e/ou solubiliza a lignina e ligeiramente solubiliza a fração hemicelulósica.

A hemicelulose resultante na biomassa lignocelulósica após a ozonólise pode ser degradada por outro método de pré-tratamento, como por exemplo, o tratamento ácido.

Uma das principais vantagens do pré-tratamento ácido é a alta conversão de xilana em xilose. O meio ácido, proporciona ataque aos polissacarídeos, principalmente a hemicelulose que é mais facilmente hidrolisada do que a celulose. Portanto, a celulose e a lignina permanecem quase que inalteradas e ainda podem ser processadas (CARDONA et al., 2010). A hemicelulose, principalmente xilanas ou mananas compreendem um terço do total de carboidratos da maioria dos materiais lignocelulósicos, portanto a possibilidade de recuperação de alta proporção desses açúcares pode ser altamente positiva para a economia geral do processo de produção de etanol através da biomassa lignocelulósica (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Por outro lado, dependendo das condições operacionais, a fase líquida do hidrolisado pode ser constituída não apenas de açúcar (xilose, glicose e arabinose), mas também de produtos da decomposição da hemicelulose (tais como oligômeros de polímeros e ácido acético gerado da hidrólise dos grupos acetil ligados aos açúcares) além de produtos da decomposição dos monossacarídeos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) (GÁMEZ et al., 2006), que inibem o crescimento dos microrganismos na etapa de fermentação. Desta forma, dentre os ácidos utilizados no pré-tratamento do material lignocelulósico, o ácido fosfórico (H_3PO_4) mostra-se muito interessante, pois sua utilização pode gerar baixas concentrações de produtos inibidores (GÁMEZ et al., 2006).

Para que o material lignocelulósico seja utilizado no processo de produção do bioetanol, a celulose resultante do processo de pré-tratamento deve ser degradada à glicose pelo uso de ácidos ou enzimas. Entretanto, a hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação ao uso dos ácidos.

A hidrólise enzimática é catalisada pelas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Este processo é realizado sob condições mais brandas de temperatura e pH, além disso, devido a especificidade das enzimas, a taxa de conversão da celulose em açúcares solúveis é alta, podendo chegar a quase 100%. A hidrólise ácida além de não possuir taxas tão elevadas de conversão, necessita de condições mais severas de pH e temperatura, o que resulta na corrosão dos equipamentos utilizados. Outro problema deste processo é a geração de diversos compostos que inibem o crescimento dos microrganismos utilizados na fermentação, etapa subsequente no processo de produção

do etanol. Por outro lado, a hidrólise enzimática apresenta algumas limitações em relação à hidrólise ácida, como o maior tempo de realização e o alto custo das enzimas.

Fatores como a concentração e composição do substrato, atividade celulolítica, pré-tratamento, e condições de reação (temperatura e pH) também podem afetar a liberação de açúcares solúveis durante a hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

A biomassa lignocelulósica desempenha papel chave no processo de hidrólise. A cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, superfície de contato e a presença de hemicelulose e lignina, dificultam o acesso e a suscetibilidade deste material à ação das enzimas. Além disso, durante a hidrólise as celulasas tendem a se ligar de forma irreversível com a lignina, através de interações hidrofóbicas, o que leva à perda da atividade enzimática (BINOD et al.; 2011).

A alta concentração de substrato também pode afetar o processo de hidrólise. A conversão enzimática é reduzida linearmente com o aumento da concentração de sólidos, mesmo com o uso de uma proporção constante entre enzimas e substrato (BINOD et al.; 2011). Isto pode ser explicado pela transferência de massa limitada ou adsorção não-produtiva das enzimas. Entretanto, o mecanismo específico responsável pela redução da eficiência da hidrólise ainda não foi elucidado (BINOD et al.; 2011). A alta concentração de substrato também afeta a hidrólise principalmente no que diz respeito à inibição do sistema celulolítico pelos produtos finais da reação. As beta-glicosidases da grande maioria dos microrganismos celulolíticos são em certa medida inibidas pela glicose (DECKER et al., 1990). Isto resulta em um acúmulo de celobiose, o qual é um potente inibidor das celobiohidrolases, reduzindo a eficiência da hidrólise. Além disso, a alta viscosidade do material causada pela grande quantidade de substrato dificulta a homogeneização e aumenta o consumo de energia.

Outros compostos também podem inibir a ação das enzimas. Entre estes estão os produtos formados pela degradação durante o pré-tratamento. Embora esta etapa seja necessária para facilitar o acesso das enzimas às fibras de celulose, a degradação dos açúcares e da lignina resulta na liberação de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), furfural e hidroximetilfurfural (produtos da degradação dos açúcares), vanilina, seringaldeído e 4-hidroxibenzaldeído (produtos da degradação da lignina), que têm ação inibitória sobre os processos de hidrólise e fermentação (BINOD et al.; 2011).

Desta forma, a hidrólise enzimática do material lignocelulósico é caracterizada por uma fase inicial rápida, na qual ocorre a degradação da fração celulósica mais

facilmente disponível, e uma fase subsequente mais lenta, que pode durar até que todo o substrato seja consumido (BINOD et al.; 2011).

Apesar dessas limitações, algumas medidas como a lavagem do material pré-tratado, o uso de surfactantes, a suplementação dos preparados enzimáticos com beta-glicosidases ou o uso de enzimas com maior tolerância à glicose, além da seleção de novos microrganismos produtores de celulasas e a utilização de engenharia genética estão sendo adotadas para superar tais problemas e aumentar o rendimento da hidrólise enzimática.

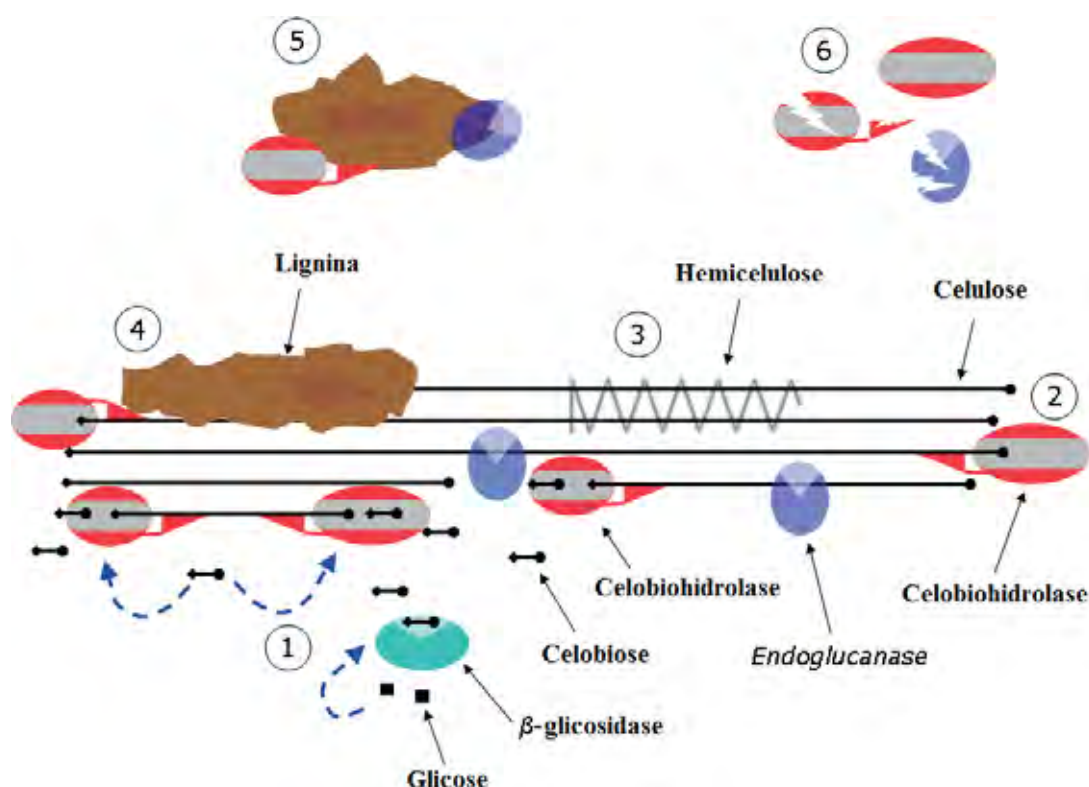


Figura 5: Fatores que limitam a eficiência da hidrólise da celulose. 1: Inibição das beta-glicosidases e celobiohidrolases pela glicose e celulose, respectivamente. 2: Ligação improdutiva da celobiohidrolase na cadeia de celulose. 3 e 4: Hemicelulose e lignina associadas à celulose. 5: Adsorção das enzimas (celulasas e hemicelulasas) na partícula de lignina. 6: Desnaturação ou perda de atividade enzimática (JORGENSEN et al., 2007)

Embora muitos artigos tenham sido publicados e várias metodologias propostas para a produção de etanol a partir de material lignocelulósico, o processo ainda requer muita pesquisa para se chegar a uma prática viável. Assim, esse projeto foi executado

como parte de um projeto temático, visando a produção de celulasas e hemicelulasas através de resíduos agro-industriais, buscando entender a influência de alguns fatores no rendimento dessas fermentações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Foram utilizados os fungos filamentosos termofílicos *Chaetomium* sp N13 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 pertencentes a cultura estoque do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE/UNESP. Estes são mantidos em meio Sabouraud, em temperatura ambiente, sob óleo mineral e em tubos criogênicos a -80°C, em meio contendo glicerol 20%. O fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Fernando Araripe Torres do Centro de Biotecnologia Molecular da UnB, sendo mantido em meio agar-aveia, sob óleo mineral e em tubos criogênicos a -80°C, em meio contendo glicerol 20%.

4.2. Meios de cultivo

4.2.1. Meio nutriente sólido

O meio nutriente utilizado para os pré-inóculos foi composto por (g/L): palha de milho e papelão (5,0 cada) lavados, secos e triturados; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4); KH_2PO_4 (2,0); CaCl_2 (0,3); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); peptona (2,0); extrato de levedura (2,0); glicose (2,0); uréia (0,3); Tween 80 (1,0); ágar (25,0) e solução de sais (10,0 mL) e. A solução de sais foi constituída por (mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4); $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6). O meio foi homogeneizado com mixer.

4.2.2. Meios de cultivo para fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)

Os fungos foram cultivados, por fermentação em estado sólido e fermentação submersa, nas seguintes misturas de substratos (p/p): bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1, 9:1 e 1:9), palha de milho e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1), cevada e farelo de trigo (9:1), além de farelo de trigo apenas. Todos os substratos foram lavados e secos em estufa a 60°C durante 48 horas. O bagaço de cana foi separado em peneira granulométrica nas frações entre 1 a 3mm para a FES e <1mm para a fermentação submersa.

4.2.3. Meio nutriente para fermentações submersas

Para as fermentações submersas foi utilizado o meio nutriente composto por (g/L): KH_2PO_4 (2,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4), uréia (0,3), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3), CaCl_2 (0,1), peptona (1,0), tween 80 (2,0), glicose (0,04), solução de sais (1,0) (item 4.2.1), suplementado com fonte de carbono (10,0) correspondente às misturas citadas no item 4.2.2, carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma, USA) ou celulose microcristalina (Merck, Alemanha). O pH do meio foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH ou HCl.

4.3. Pré-inóculos

Para cada fermentação foi feito um pré-inóculo, em frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio nutriente sólido (item 4.2.1) inclinado. O microrganismo foi inoculado na superfície deste meio, por estrias, e incubado a 45°C, até completo crescimento micelial. Após este período, o micélio foi suspenso em 150 mL de solução nutriente composta por (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5), KH_2PO_4 (3,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), CaCl_2 (0,5) e Tween (0,1%) e esta suspensão foi utilizada como inóculo em volume de 4 mL/g de substrato sólido para a FES e volume de 1mL para a FSm.

4.4. Processos fermentativos

4.4.1. Fermentação em estado sólido (FES)

As FES foram conduzidas em embalagens de polipropileno (15x10 cm), utilizando-se 5g de cada mistura de substratos descrita no item 4.2.2. As embalagens foram esterilizadas a 121°C por 20 minutos. O cultivo ocorreu a 45°C, durante 14 dias. A cada 48 horas, uma embalagem contendo material fermentado foi retirada para a extração das enzimas a qual foram adicionados 100 mL de água destilada. Esta mistura foi homogeneizada manualmente, e mantida sob agitação em shaker (100 rpm) por 30 minutos. Após este período, o material foi filtrado em tecido nylon, centrifugado a 10000 xg por 15 minutos a 5°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. O material fermentado foi seco e estocado para ensaios de reuso.

4.4.2. Fermentação submersa (FSm)

As fermentações submersas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL do meio nutriente descrito no item 4.2.3 e uma alíquota de 1,0 mL da solução do pré-inóculo descrito no item 4.3. O cultivo ocorreu a 45°C, durante 5 dias, com agitação de 100 rpm.. A primeira amostra foi retirada em 48h e as seguintes a cada 24 horas. Para obtenção da solução enzimática bruta o meio fermentado foi filtrado a vácuo, em filtro de papel. O filtro contendo o material fermentado foi seco a 100°C até peso constante e a biomassa seca foi utilizada como indicadora do perfil de crescimento. O filtrado foi centrifugado a 10000 xg por 15 minutos a 5°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Como controle para cada fermentação submersa foram preparados frascos erlenmeyers contendo o meio de cultivo sem inóculo. Do mesmo modo, a cada 24 horas um frasco controle foi retirado e o material foi filtrado e seco como descrito acima.

4.5. Reuso do substrato lignocelulósico

O material lignocelulósico resultante da FES, pós-extração das enzimas, foi autoclavado por 20 minutos a 121°C, lavado com água corrente, água destilada (último enxágüe) e seco em estufa a 60°C. Foi usado nesses ensaios o material resultante das fermentações de 96h a 288h. Cinco gramas do material seco foram transferidos para embalagens de polipropileno (15x10 cm), esterilizados a 121°C por 20 minutos e inoculados com suspensão de esporos ou micélio como descrito no item 4.3. O cultivo ocorreu a 45°C por 12 dias. A extração das enzimas foi realizada em 96h, 192h e 288h de cultivo conforme item 4.4.1. O material fermentado foi descartado após obtenção da solução enzimática bruta.

4.6. Determinação das atividades enzimáticas

4.6.1. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação constituída por 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de suspensão de xilana 1% (Xylan Birchwood –

Sigma) 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). Os teores de açúcares redutores foram calculados a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.6.2. Endoglucanase (CMCase)

A atividade de endoglucanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 4.6.1), porém, utilizando-se suspensão a 4% de carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) como substratos. Para o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 a mistura reacional foi formada por 0,2 mL de extrato enzimático e 0,8 mL de CMC. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação.

4.6.3. Avicelase

A atividade de avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 4.6.1), utilizando-se suspensão a 0,5% de Avicel (Merck) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação.

4.6.4. Beta-glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidase, 50 μL da solução enzimática foram adicionados à mistura de 250 μL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 250 μL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma). A reação foi mantida a 60°C, por 10 minutos, quando então foi interrompida com 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 (2M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto de reação.

4.7. Determinação quantitativa de açúcares redutores da solução enzimática bruta obtida por FSm e do hidrolizado

A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita pelo método de Somogyi-Nelson (1944), utilizando glicose como padrão.

4.8. Determinação da massa celular seca resultante da fermentação submersa– Estimativa de crescimento

A estimativa do crescimento foi realizada pela quantificação do peso seco da biomassa fúngica durante o cultivo em meio líquido, após secagem até peso constante a 100°C.

4.9. Caracterização das enzimas

4.9.1 Efeito das variações no pH de reação e da temperatura de incubação sobre as atividades enzimáticas

A determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática de xilanase e CMCase foi realizada incubando-se 0,1 mL das soluções enzimáticas brutas em 0,9 mL de suspensão de xilana 1% ou CMC 4% em diferentes valores de pH, a 60°C por 10 minutos. Os seguintes tampões (0,1M) foram utilizados: acetato de sódio (pH 3,0-5,5), MES (pH 5,5-6,5), HEPES (pH 7,0-8,0) e glicina-NaOH (pH 8,5). O efeito do pH sobre a atividade enzimática de beta-glicosidase foi determinado da mesma forma, entretanto, foram incubados 0,05 mL da solução enzimática bruta em 0,25 mL do substrato p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizado nas mesmas condições descritas para a determinação da atividade, variando-se a temperatura entre 40 e 80°C. Os ensaios de atividade foram realizados no pH ótimo para cada enzima.

4.10. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar

O bagaço foi lavado três vezes com água destilada quente, triturado para padronização do tamanho (1-3 mm) e seco em estufa a 60°C por 72 horas. Em seguida,

20 g de bagaço foram empacotados em coluna e submetidos ao fluxo de ozônio (2294,4 mg/min.) por 20 minutos, (tempo necessário para que o ozônio reagisse com todo o bagaço presente dentro da coluna). O gás ozônio foi obtido usando o gerador Radast 10C, Ozoxi-Ozônio. Depois de mantido em fluxo de ozônio o bagaço foi desempacotado e homogeneizado. Alíquotas de 2 g deste material foram tratadas com 40 mL de solução de ácido fosfórico 0,1 Mol L⁻¹, em balão de 250 mL por 2 horas. Em seguida, o bagaço foi filtrado, e seco em estufa a 60°C por 24 horas.

4.11. Hidrólise enzimática do material lignocelulósico

A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada a uma consistência de 1,4% (p/v). As reações foram conduzidas em frascos de 20 mL contendo 2mL de tampão acetato (0,1M pH 5,5), 0,1 g de bagaço de cana *in natura*, bagaço de cana pré-tratado ou palha de cana *in natura*, 1% de azida sódica e volumes de 0 (controle) e 5,0 mL de solução enzimática bruta de *Chaetomium sp.*N13, *Humicola grisea var. thermoidea*, da mistura das soluções de *Chaetomium sp.* N13 e *Humicola grisea var. thermoidea* na proporção 1:1 (v/v), além da solução correspondente à enzima comercial (POWERCELL) cedida pela Prozin BioSolutions®. A tabela 1 mostra a carga enzimática utilizada na hidrólise de 1g de substrato seco. A mistura foi incubada a 55°C em shaker a 150rpm por períodos de 0, 6, 10 e 24h. As amostras, após os respectivos períodos de hidrólise, foram filtradas a vácuo. O filtrado foi usado para a dosagem de açúcares redutores e o material retido no filtro foi lavado com água destilada e incubado a 60°C para realização de peso seco.

A solução enzimática correspondente a enzima comercial (POWERCELL), foi preparada pela diluição de 0,012g da enzima em 5mL de água destilada, o que corresponde a dosagem recomendada pelo fabricante (0,12g de enzima por grama de biomassa pré-tratada).

Tabela 1: Carga enzimática (U/g substrato seco hidrolisado) de POWERCELL e dos preparados enzimáticos de *Chaetomium sp* N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana *in natura*, pré-tratado e palha de cana *in natura*.

Solução enzimática	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	Avicelase (U/g)	Beta-Glicosidase (U/g)
<i>Chaetomium sp</i> N13	1985	655	20	10
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	770	430	25	295
Mistura <i>Chaetomium sp.</i> N13 e <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	1377,5	542,5	22,5	152,5
Enzima Comercial	1710	7275	210	695

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção das celulasas e hemicelulasas por fermentação em estado sólido (FES)

Celulasas e hemicelulasas foram produzidas por *Chaetomium sp.* N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por processos de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm). Foram utilizadas misturas de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1, 9:1 e 1:9), palha de milho e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1), cevada e farelo de trigo (9:1) ou, somente farelo de trigo como substratos.

O fungo *Chaetomium sp.* N13 apresentou as maiores produções de xilanase (1569,4 U/g ou 78,5 U/mL e 1483,7 U/g ou 74,2 U/mL) em 240h e 192h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e, em cevada e farelo de trigo (9:1), respectivamente (Fig. 6b). O meio de cultivo com cevada e farelo de trigo (9:1), mostrou-se mais adequado para a produção da enzima, uma vez que a atividade de xilanase permaneceu elevada ao longo do experimento (336 h) (Fig. 6b). A menor atividade da enzima foi apresentada pelo cultivo em farelo de trigo (Fig. 6a).

Misturas de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e cevada e farelo de trigo (9:1) também foram os melhores meios para a produção de CMCase, cujas maiores produções (192,0 U/g ou 9,6 U/mL e 145,2 U/g ou 7,3 U/mL) ocorreram em 192h e 288h de cultivo, respectivamente (Fig. 6d). Quando bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) foram utilizados como fonte de carbono, ocorreu baixa atividade dessa enzima, indicando que esse meio foi o menos adequado para a produção de CMCase (Fig. 6d).

A produção máxima de avicelase (12,7 U/g ou 0,6 U/mL) foi obtida em 144h de cultivo em palha de milho e farelo de trigo (9:1) (Fig. 6e). Os cultivos em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 e 9:1) apresentaram as menores atividades de avicelase (Fig. 6f e 6e).

A produção máxima de beta-glicosidase (13,9 U/g ou 0,7 U/mL) foi observada em 240h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9). Os níveis de atividade dessa enzima, neste meio, permaneceram elevados durante todo o experimento (Fig 6h). Os meios com as menores produções de beta-glicosidase foram bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1), palha de milho e farelo de trigo (9:1), cujos perfis de produção mostraram-se muito semelhantes (Fig. 6g).

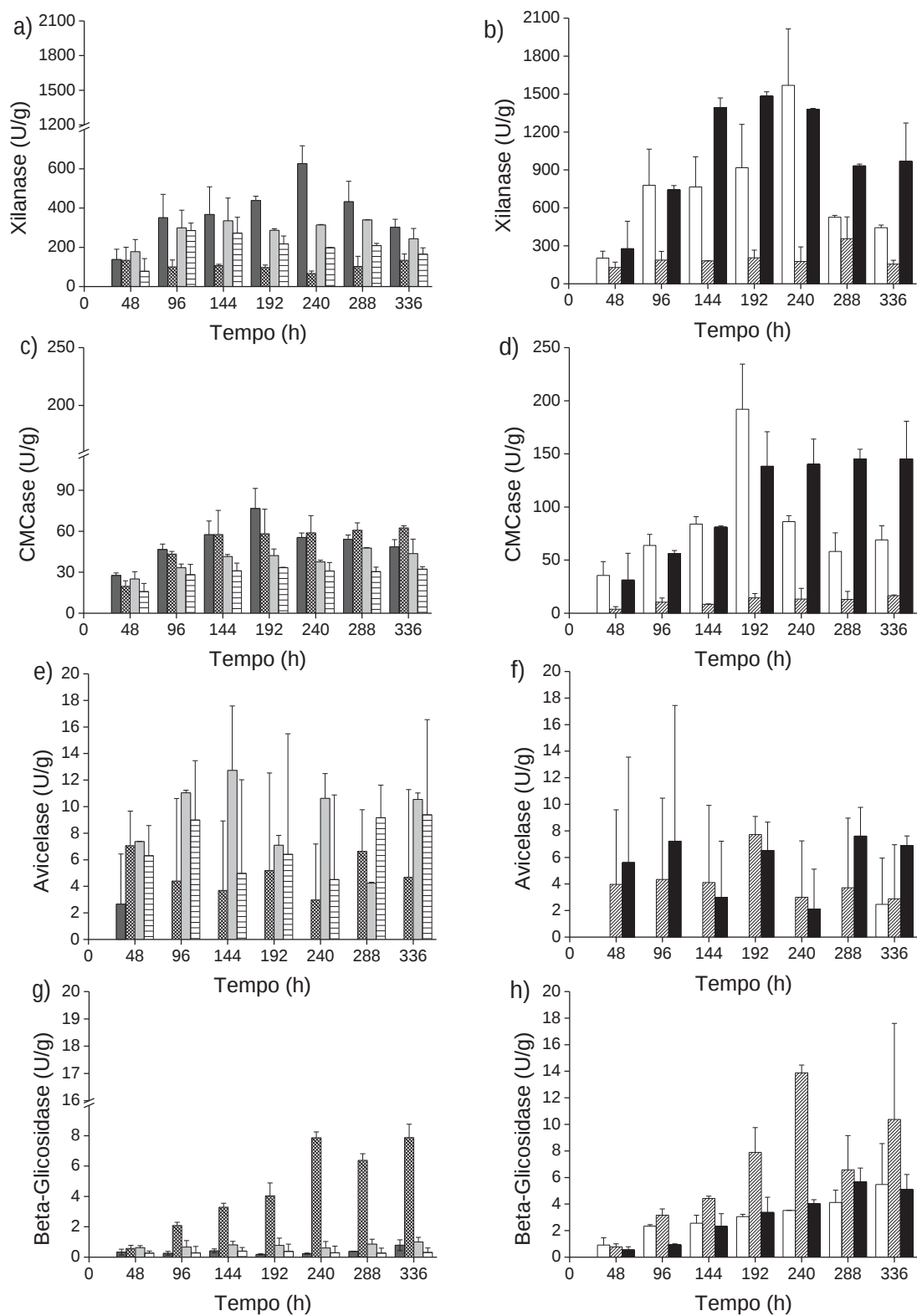
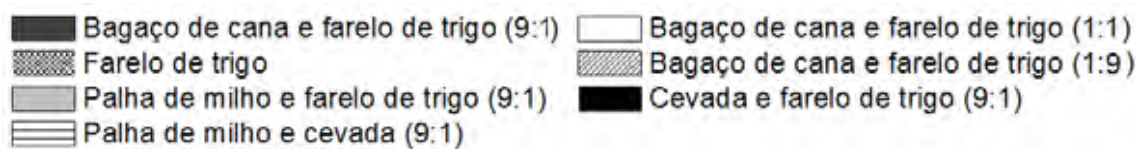


Figura 6: Produção de xilanase e celulasas por *Chaetomium sp.* N13 em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.



No processo de fermentação em estado sólido, o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* proporcionou as maiores produções de xilanase, CMCase e beta-glicosidase, em meios de cultivo contendo grande quantidade de farelo de trigo. As demais misturas, bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), cevada e farelo de trigo (9:1), palha de milho e farelo de trigo (9:1) e palha de milho e cevada (9:1), apresentaram índices de produção muito baixos, não sendo favoráveis para a produção destas enzimas (Fig. 7).

A maior produção de xilanase (330,3 U/g ou 16,5 U/mL) ocorreu em 240h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) (Fig. 7b). Este meio, também foi o mais adequado para a produção de CMCase, cuja maior produção (232,8 U/g ou 11,6 U/mL) foi observada em 240h de cultivo (Fig. 7d).

A produção de avicelase, ao contrário das demais enzimas, foi maior em cevada e farelo de trigo (9:1) com produções de 18,1 U/g ou 0,9 U/mL, em 192h de cultivo. Os níveis de atividade dessa enzima, neste meio, permaneceram elevados durante todo o experimento (Fig. 7f).

As maiores produções de beta-glicosidase (124,9 U/g ou 6,2 U/mL e 123,1 U/g ou 6,2 U/mL) foram observadas em 288h e 336h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) e farelo de trigo respectivamente (Fig 7h e 7g). Entretanto, o meio de cultivo com bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) também se mostrou adequado para a produção da enzima, uma vez que a atividade de beta-glicosidase manteve-se elevada ao longo do experimento (336h) (Fig. 7h). Quando palha de milho e cevada (9:1) e palha de milho e farelo (9:1) foram utilizadas como fonte de carbono, ocorreu baixa atividade dessa enzima, indicando que esses meios são os menos adequados para a produção de beta-glicosidase (Fig. 7g).

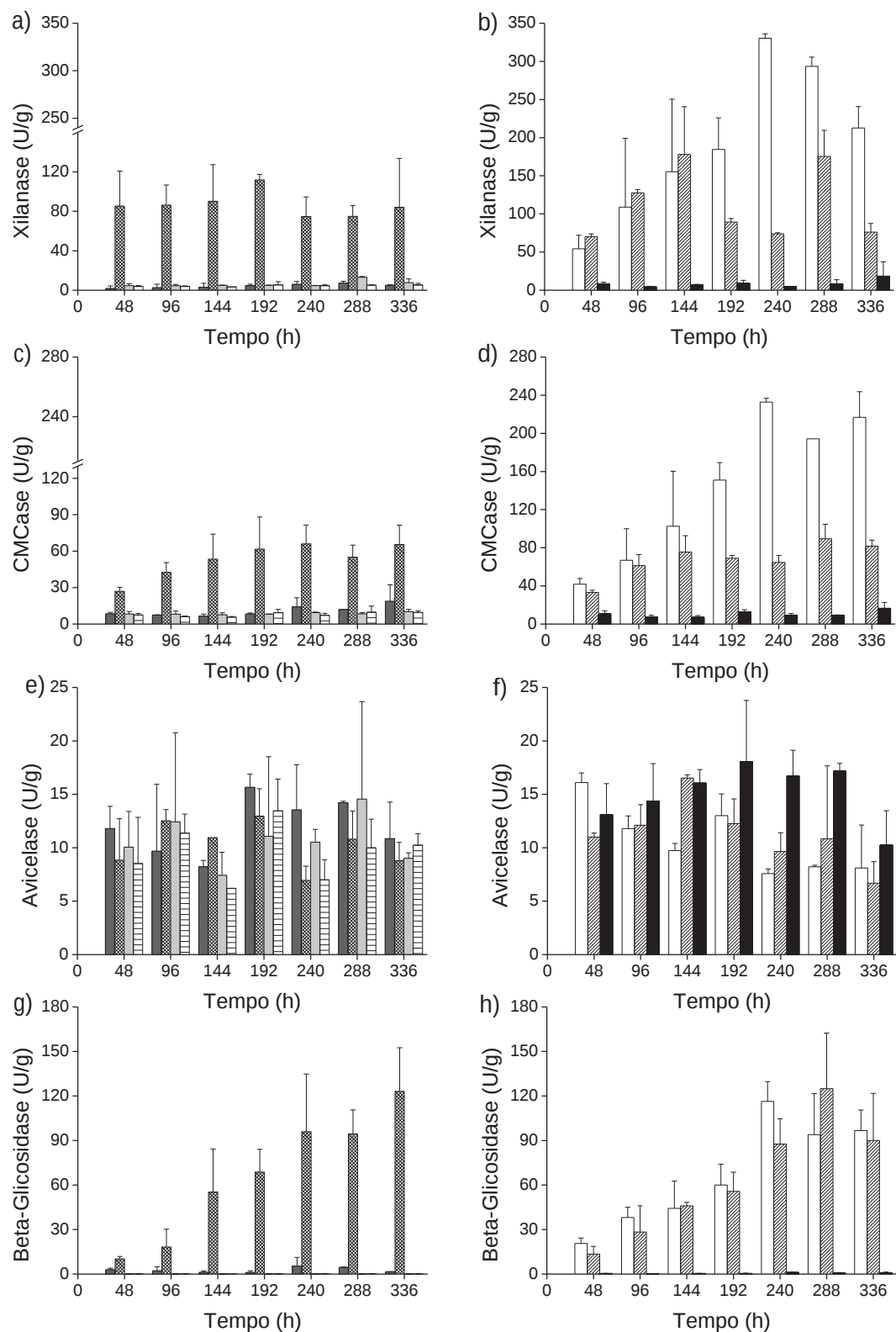
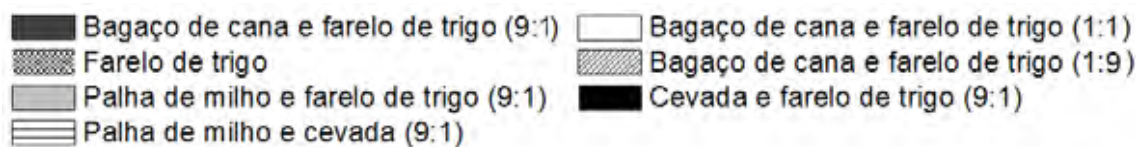


Figura 7: Produção de xilanase e celulasas por *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.



O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 não foi um bom produtor de celulases. As maiores produções de xilanase (13,5 U/g ou 0,7 U/mL e 10,2 U/g ou 0,4 U/mL) foram observadas em 192h e 144h de cultivo em farelo de trigo e em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9), respectivamente (Fig 8a e 8b).

Misturas de bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) e somente farelo de trigo, também foram os melhores meios para a produção de CMCase, cujas maiores produções (17,9U/g ou 1,0 U/mL e 17,5 U/g ou 0,9 U/mL) ocorreram em 192h de cultivo, respectivamente (Fig. 8d e 8c).

As maiores produções de avicelase (12,9 U/g ou 0,6U/mL e 11,7 U/g ou 0,6 U/mL) foram observadas em 144h e 240h de cultivo em cevada e farelo de trigo (9:1) e em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) (Fig. 8f).

As maiores produções de beta-glicosidase (46,7 U/g ou 2,3 U/mL e 42,8 U/g ou 2,1 U/mL) foram observadas em 336h de cultivo em farelo de trigo e em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9), respectivamente. Estes meios mostraram-se mais favoráveis para a produção da enzima. (Fig. 8g e 8h).

As misturas bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1) e palha de milho e farelo de trigo (9:1), apresentaram as menores produções de xilanase, CMcase, avicelase e beta-glicosidase, sendo menos adequadas para produção destas enzimas (Fig. 8a, 8c, 8e e 8g).

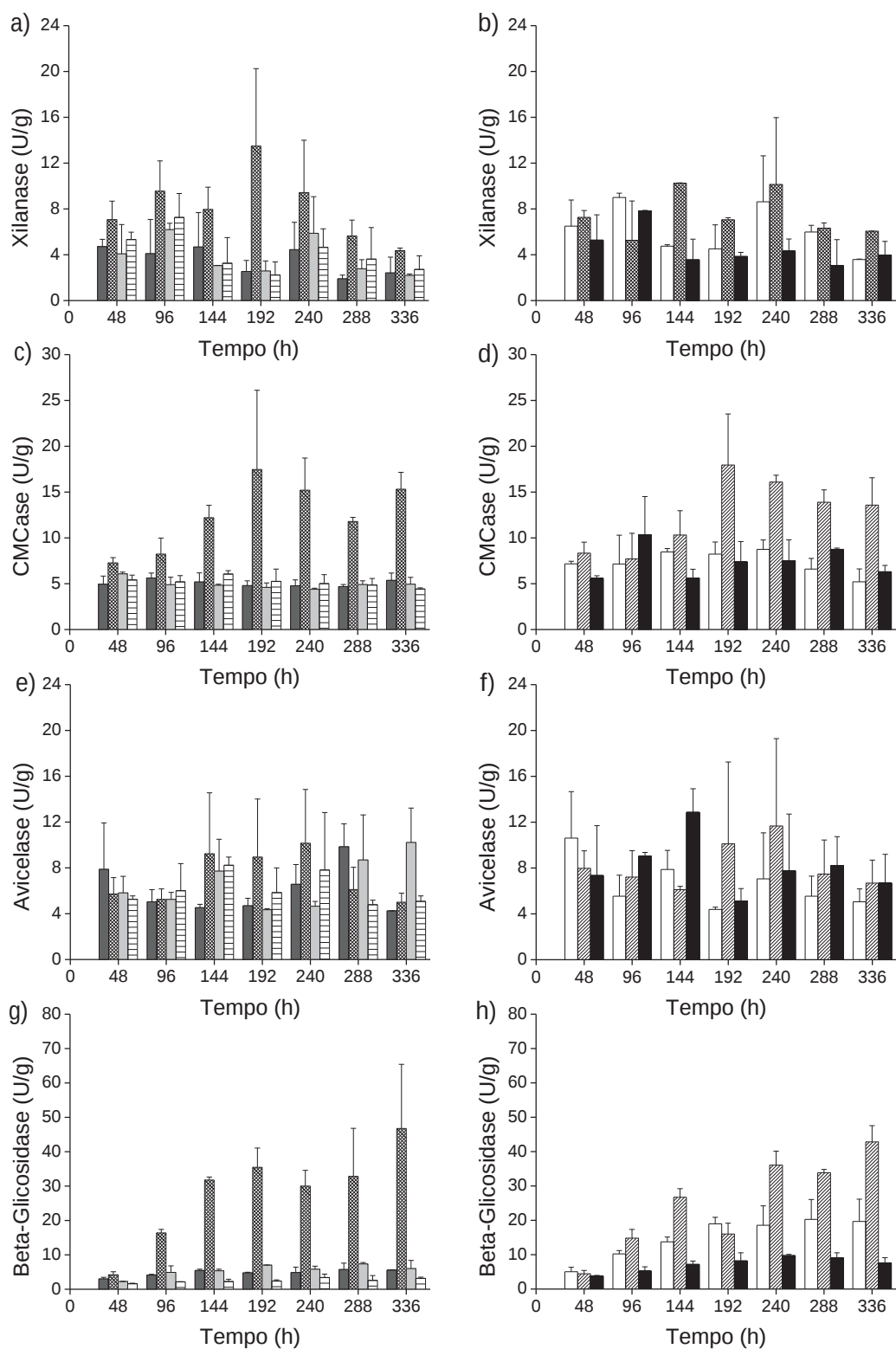
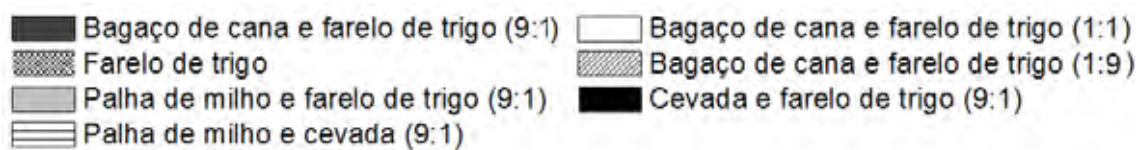


Figura 8: Produção de xilanase e celulasas por *Thermomucor indiciae-seudaticae*. N31 em diferentes substratos em fermentação em estado sólido.



A tabela 2 sintetiza os resultados observados na fermentação em estado sólido, elucidando os picos de produções enzimáticas obtidos por cada fungo avaliado. Dentre os fungos estudados, *Chaetomium* sp. N13 destaca-se como o melhor produtor de xilanase (1569,4 U/g) em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi o melhor produtor de CMCase (232,8 U/g) e avicelase (18,1 U/g), merecendo destaque pela alta produção de beta-glicosidase (124,9 U/g) em 288h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9). O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 não foi um bom produtor de celulases e hemicelulases quando comparado com *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Tabela 2).

Os fungos do gênero *Chaetomium* são amplamente conhecidos pela produção de enzimas lignocelulolíticas termoestáveis, incluindo celulases (KATAPODIS et al., 2007; SHOBER; TRÖSCH, 2000; SONI et al., 1999). Fungos do gênero *Humicola* tem tido suas celulases e xilanase amplamente estudadas, principalmente a beta-glicosidase (DA SILVA et al., 1994; DE-PAULA et al., 1999; CALADO et al., 2007). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura sobre a produção de xilanase e celulases por *Thermomucor indicae-seudaticae*.

Uma análise comparativa das atividades enzimáticas obtidas no presente trabalho (Tabela 2) com aquelas de literatura (Tabela 3) indicam que os fungos estudados apresentaram quantidades bastante interessantes de enzimas do complexo celulolítico, estimulando a continuidade do projeto no sentido de alterar as condições nutritivas e físico-químicas de cultivo para aumentar a produção das celulases.

Tabela 2: Comparação das produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase dos fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação em estado sólido.

Fungo	Xilanase (U.g ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	1569,4	240	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	330,3	240	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	13,5	192	Farelo de trigo
Fungo	CMCase (U.g ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	192,0	192	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	232,8	240	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	17,9	192	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)
Fungo	Avicelase (U.g ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	12,7	144	Palha de milho e farelo de trigo (9:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	18,1	192	Cevada e farelo de trigo (9:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	12,9	144	Cevada e farelo de trigo (9;1)
Fungo	β-glicosidase (U.g ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	13,9	240	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	124,9	288	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	46,7	336	Farelo de trigo

Tabela3: Dados de literatura sobre as produções de xilanase, CMCase, β -glicosidase e exoglucanase de diferentes fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação em estado sólido.

Fungo	Substrato	Xilanase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> KK2	Palha de arroz	5070	Kang et al. (2004)
<i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	Palha e farelo de trigo	297,8	Dogaris et al. (2009)
<i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	Farelo de cervejaria	1073	Xiros et al. (2008)
Fungo	Substrato	CMCase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> KK2	Palha de arroz	129	Kang et al. (2004)
<i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	Farelo de cervejaria	56,0	Xiros et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC7956	Farelo de trigo	135,4	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus terreus</i> M11	Cana de açúcar	267	Gao et al. (2008)
Fungo	Substrato	B-glicosidase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> KK2	Palha de arroz	100	Kang et al. (2004)
<i>Fomes sclerodermeus</i>	Farelo de soja	31	Papinutti & Forchiassin (2007)
<i>Trichoderma reesei</i> RUTC30	Farelo de trigo	4,5	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC7956	Farelo de trigo	21,4	Sukumaran et al. (2009)
Fungo	Substrato	Avicelase (U g ⁻¹)	Referências
<i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	Farelo de cervejaria	4,2	Xiros et al. (2008)
<i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	Palha e farelo de trigo	1,1	Dogaris et al. (2009)
<i>F.oxysporum</i> F3 ¹	Talo de milho	4,1	Panagiotou et al. (2003)

1 uso de biorreator

5.2. Influência do pH e granulometria do substrato utilizado como fonte de carbono para a produção de xilanase e celulasas por *Chaetomium* sp. N13 em FSm – ensaios preliminares

Foram realizados ensaios preliminares de pH, tamanho das partículas do substrato e composição do meio de cultivo em fermentação submersa com o fungo *Chaetomium* sp. N13.

Primeiramente avaliou-se a produção das enzimas em meio de cultivo líquido, tendo como fonte de carbono bagaço de cana em granulometrias diferentes (3 a 5mm) e (< 1mm) e farelo de trigo na proporção (1:1), suplementados ou não com 0,2% de glicose ou carboximetilcelulose. O tempo total do cultivo foi de 96h, sendo as amostras retiradas a cada 24h.

Desta forma, cinco meios de cultivo foram avaliados:

- 1) Bagaço de cana (3 a 5 mm) e farelo de trigo (1:1)
- 2) Bagaço de cana (< 1mm) e farelo de trigo (1:1)
- 3) Bagaço de cana (3 a 5 mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de glicose
- 4) Bagaço de cana (< 1mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de glicose
- 5) Bagaço de cana (3 a 5 mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de carboximetilcelulose

As maiores produções de xilanase (13,0 U/mL) e avicelase (0,4 U/mL) foram obtidas em 72h e 96h de cultivo no meio 4 (Bagaço de cana (< 1mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de glicose) (Fig. 9a e 9c). Enquanto que as maiores produções de CMCase (3,4 U/mL) e beta-glicosidase (0,1 U/mL) foram obtidas em 96h de cultivo no meio 2 (Bagaço de cana (< 1mm) e farelo de trigo (1:1)) (Fig. 9b e 9d).

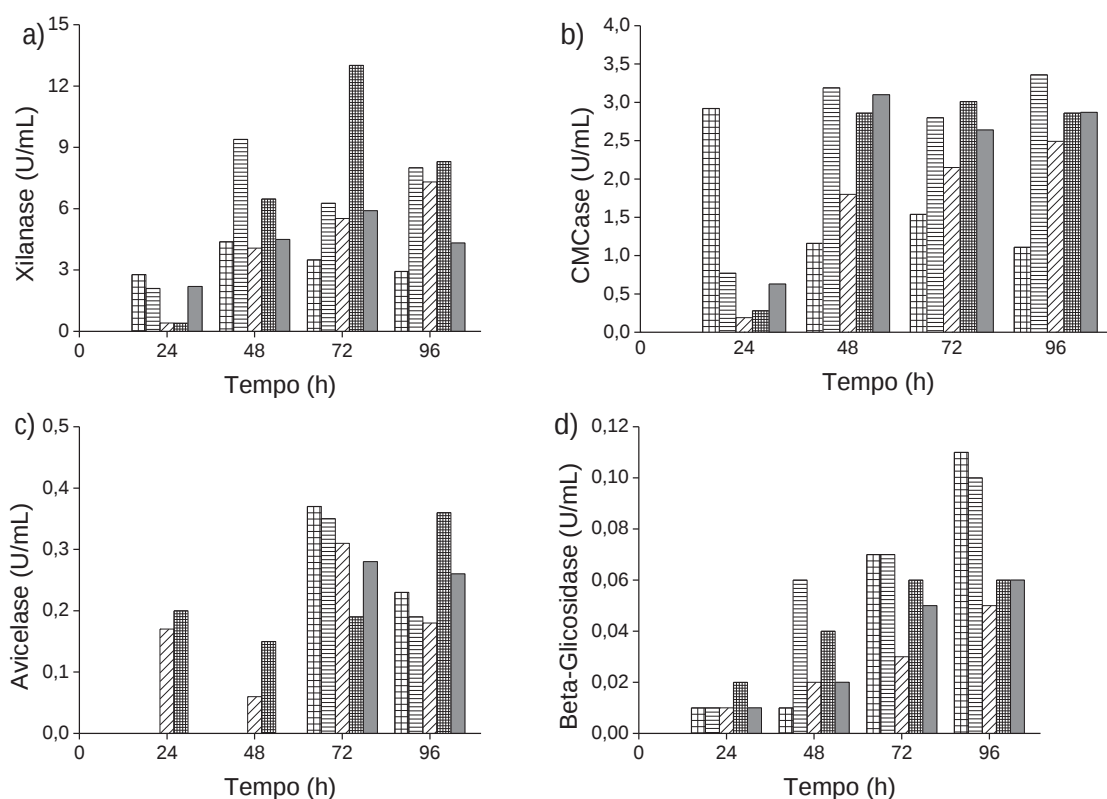


Figura 9: Perfil de produção de xilanase e celulasas por *Chaetomium sp.* N13 em diferentes substratos

-  Bagaço de cana (3 a 5mm) e farelo de trigo (1:1)
-  Bagaço de cana (< 1mm) e farelo de trigo (1:1)
-  Bagaço de cana (3 a 5mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de glicose
-  Bagaço de cana (<1mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de glicose
-  Bagaço de cana (3 a 5mm) e farelo de trigo (1:1), com 0,2% de carboximetilcelulose

Os resultados indicam que a menor granulometria e adição de glicose no meio de cultivo foram favoráveis a produção de xilanase e celulasas, sendo o meio 4 escolhido como meio de cultivo para as demais fermentações submersas.

Rocky-Salimi & Hamidi-Esfahani (2010), avaliaram o efeito das condições de cultivo na produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma reesei* QM9414 em farelo de arroz e, concluíram que o tamanho da partícula teve efeito significativo na produção de FPase, CMCase e avicelase, uma vez que, a redução no tamanho da partícula para (1-1,5 mm) aumentou a atividade das celulasas. Membrillo et al., (2011) em estudo sobre o efeito do tamanho da partícula na composição do substrato e perfil enzimático de *Pleurotus ostreatus*, também observaram que a produção máxima de CMCase e FPase

foram obtidas com o uso das menores partículas avaliadas, o que ainda correspondeu com a degradação máxima de celulose.

A redução do tamanho das partículas torna o substrato mais disponível para a ação fúngica, pois, aumenta a superfície de contato e densidade do material.

Após escolha do meio de cultivo para as demais fermentações submersas, três faixas de pH (5,0, 5,5 e 6,0) foram avaliadas em relação a produção de xilanase e celulasas.

A Figura 10 mostra que apesar do pico de produção de CMCase ter ocorrido em pH 5,0, o nível de produção das enzimas em conjunto foi favorecido pelo pH 6,0. Portanto, este valor foi escolhido para a fermentação submersa do *Chaetomium sp.* N13.

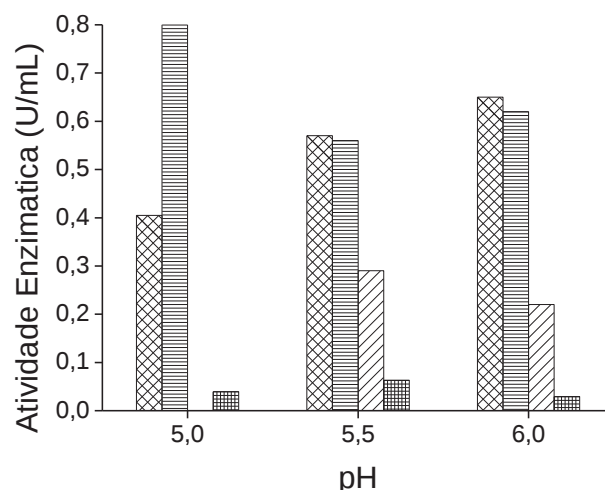


Figura 10: Produção de xilanase e celulasas em diferentes faixas de pH

 Xilanase
  CMCase
  Avicelase
  Beta-Glicosidase

O pH pode afetar os processos de fermentação, uma vez que, ele pode alterar as substâncias químicas do meio de cultivo, ionizar moléculas polares, afetar reações enzimáticas e afetar o processamento pós-traducional de enzimas.

Não foram realizados testes de pH para as demais linhagens fúngicas, uma vez que, otimização das condições de fermentação não é o objetivo do trabalho. O pH 5,0 foi adotado para o cultivo submerso dos fungos *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

5.3. Avaliação da produção de celulase e xilanase em fermentação submersa (FSm)

No processo de fermentação submersa o fungo *Chaetomium sp.* N13 apresentou as maiores produções de xilanase (35,4 U/mL e 34,9 U/mL) em 96h e 120h de cultivo, quando foram utilizadas palha de milho e cevada (9:1) e, palha de milho e farelo de trigo (9:1), respectivamente como fontes de carbono. As menores produções ocorreram quando apenas farelo de trigo foi utilizado (Fig. 11a).

A produção máxima de CMCase (5,3 U/mL) ocorreu em 96h de cultivo em bagaço e farelo de trigo (9:1). Esta mistura foi a mais favorável para a produção da enzima, seguida da mistura na proporção (1:1) (Fig. 11c e 11d). O cultivo em farelo de trigo, proporcionou as menores produções da CMCase (Fig. 11c).

A produção máxima de avicelase (0,7 U/mL) foi observada em 48h de cultivo em palha de milho e cevada. O cultivo em farelo de trigo apresentou as menores produções da enzima (Fig. 11e).

As maiores produções de beta-glicosidase (0,1 U/mL) foram observadas em 120h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e (9:1). Estes foram os melhores meios para a produção da enzima (Fig. 11h e 11g). As menores produções foram observadas em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) (Fig. 11g).

A Figura 12 mostra o perfil de crescimento fúngico em fermentação submersa, o qual foi estimado pela quantificação da massa celular seca e consumo de açúcares do meio. Uma vez que os substratos utilizados para sustentação do crescimento microbiano eram materiais lignocelulósicos insolúveis, impedindo a separação da biomassa micelial, esta última foi apenas estimada, ou seja, a biomassa seca incluiu o micélio fúngico e o material lignocelulósico. Para se ter uma estimativa mais precisa da conversão de material lignocelulósico em biomassa microbiana, foi realizado um controle abiótico (sem inóculo) o qual foi incubado nas mesmas condições.

No cultivo com o fungo *Chaetomium sp.* N13 nota-se pelo controle abiótico que, em meios em que o farelo de trigo foi a base da sustentação do crescimento (Fig. 12c e 12d) houve hidrólise desse material, evidenciado pela redução do peso seco. Entretanto, estes foram os meios com as menores produções de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase, e também os que proporcionaram as menores conversões em biomassa micelial.

O aumento da biomassa total (biomassa fúngica + substrato) indicou que a fase de crescimento logarítmico ocorreu entre 48 e 72h, sendo que em 48h os menores

teores de açúcares redutores foram observados em todos os meios. Dentre os materiais lignocelulósicos, a maior produção de xilanase e avicelase observada na mistura palha de milho e cevada (9:1), foi corroborada pelo maior crescimento fúngico (1,85 mg/mL) (Fig. 12g). Já o meio de cultivo com bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), em que a maior produção de CMCase foi observada, apresentou pequeno aumento de biomassa (Fig. 12b).

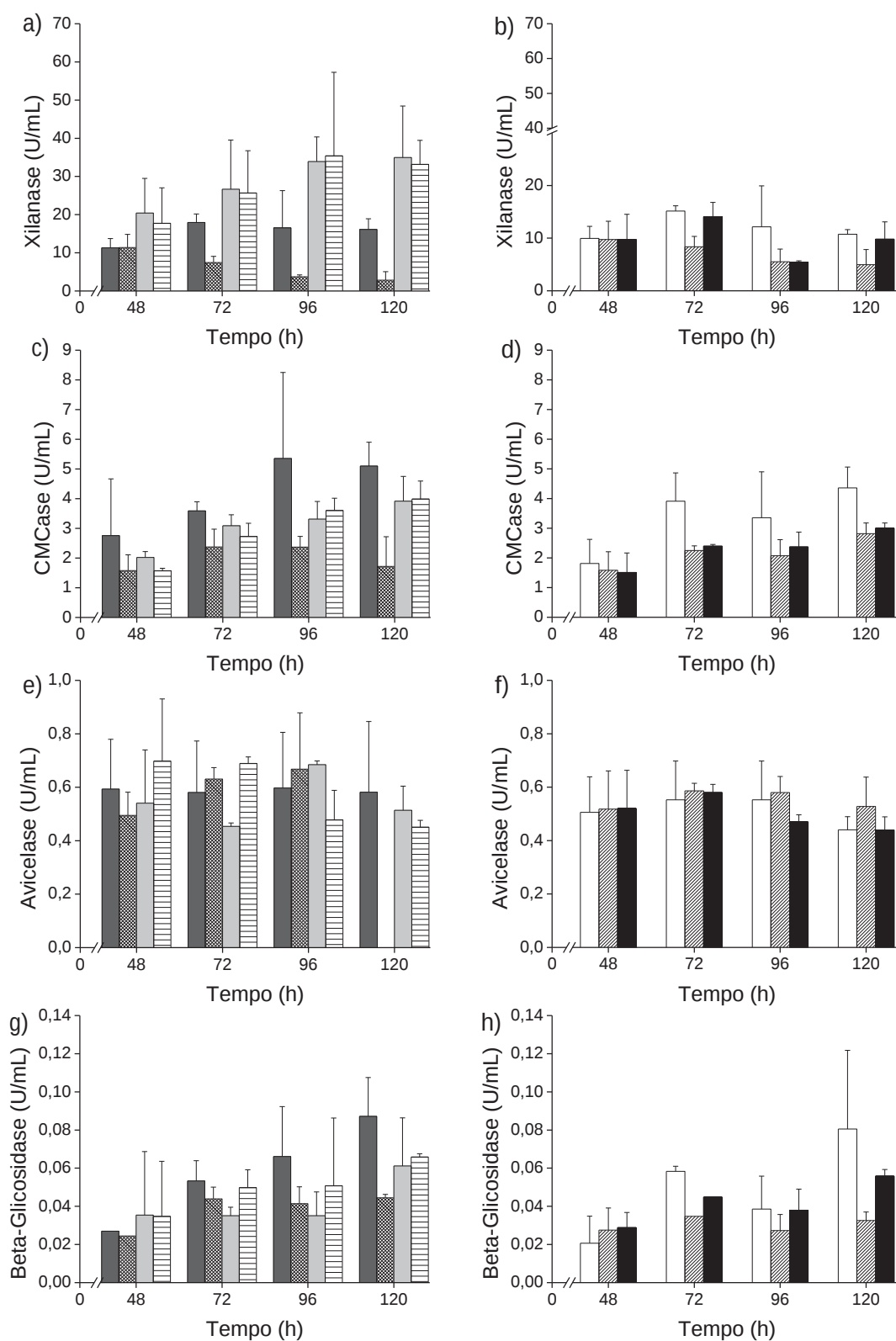


Figura 11: Produção de xilanase e celulasas por *Chaetomium* sp. N13 em diferentes substratos em fermentação submersa, pH 6,0 a 45°C



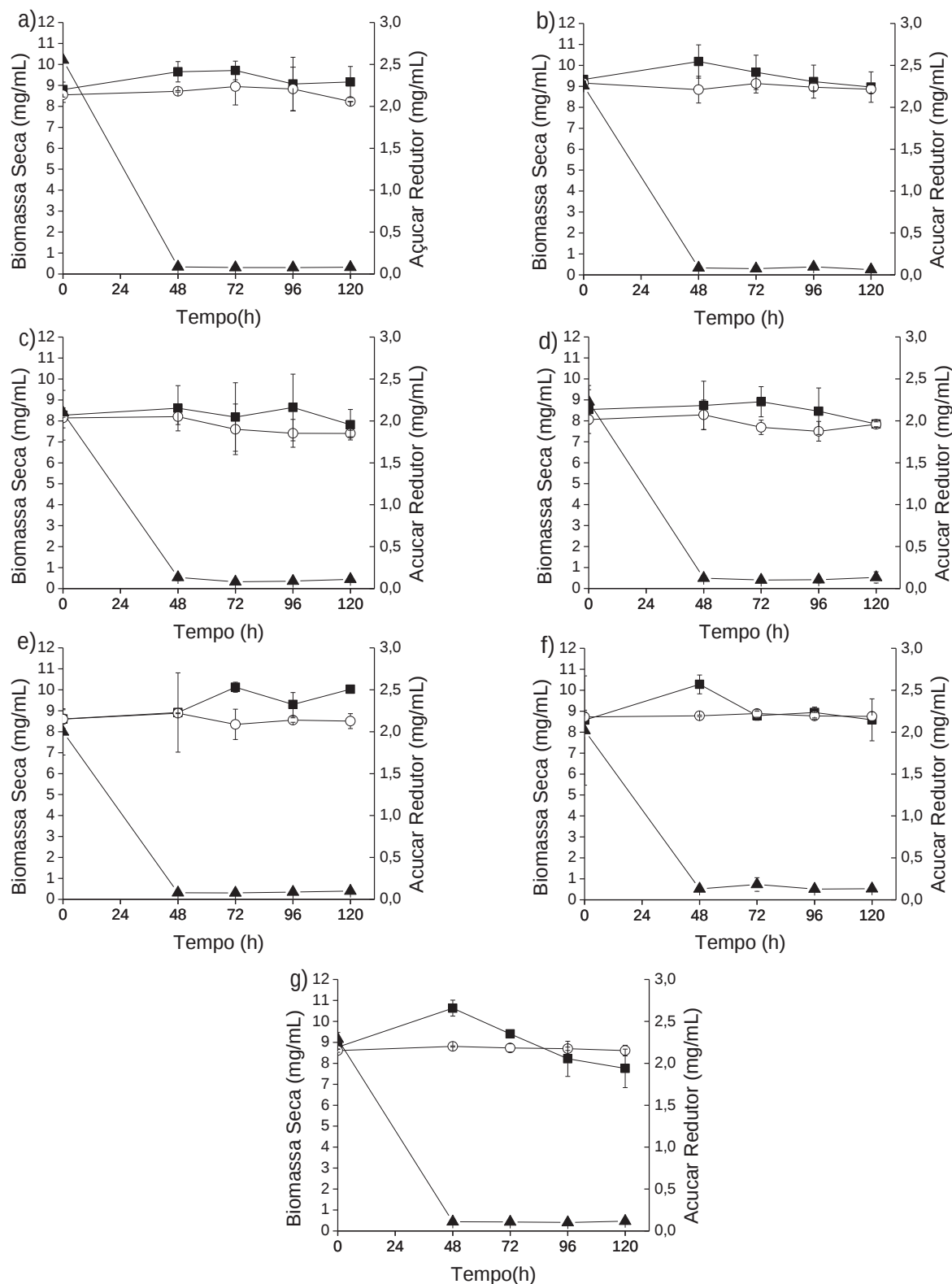


Figura 12: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por *Chaetomium sp.* N13, utilizando diferentes fontes de carbono, a) bagaço de cana e farelo de trigo (1:1); b) bagaço de cana e farelo de trigo (9:1); c) bagaço de cana e farelo de trigo (1:9); d) farelo de trigo; e) cevada e farelo de trigo (9:1); f) palha de milho e farelo de trigo (9:1); g) palha de milho e cevada (9:1). (■) Biomassa seca; (▲) Açúcar redutor; (○) Biomassa - controle abiótico

No processo de fermentação submersa, utilizando o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, foram obtidas as maiores produções de xilanase (16,9 U/mL), CMCase (6,4 U/mL) e beta-glicosidase (1,4 U/mL) em 120h de cultivo em meio com bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). Este meio de cultivo, mostrou-se interessante para a produção das enzimas, uma vez que as atividades de xilanase, CMCase e beta-glicosidase permaneceram elevadas ao longo do experimento (336 h) (Fig. 13b, 13d e 13h), sem as oscilações de atividade normalmente observadas ao longo dos percursos fermentativos. As menores atividades enzimáticas foram apresentadas pelo cultivo em palha de milho e cevada (9:1) (Fig. 13a, 13c e 13g).

Bagaço e farelo de trigo (1:1), também foi o meio de cultivo mais favorável para a produção de avicelase, cuja produção máxima (0,4 U/mL) foi observada em 72h de cultivo (Fig 13f).

A redução do peso seco observada nas Figuras 14a a 14g indica que houve hidrólise do material lignocelulósico utilizado como base de sustentação do crescimento. Quando a mistura palha de milho e cevada (9:1), a menos favorável para a produção de xilanase, CMcase e beta-glicosidase foi utilizada, não houve mudanças no perfil de crescimento fúngico (Fig. 14g).

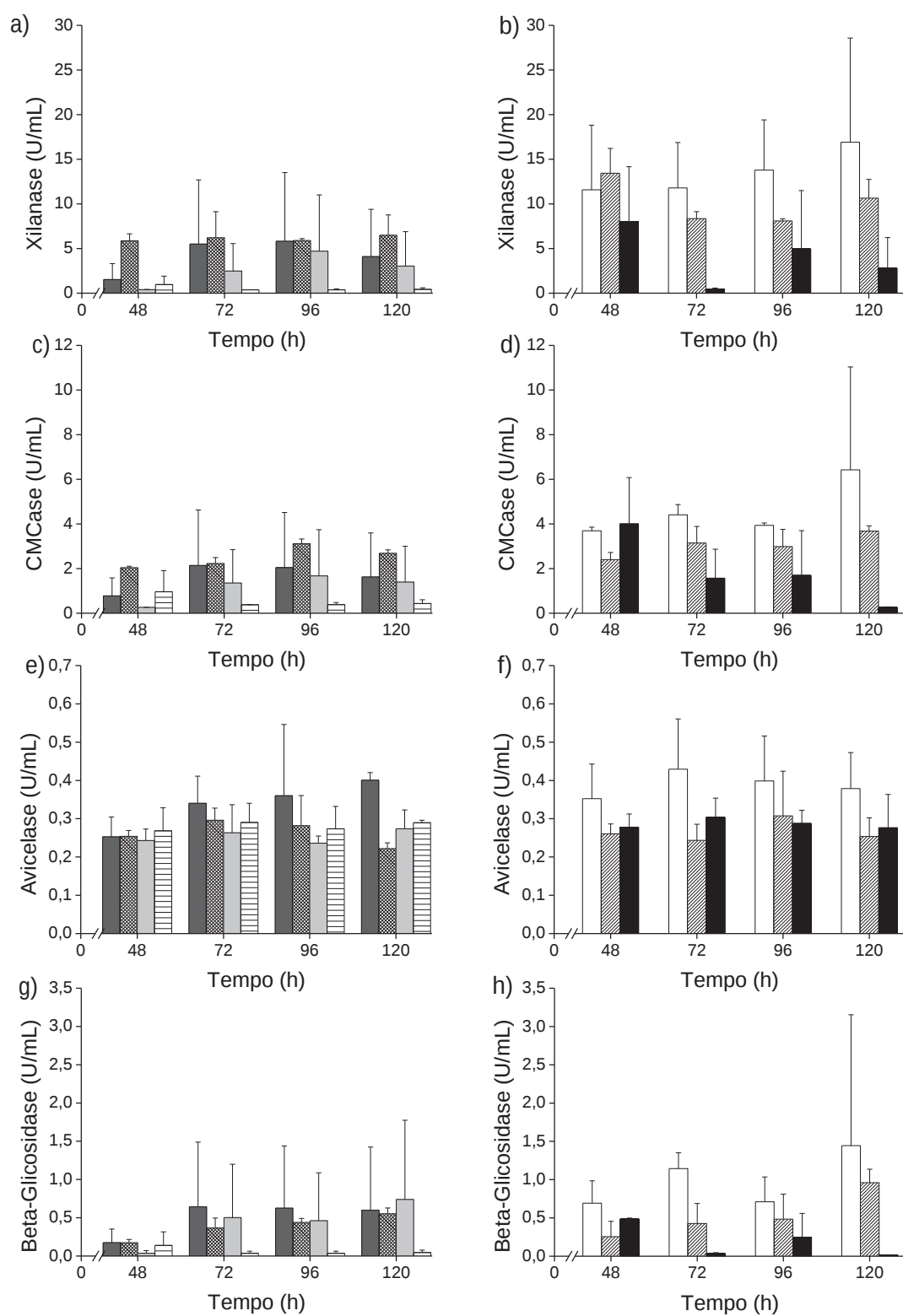


Figura 13: Produção de xilanase e celulasas por *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos em fermentação submersa.



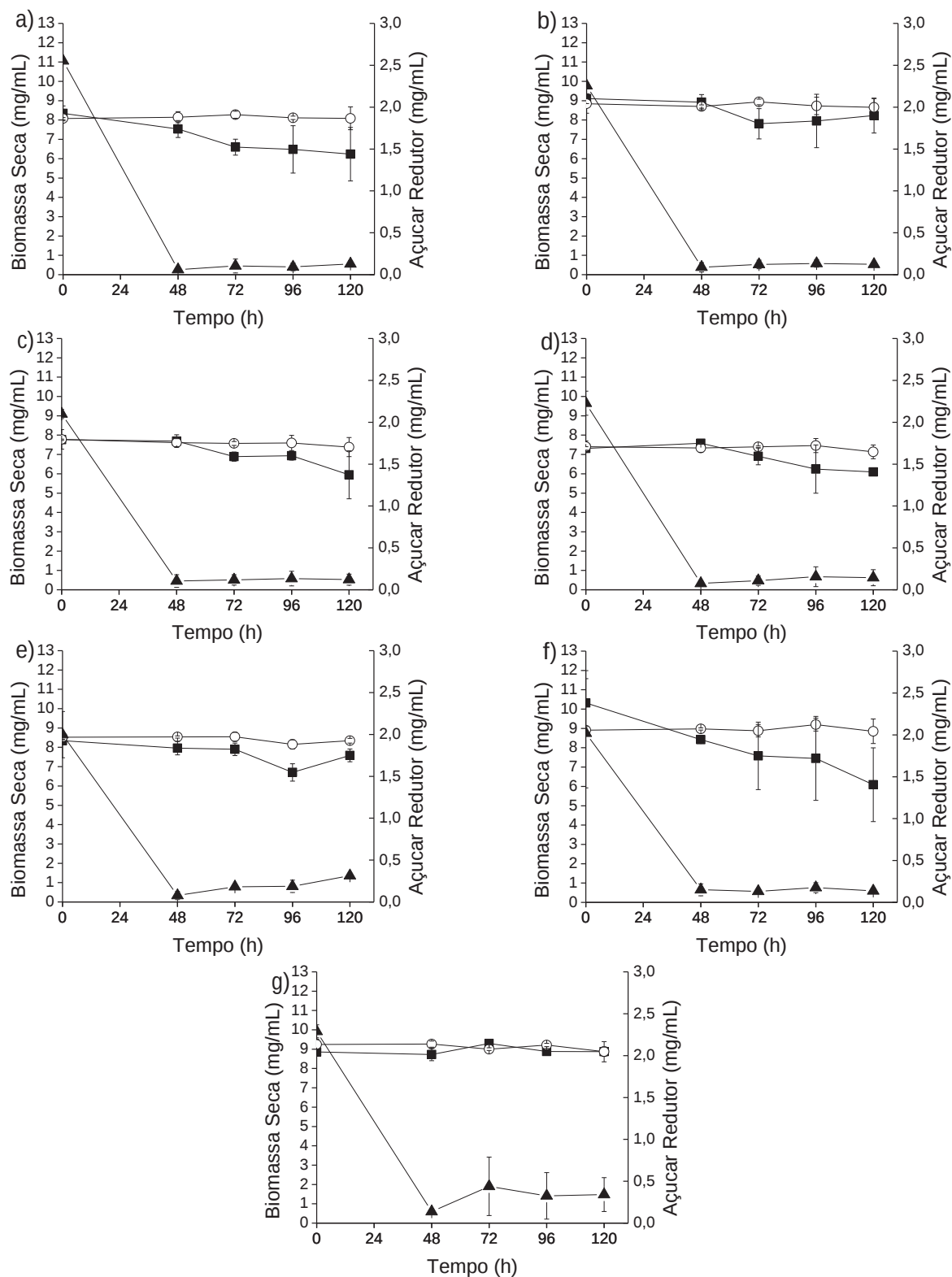


Figura 14: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por *Humicola grisea* var. *thermoidea*, utilizando diferentes fontes de carbono, a) bagaço de cana e farelo de trigo (1:1); b) bagaço de cana e farelo de trigo (9:1); c) bagaço de cana e farelo de trigo (1:9); d) farelo de trigo; e) cevada e farelo de trigo (9:1); f) palha de milho e farelo de trigo (9:1); g) palha de milho e cevada (9:1). (■) Biomassa seca, (▲) Açúcar redutor, (○) Biomassa – controle abiótico

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, também apresentou baixos índices de produção enzimática no processo de fermentação submersa.

As maiores produções de xilanase (0,5 U/mL e 0,5 U/mL) foram observadas em 72h e 48h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) e (9:1) (Fig. 15a e 15b), embora os níveis de produção não tenham tido diferenças significativas entre os substratos utilizados como fonte de carbono. A menor atividade enzimática (0,3 U/mL) foi observada em cevada e farelo de trigo (9:1) (Fig.15a)

A produção máxima de CMCase (0,3 U/mL) foi observada em 72h de cultivo em farelo de trigo (Fig 15c). Entretanto, assim como na produção de xilanase, os níveis de produção foram muito semelhantes entre todas as misturas utilizadas (Fig. 15c e 15d). As menores produções foram observadas em palha de milho e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1) e bagaço de cana e farelo de trigo (9:1) (Fig.15c).

A produção máxima de avicelase (0,7 U/mL) foi obtida em 48h de cultivo em cevada e farelo de trigo (9:1) (Fig. 15f), enquanto que as menores atividades ocorreram em palha de milho e cevada (9:1) (Fig. 15e). A produção máxima de beta-glicosidase (0,7 U/mL) foi observada em 120h de cultivo em farelo de trigo (Fig. 15g). As menores produções ocorreram em bagaço de cana e farelo de trigo (9:1), palha de milho e cevada (9:1) e palha de milho e farelo de trigo (9:1) (Fig. 15g).

Não foram realizados testes com fontes de carbono purificadas para o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. O maior crescimento fúngico (2,0 mg/mL) foi observado em palha de milho e farelo de trigo (9:1) (Fig. 16f), entretanto este meio foi um dos menos favoráveis para a produção de CMCase e beta-glicosidase.

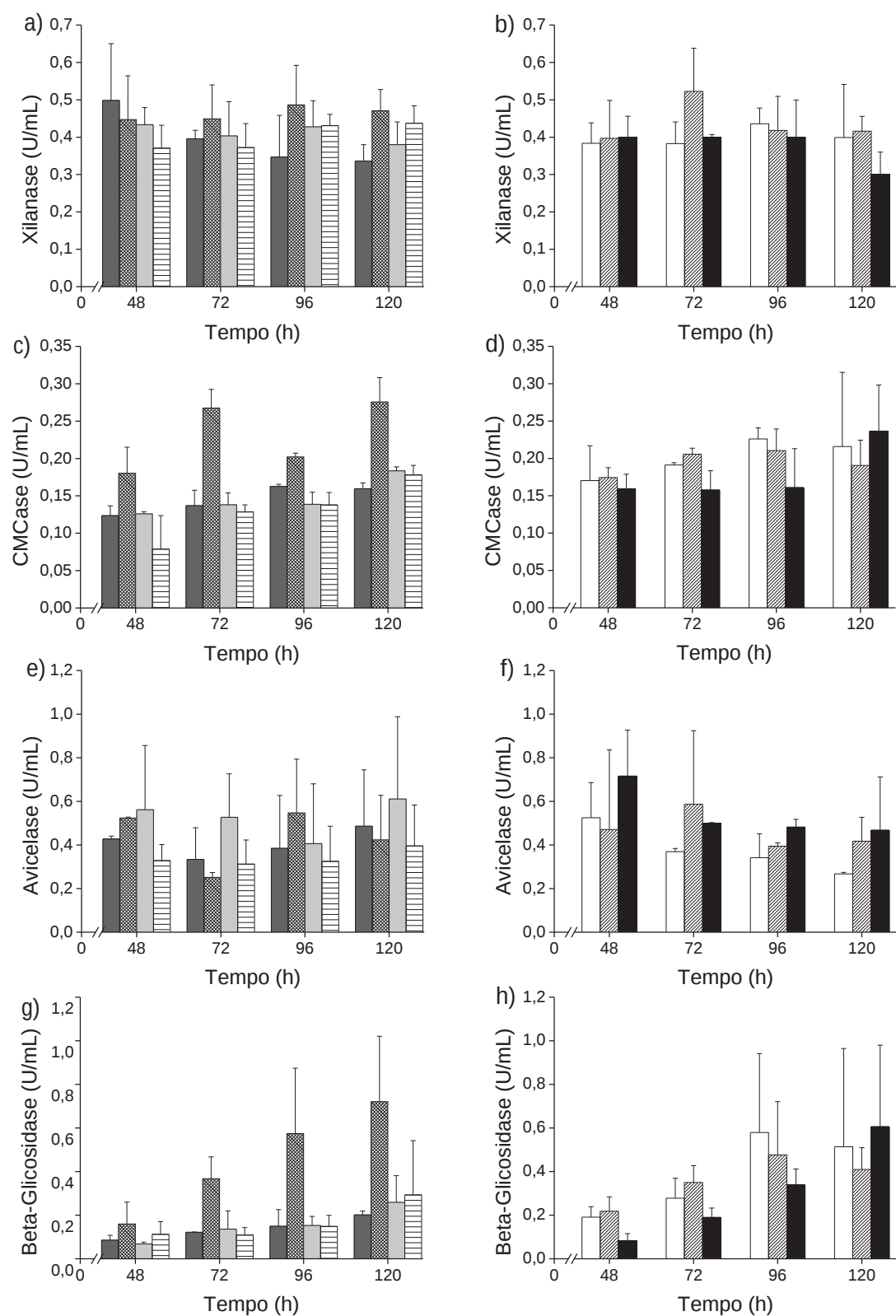
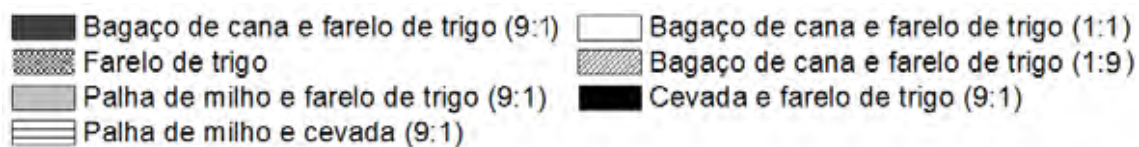


Figura 15: Produção de xilanase e celulasas por *Thermomucor indicae-seudaticae*. N31 em diferentes substratos em fermentação submersa.



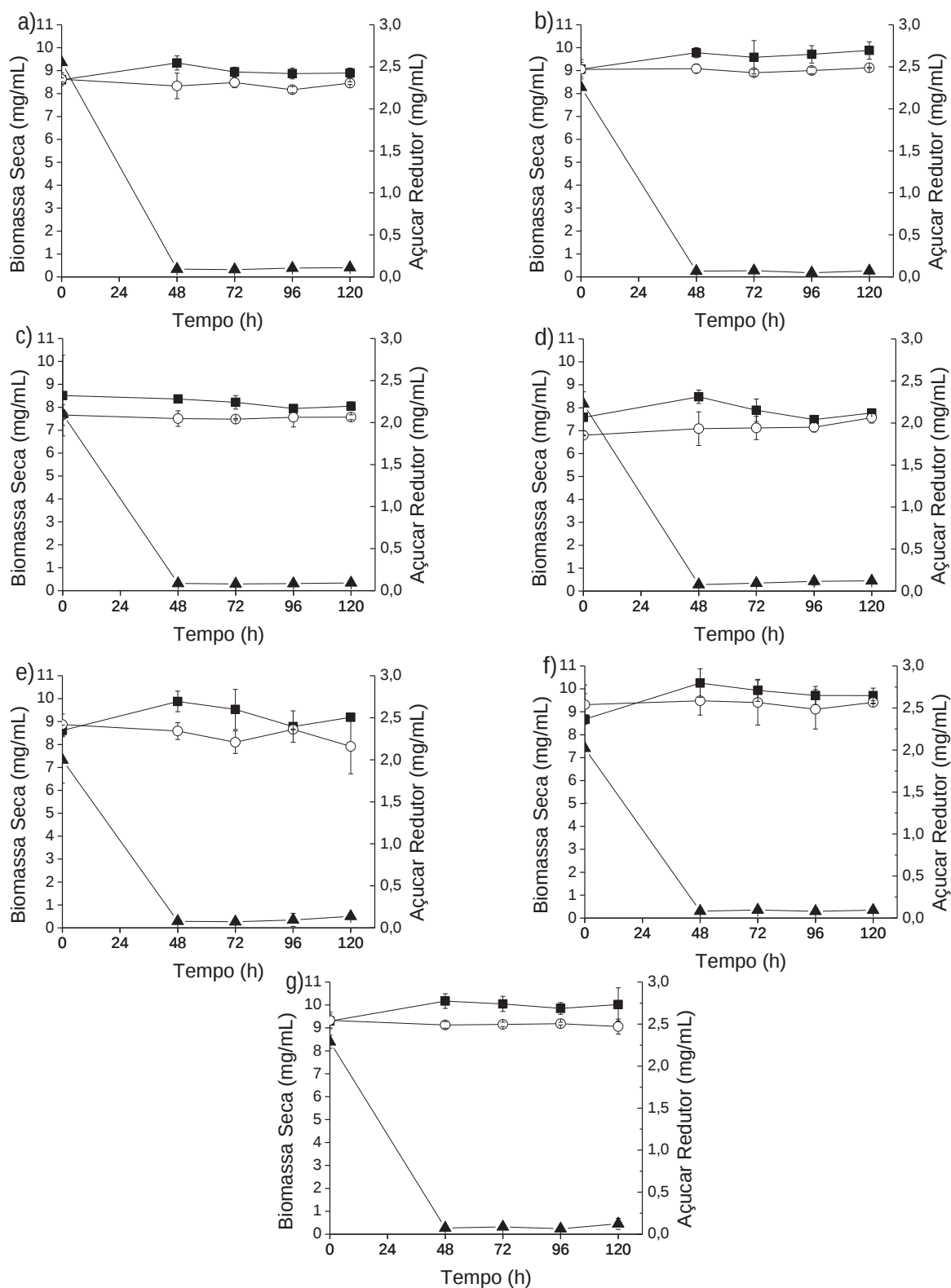


Figura 16: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, utilizando diferentes fontes de carbono, a) bagaço de cana e farelo de trigo (1:1); b) bagaço de cana e farelo de trigo (9:1); c) bagaço de cana e farelo de trigo (1:9); d) farelo de trigo; e) cevada e farelo de trigo (9:1); f) palha de milho e farelo de trigo (9:1); g) palha de milho e cevada (9:1). (■) Biomassa seca, (▲) Açúcar redutor, (○) Biomassa – controle abiótico.

Os resultados indicam que assim como na fermentação em estado sólido, o melhor produtor de xilanase (35,4 U/mL) foi o fungo *Chaetomium sp.* N13. O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi o melhor produtor de CMCase (6,4 U/mL) e beta-glicosidase (1,4 U/mL). Não foi possível destacar o melhor produtor de avicelase, uma vez que produção entre *Chaetomium sp.* N13 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi semelhante (Tabela 4). Entretanto, a comparação entre os dados das Tabelas 2 e 4 deixa claro que a FES foi substancialmente melhor para a produção das enzimas pelos fungos estudados, corroborando dados de vários autores (SAQIB et al., 2010; COLLA et al., 2010; PATIL; DAYANAND, 2006).

Tabela 4: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase dos fungos cultivados em material lignocelulósico em fermentação submersa.

Fungo	Xilanase (U.mL ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	35,4	96	Palha de milho e cevada (9:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	16,9	120	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	0,5	72	Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)
Fungo	CMCase (U.mL ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	5,3	96	Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	6,4	120	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	0,3	72	Farelo de trigo
Fungo	Avicelase (U.mL ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	0,7	48	Palha de milho e cevada (9:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	0,4	72	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	0,7	48	Cevada e farelo de trigo (9:1)
Fungo	β-glicosidase(U.mL ⁻¹)	Tempo (h)	Substrato
<i>Chaetomium sp.</i> N13	0,1	120	Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1 e 1:1)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	1,4	120	Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	0,7	120	Farelo de trigo

Na tabela 5 são apresentados alguns dados obtidos por outros autores, em processo de fermentação submersa. A comparação destes com os dados da Tabela 4 novamente indica o potencial dos fungos deste trabalho na produção de celulasas.

Tabela 5: Comparação entre as produções de xilanase, CMCase, beta-glicosidase por diferentes fungos cultivados em fermentação submersa com material lignocelulósico como fonte de carbono.

Fungo	Substrato	Xilanase (U mL ⁻¹)	Referências
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 1171	Farelo de trigo e avicel	160,0	Singhvi et al. (2011)
<i>Penicillium echinulaum</i>	Bagaço de cana e farelo de soja	1,5	Camassola & Dillon (2009)
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Palha de trigo	61,1	Katapodis et al., (2007)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Farelo de trigo	9,1	Mandalari et al., (2008)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Farelo de cervejaria	16,9	Mandalari et al., (2008)
Fungo	Substrato	CMCase (U mL ⁻¹)	Referências
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 1171	Farelo de trigo e avicel	37,2	Singhvi et al. (2011)
<i>Penicillium echinulatum</i>	Bagaço de cana e farelo de soja	1,6	Camassola & Dillon (2009)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> ¹	Bagaço de cana deslignificado	5,0	Calado et al., (2007)
Fungo	Substrato	B-glicosidase (U mL ⁻¹)	Referências
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 1171	Farelo de trigo e avicel	6,8	Singhvi et al., (2011)
<i>Monoascus purpureus</i> NRRL 1992	Farelo de soja	1,1	Daroit et al., (2007)
<i>Penicillium echinulatum</i>	Bagaço de cana e farelo de soja	0,2	Camassola & Dillon (2009)
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Bagaço de cana pré-tratado	0,7	De-Paula et al., (1999)

1: linhagem geneticamente modificada

A produção de celulasas e xilanase em fermentação em estado sólido quanto em fermentação submersa, foi dependente da natureza da fonte de carbono utilizada no meio de cultura, corroborando vários relatos na literatura que mostram que a produção de celulasas e hemicelulasas é induzida e influenciada pela natureza do substrato utilizado na fermentação. GAO et al., (2008), testaram o efeito de várias fontes de

carbono, como bagaço de cana, palha de junco, palha de trigo, farelo de trigo e palha de milho, para a produção de celulases pelo fungo *Aspergillus terreus* M11 em fermentação em estado sólido. Eles obtiveram as maiores produções de CMCase (440 U/g), FPase (198 U/g) e beta-glicosidase (91 U/g) em palha de milho, concluindo que a produção dessas enzimas depende da natureza da fonte de carbono usada no meio de cultura. Camassola & Dillon (2007), utilizaram misturas de diferentes proporções de bagaço de cana pré-tratado e farelo de trigo para a produção de celulases e xilanase por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em fermentação em estado sólido e, concluíram que o desenvolvimento e a produção das enzimas são favorecidos em meio de cultura formulado com misturas, do que com apenas um dos substratos. Papinutti & Forchiassin (2007) também observaram que o uso de misturas de substratos, induziu os níveis de produção de hidrolases.

A composição química da matéria-prima pode afetar a indução e secreção da enzima, além das condições fisiológicas do microorganismo. Fatores como o tamanho da partícula, acessibilidade, porosidade, natureza amorfa ou cristalina, são essenciais na aderência e penetração dos microrganismos (GAO et al., 2008).

Os melhores substratos para a produção das enzimas pelos fungos *Chaetomium* sp. N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, em fermentação em estado sólido, não foram necessariamente os mesmos para a produção em cultivo submerso.

Quando o cultivo foi realizado com o fungo *Chaetomium* sp N13, a produção de xilanase foi favorecida por mistura com grande proporção de cevada em fermentação em estado sólido e, em misturas com grandes proporções de palha de milho em fermentação submersa. No entanto, a produção dessa enzima mostrou-se reduzida por farelo de trigo nas duas formas de cultivo.

A produção de CMCase foi favorecida em misturas contendo cevada e bagaço de cana em fermentação em estado sólido e, em misturas contendo grandes quantidades de bagaço de cana em fermentação submersa. O cultivo em mistura com grande quantidade de farelo ou somente farelo de trigo, foi desfavorável para a produção da enzima nas duas modalidades de fermentação. A produção de avicelase foi maior em misturas contendo grandes quantidades de palha de milho tanto em fermentação submersa quanto em fermentação em estado sólido. A produção de beta-glicosidase apresentou resultados contraditórios, a mistura com grande quantidade de farelo de trigo foi favorável para a produção da enzima em fermentação em estado sólido e

desfavorável para a produção em cultivo submerso. Do mesmo modo, a mistura com grande quantidade de bagaço de cana foi favorável para a produção de beta-glicosidase em cultivo submerso e desfavorável em fermentação em estado sólido. Considerando que essa enzima pode sofrer inibição por açúcar livre, a solubilidade destes no meio líquido poderia interferir na atividade enzimática observada.

Para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, a produção de xilanase e CMCase foi favorecida por misturas de proporções equivalentes de bagaço de cana e farelo de trigo e, desfavorecida por misturas com palha de milho nos dois tipos de processos fermentativos. A produção de avicelase foi maior em mistura com grande quantidade de cevada em fermentação em estado sólido e, em mistura com proporções equivalentes de bagaço de cana e farelo de trigo em fermentação submersa. Entretanto, misturas com palha de milho e grandes quantidades de farelo de trigo foram desfavoráveis para a produção da enzima nos dois tipos de cultivo. A produção de beta-glicosidase foi favorecida em misturas com grande quantidade de farelo de trigo ou somente farelo de trigo em fermentação em estado sólido e, em mistura com proporções equivalentes de bagaço de cana e farelo de trigo em cultivo submerso. Misturas com palha de milho foram desfavoráveis para a produção da enzima nas duas modalidades de cultivo.

Quando o cultivo foi realizado com o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, a produção de xilanase foi favorecida por grande quantidade de farelo de trigo em fermentação em estado sólido e desfavorecida por misturas com grande quantidade de bagaço de cana e palha de milho. Não foi possível definir qual o meio mais favorável para produção de xilanase em fermentação submersa, uma vez que todos os substratos utilizados induziram a produção da enzima de forma semelhante. A produção de CMCase foi favorecida por mistura com grande quantidade de farelo de trigo ou somente farelo de trigo tanto em fermentação em estado sólido quanto em fermentação submersa. Misturas com palha de milho ou com grande quantidade de bagaço de cana foram menos favoráveis pra a produção da enzima. A produção de avicelase foi favorecida por mistura com grande quantidade de cevada ou farelo de trigo em fermentação em estado sólido e, cevada em fermentação submersa. A produção foi pouco induzida em meios com palha de milho. A produção de beta-glicosidase foi maior em farelo de trigo ou misturas com grandes proporções deste material em FES e, somente em farelo de trigo em fermentação submersa. Mistura com palha de milho ou

grandes quantidades de bagaço de cana foram desfavoráveis para a produção desta enzima.

5.4. Produções de xilanase e celulasas por fermentação submersa utilizando duas fontes de carbono purificadas

Além do material lignocelulósico, duas fontes de carbono, carboximetilcelulose e celulose microcristalina (avicel) purificadas, também foram utilizadas para avaliar a produção das celulasas e xilanase por *Chaetomium sp.* N13 e *Humicola grisea var. thermoidea* por fermentação submersa. Não foram realizados testes com *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, uma vez que, o nível de produção enzimática apresentado por este fungo foi muito baixo.

Quando o fungo *Chaetomium sp.* N13 foi cultivado, a produção de CMCase e beta-glicosidase foi maior em avicel do que em carboximetilcelulose (Fig.17b e 17d) O contrário ocorreu com a produção de xilanase e avicelase, que se mostrou maior em carboximetilcelulose (Fig. 17a e 17c). No entanto, a produção de xilanase foi pouco induzida por esses substratos (Fig. 17a).

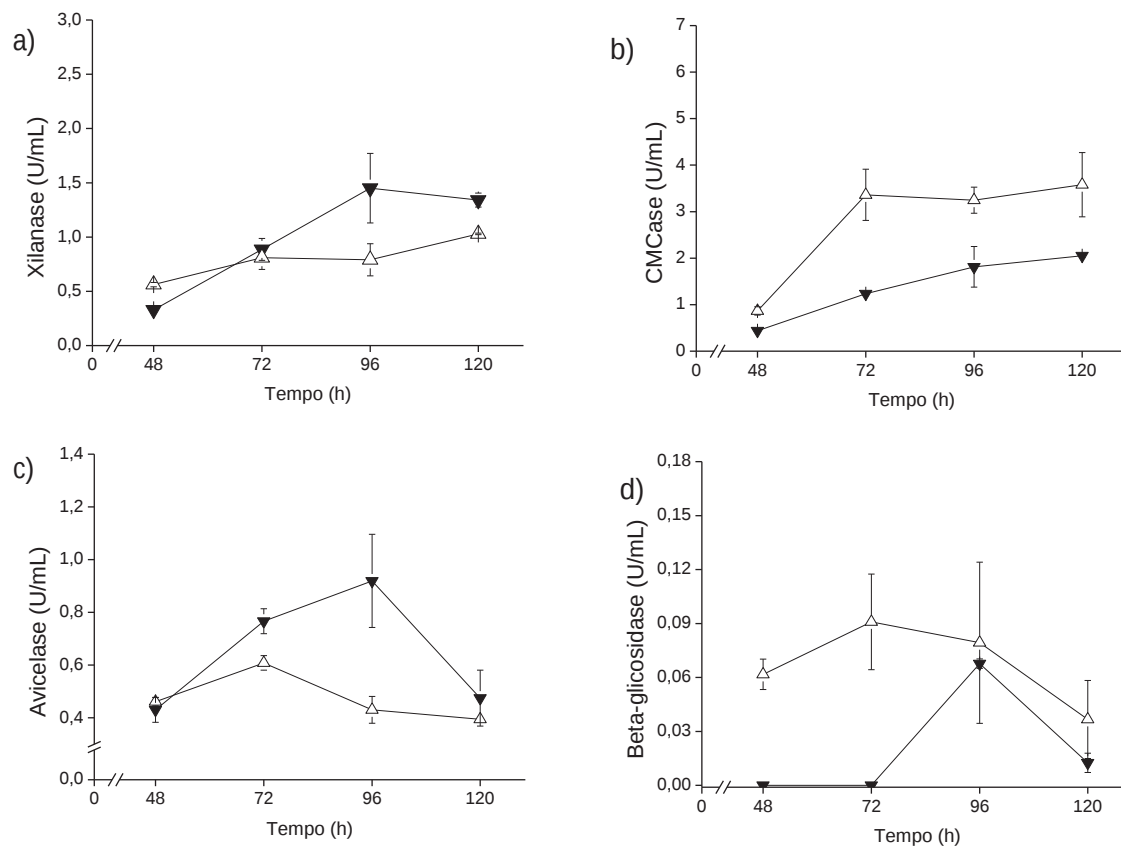


Figura 17: Produção de a) xilanase, b) CMCase, c) avicelase, d) beta-glicosidase por *Chaetomium sp.* N13 em FSm, utilizando (▼) Carboximetilcelulose, (△) Celulose microcristalina - avicel.

No meio de cultivo com CMC a fase de crescimento logarítmico ocorreu em 96h. Nesse meio foi obtido o maior crescimento fúngico (2,8 mg/mL), juntamente com a maior produção de avicelase (0,9 U/mL) (Fig. 17c). A concentração de açúcar redutor quando este substrato foi utilizado como fonte de carbono, também apresentou perfil diferente daqueles obtidos quando o fungo foi cultivado em avicel (Fig. 18). Quando carboximetilcelulose foi utilizada, o açúcar redutor foi metabolizado em 48h de cultivo, seguido de ligeiro aumento em sua concentração até o término do cultivo (Fig. 18a).

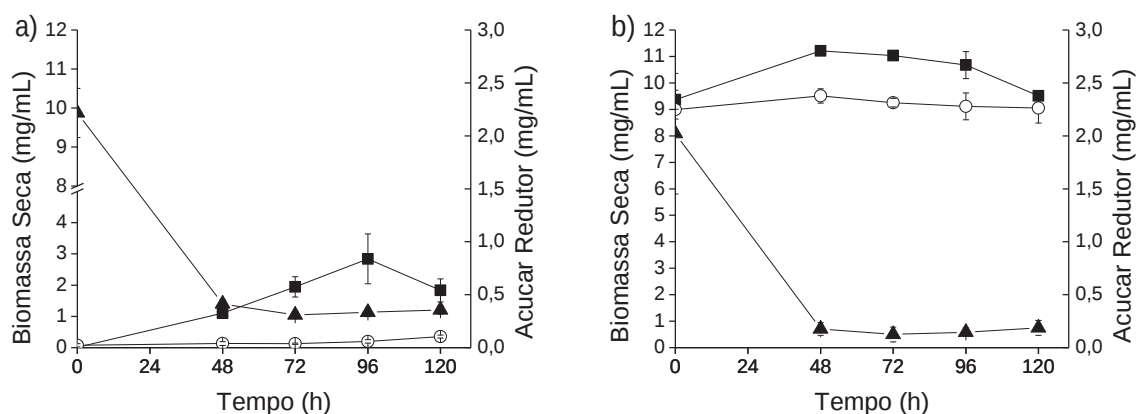


Figura 18: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por *Chaetomium sp.* N13, utilizando a) carboximetilcelulose e b) celulose microcristalina (avicel) como fonte de carbono. (■) Biomassa seca, (▲) Açúcar redutor, (○) Biomassa – controle abiótico

Quando comparada a produção das enzimas em material lignocelulósico e nas fontes de carbono purificadas notamos que a produção de xilanase foi maior em material lignocelulósico do que em carboximetilcelulose e celulose microcristalina (avicel). O mesmo ocorreu com a produção de CMCase. Entretanto, a produção de avicelase e beta-glicosidase foi praticamente a mesma nos dois tipos de substratos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase do fungo *Chaetomium sp.* N13 cultivado em material lignocelulósico e fontes de carbono purificadas em fermentação submersa.

Meio de cultivo	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Avicelase (U/mL)	Beta-glicosidase (U/mL)
Material lignocelulósico	35,4	5,3	0,7	0,1
Fonte de carbono purificada	1,5	3,6	0,9	0,1

Quando o fungo *Humicola grisea var. thermoidea* foi cultivado, o uso de avicel também foi mais favorável para a produção de CMCase e beta-glicosidase (Fig. 19b e 19d), enquanto que a maior produção de xilanase e avicelase também ocorreu em carboximetilcelulose (Fig. 19a e 19c). Do mesmo modo, a produção de xilanase foi pouco induzida por carboximetilcelulose e avicel (Fig. 19a).

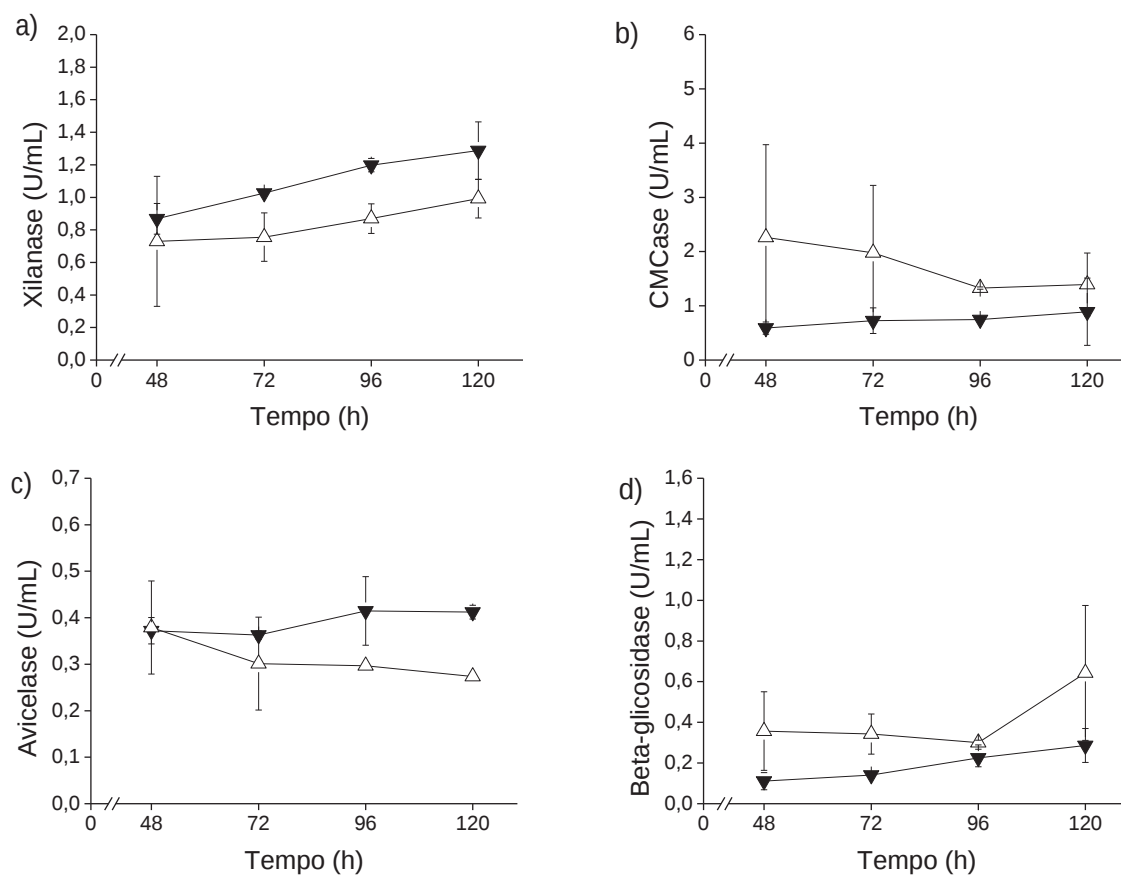


Figura 19: Produção de a) xilanase, b) CMCase, c) avicelase, d) beta-glicosidase, por *Humicola grisea* var. *thermoidea* em FSm, utilizando (▼) Carboximetilcelulose, (△) Celulose microcristalina - avicel.

A figura 20 mostra que quando as fontes de carbono purificadas (carboximetilcelulose e avicel) foram utilizadas, ocorreu aumento da biomassa total, indicando fase de crescimento logarítmico até 48h de cultivo. O maior crescimento fúngico (2,0 mg/mL) ocorreu no meio com avicel, seguido de (1,7 mg/mL) em carboximetilcelulose (Fig. 20a e 20b).

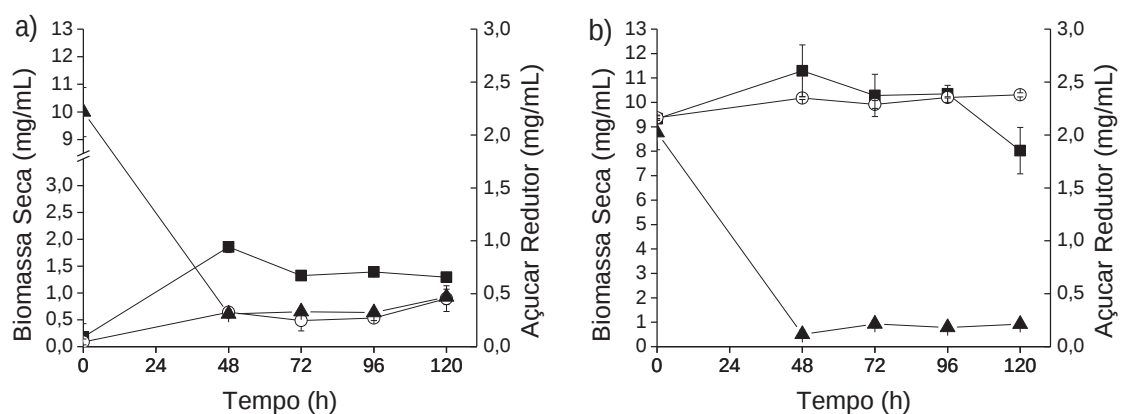


Figura 20: Estimativa do crescimento fúngico em fermentação submersa, por *Humicola grisea* var. *thermoidea*, utilizando a) carboximetilcelulose e b) celulose microcristalina (avicel) como fonte de carbono. (■) Biomassa seca, (▲) Açúcar redutor, (○) Biomassa – controle abiótico

Para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, a produção de xilanase, CMCase e beta-glicosidase foi maior em material lignocelulósico do que em carboximetilcelulose e celulose microcristalina. A produção de avicelase foi igual nos dois tipos de substratos (Tabela 7). Esses dados juntamente com aqueles da Tabela 6 sugerem que a complexidade do material lignocelulósico foi favorável ao crescimento microbiano e produção das enzimas visto que pode fornecer maior variedade de polissacarídeos além das fibras de celulose ser encontradas em diferentes níveis de organização.

Tabela 7: Comparação entre as produções máximas de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* cultivado em material lignocelulósico e fontes de carbono purificadas em fermentação submersa.

Meio de cultivo	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Avicelase (U/mL)	Beta-glicosidase (U/mL)
Material lignocelulósico	16,9	6,4	0,4	1,4
Fonte de carbono purificada	1,3	2,3	0,4	0,6

5.5. Análise comparativa das produções de xilanase e celulasas por FES e FSm

O melhor processo fermentativo para a produção de celulasas e hemicelulasas foi avaliado para cada um dos substratos utilizados.

Para o fungo *Chaetomium sp* N13, a atividade de xilanase foi maior na solução enzimática bruta obtida em FES que em FSm para a maioria dos substratos utilizados, exceto em farelo de trigo, palha de milho e farelo de trigo (9:1) e palha de milho e cevada (9:1) (Tabela 8).

É interessante observar que quando palha de milho foi usada, com farelo ou cevada, a produção de xilanase foi maior em fermentação submersa. A palha de milho é um material com baixo teor de lignina e alto teor de hemicelulose e cuja estrutura de pouca espessura pode facilitar a colonização da sua superfície pelo fungo e consequentemente hidrólise em meio aquoso. Os dados indicaram que, em FES, os materiais que proporcionaram maiores produções de xilanase pelo fungo *Chaetomium sp*. N13 foram misturas de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e cevada e farelo de trigo (9:1).

Com relação a enzima CMCase, o comportamento foi bastante distinto (Tabela 8), com variação das maiores atividades de enzima obtida. Porém do mesmo modo que o observado para xilanase, os meios com palha de milho promoveram as maiores produções da enzima em FSm e os maiores valores de atividade foram obtidos em FES em meio de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) e cevada e farelo de trigo (9:1).

Conforme dados da tabela 8, o fungo *Chaetomium sp*. N13 não é um bom produtor de avicelase. Entretanto, nota-se que em FSm a produção dessa enzima foi maior do que em FES. Do mesmo modo, a produção de beta-glicosidase foi baixa, mas ao contrário da exoglucanase, as maiores atividades foram obtidas em FES (Tabela 8).

A produtividade das enzimas foi avaliada levando-se em consideração a utilização de 1g de substrato nas fermentações sólidas e submersas, portanto, foi feita uma estimativa teórica dos valores obtidos, uma vez que as fermentações submersas foram realizadas com 0,2g de material lignocelulósico. Dessa forma, a produtividade das enzimas por *Chaetomium sp*. N13 foi maior em FSm do que em FES para a maioria dos substratos avaliados. Entretanto os picos de produtividade de xilanase e beta-glicosidase foram alcançados em FES (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por *Chaetomium sp.* N13 em FES e FSm em função do substrato utilizado.

Material Lignocelulósico	FES		FSm	
	U/mL	Produtividade(U/g*)	U/mL	Produtividade(U/g*)
Xilanase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	78,5	1569	15,1	1514
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	31,3	626	17,96	1796
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	17,8	356	9,7	975
Farelo de Trigo	6,7	134	11,4	1138
Cevada e farelo de trigo (9:1)	74,2	1484	14,1	1407
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	16,98	340	34,9	3494
Palha de milho e cevada (9:1)	14,3	286	35,4	3539
CMCase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	9,6	192	3,9	391
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	3,8	76,6	5,3	535
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,8	16,6	2,8	282
Farelo de Trigo	3,1	62,4	2,4	238
Cevada e farelo de trigo (9:1)	7,3	145	3,0	300
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	2,4	47,6	3,9	392
Palha de milho e cevada (9:1)	1,7	33,4	4,0	399
Avicelase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,1	2	0,55	55
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,13	2,6	0,60	60
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,39	7,8	0,59	59
Farelo de Trigo	0,35	7	0,67	67
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,38	7,6	0,58	58
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,64	12,8	0,68	68
Palha de milho e cevada (9:1)	0,47	9,4	0,70	70
Beta-glicosidase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,27	5,4	0,08	8
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,04	0,8	0,09	9
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,69	13,8	0,03	3
Farelo de Trigo	0,39	7,8	0,04	4
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,28	5,6	0,06	6
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,05	1	0,06	6
Palha de milho e cevada (9:1)	0,02	0,4	0,07	7

* Substrato sólido usado como fonte de carbono

Para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* a produção de xilanase foi maior em FSm que em FES em todos os substratos avaliados. A produção da enzima foi similar nos dois tipos de processos fermentativos, apenas quando bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) foi utilizado como meio de cultivo (Tabela 9).

A produção de CMCase obtida no extrato enzimático bruto em FES foi maior que em FSm para três dos quatro substratos avaliados. Para cevada e farelo de trigo (9:1), palha de milho e farelo de trigo (9:1) e bagaço de cana e farelo de trigo (9:1) a produção de CMCase foi maior no cultivo submerso. Já em palha de milho e cevada (9:1), a produção foi praticamente a mesma nos dois processos fermentativos (Tabela 9).

Em relação a avicelase a produção em FES foi maior que em FSm em todos os meios testados (Tabela 9).

A produção de beta-glicosidase foi maior em FES que em FSm apenas em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) e farelo de trigo. Para os demais extratos enzimáticos a produção da enzima em FSm foi superior, sendo que a produção desta enzima não foi detectada em FES. Entretanto, os índices de produção obtidos em FES foram bem maiores que os obtidos em FSm (Tabela 9).

A produtividade das enzimas por *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi maior em FSm do que em FES para a maioria dos substratos avaliados. Entretanto os picos de produtividade de beta-glicosidase foram alcançados em FES (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por *Humicola grisea* var. *thermoidea* em FES e FSm em função do substrato sólido utilizado.

Material Lignocelulósico	FES		FSm	
	U/mL	Produtividade(U/g*)	U/mL	Produtividade(U/g*)
Xilanase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	16,5	330,4	16,9	1690
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,4	7,4	5,8	581
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	8,5	170,4	13,4	1343
Farelo de Trigo	5,6	111,6	6,5	649
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,9	18,4	8,0	804
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,7	13,2	4,7	470
Palha de milho e cevada (9:1)	0,3	5,6	1,0	970
CMCase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	11,6	232,8	6,4	642
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,9	18,6	2,1	214
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	4,5	89,4	3,7	368
Farelo de Trigo	3,3	66	3,0	300
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,8	16	4,0	400
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,5	10,4	1,7	168
Palha de milho e cevada (9:1)	0,5	9,8	0,5	50
Avicelase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,81	16,2	0,43	43
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,78	15,6	0,40	40
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,83	16,6	0,31	31
Farelo de Trigo	0,63	12,6	0,30	30
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,90	18	0,30	30
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,73	14,6	0,27	27
Palha de milho e cevada (9:1)	0,67	13,4	0,29	29
Beta-glicosidase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	5,82	116,4	1,44	144
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,27	5,4	0,64	64
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	6,24	124,8	0,96	96
Farelo de Trigo	6,16	123,2	0,55	55
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,05	1	0,49	49
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,00	ND	0,74	74
Palha de milho e cevada (9:1)	0,00	ND	0,14	14

* Substrato sólido usado como fonte de carbono

Para o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 a produção de xilanase foi muito parecida nos dois processos fermentativos, entretanto, a produção foi um pouco maior em FSm que em FES para a maioria dos meios testados. As únicas exceções são farelo de trigo, cuja produção foi superior em FES e a mistura bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), cuja produção da enzima nas duas modalidades de cultivo foi similar (Tabela 10).

A produção de CMCase foi maior em FES que em FSm em todos os meios de cultivo avaliados (Tabela 10).

A produção de avicelase foi praticamente a mesma nos dois processos fermentativos para todos os substratos avaliados, exceto cevada e farelo de trigo (9:1) e palha de milho e farelo de trigo (9:1), cujas produções foram ligeiramente maiores em fermentação submersa (Tabela 10). A produção de beta-glicosidase foi maior em FES que em cultivo submerso, exceto para cevada e farelo de trigo (9:1) e palha de milho e cevada (9:1) (Tabela 10).

A produtividade das enzimas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi maior em FSm do que em FES para todos os substratos avaliados (Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação comparativa da produção e produtividade máxima de xilanase e celulasas por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em FES e FSm em função do substrato sólido utilizado.

Material Lignocelulósico	FES		FSm	
	U/mL	Produtividade(U/g)*	U/mL	Produtividade(U/g)*
Xilanase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,45	9	0,44	44
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,24	4,8	0,50	50
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,36	7,2	0,52	52
Farelo de Trigo	0,67	13,4	0,49	49
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,39	7,8	0,45	45
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,31	6,2	0,43	43
Palha de milho e cevada (9:1)	0,36	7,2	0,44	44
CMCase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,44	8,8	0,29	29
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,28	5,6	0,16	16
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	1,00	20	0,21	21
Farelo de Trigo	0,87	17,4	0,28	28
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,52	10,4	0,24	24
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,30	6	0,18	18
Palha de milho e cevada (9:1)	0,30	6	0,18	18
Avicelase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	0,53	10,6	0,52	52
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,49	9,8	0,49	49
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	0,61	12,2	0,59	59
Farelo de Trigo	0,52	10,4	0,55	55
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,64	12,8	0,72	72
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,51	10,2	0,61	61
Palha de milho e cevada (9:1)	0,41	8,2	0,40	40
Beta-glicosidase				
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:1)	1,01	20,2	0,50	50
Bagaço de cana e farelo de trigo (9:1)	0,29	5,8	0,20	20
Bagaço de cana e farelo de trigo (1:9)	2,14	42,8	0,48	48
Farelo de Trigo	2,34	46,8	0,72	72
Cevada e farelo de trigo (9:1)	0,49	9,8	0,61	61
Palha de milho e farelo de trigo (9:1)	0,37	7,4	0,26	26
Palha de milho e cevada (9:1)	0,17	3,4	0,29	29

* Substrato sólido usado como fonte de carbono

Os resultados obtidos nas tabelas 8 a 10, demonstram não existir uma relação entre o método fermentativo e o substrato utilizado como meio de cultivo, com exceção a palha de milho que no geral apresentou melhores produções enzimáticas em cultivo submerso.

Para os fungos *Chaetomium sp.* N13 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, a FES mostrou-se mais eficiente para a produção de xilanase, CMCase e beta-glicosidase, enquanto que a FSm foi o melhor processo para a produção de avicelase. Para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* a FES mostrou-se mais eficiente para a produção de CMCase, avicelase e beta-glicosidase, enquanto que a FSm foi o melhor processo para a produção de xilanase, apesar do pico de produção da enzima ser praticamente o mesmo nos dois processos fermentativos. No entanto, o perfil comparativo da produção enzimática obtida pelos três fungos, avaliados nos itens 5.1 e 5.3, demonstram que os picos de produção de xilanase, CMCase, avicelase e beta-glicosidase foram apresentados pelos extratos enzimáticos obtidos por FES.

Existem poucos trabalhos na literatura comparando a produção de celulasas e hemicelulasas em FES e FSm. Elisashvili et al., (2008), compararam a produção de enzimas lignocelulolíticas em FES e FSm utilizando vários materiais vegetais como substrato. Os resultados apontaram que a FES foi favorável para a produção de lacase e MnP pela maioria dos fungos estudados, enquanto que a FSm provou ser melhor para a produção das enzimas hidrolíticas (celulasas e hemicelulasas). Em contrapartida, Saqib et al., (2010), analisaram a produção de celulasas por *Aspergillus fumigatus* em FES e FSm e, descobriram que quando o cultivo ocorreu em FES, a produção de proteínas e a atividade específica da enzima foram maiores. Além disso, Saqib et al., (2010) ainda aponta uma possível diferença na estrutura das enzimas produzidas pelos dois processos fermentativos devido à diferença em suas termoestabilidades. Já Singhania et al., (2010), afirmaram ser impossível a comparação direta da produção entre FES e FSm, apesar de concordar que a FES geralmente é maior ou mais barata que o cultivo submerso.

Destaca-se que embora a produtividade enzimática em FSm tenha sido maior que em FES para a maioria dos substratos avaliados, não é possível afirmar que a fermentação submersa foi o melhor processo fermentativo para a produção das enzimas, uma vez que os valores observados foram calculados de forma teórica, sendo necessário novos estudos no que diz respeito ao aumento na escala de produção para confirmá-los,

ou seja, é preciso verificar se a produção enzimática irá aumentar na mesma proporção em que o substrato sólido e o volume do meio de cultura utilizados forem aumentados.

5.6. Reuso do material lignocelulósico em uma nova FES

O material obtido após a extração da enzima, no primeiro ciclo de fermentação, foi reutilizado em nova fermentação conforme descrito na seção material e métodos. Para tal, foram escolhidos os substratos que proporcionaram maiores quantidades de enzimas para cada fungo (Anexo 1).

Para o fungo *Chaetomium sp.* N13, o material fermentado escolhido para o reuso foi a mistura de cevada e farelo de trigo (9:1).

A produção de xilanase, e beta-glicosidase foi maior no reuso do material lignocelulósico apenas nas primeiras 96h de cultivo. Após esse período houve queda na produção indicando a não viabilidade deste material para a produção destas enzimas (Fig. 21a, e 21d). Ao contrário das demais enzimas, a produção de CMCase foi maior no cultivo com o material reutilizado, atingindo o dobro da atividade da primeira fermentação em 288h (Fig. 21b). A produção de avicelase, foi levemente superior no reuso do que no primeiro uso do material lignocelulósico (Fig. 21c). A produção de beta-glicosidase foi favorecida apenas nas primeiras 96h de cultivo com o material reutilizado. Em 192h, a produção desta enzima foi praticamente a mesma nos dois tipos de substratos, entretanto, em seguida houve queda na produção desta enzima quando o material reutilizado foi utilizado como fonte de carbono (Fig. 21d).

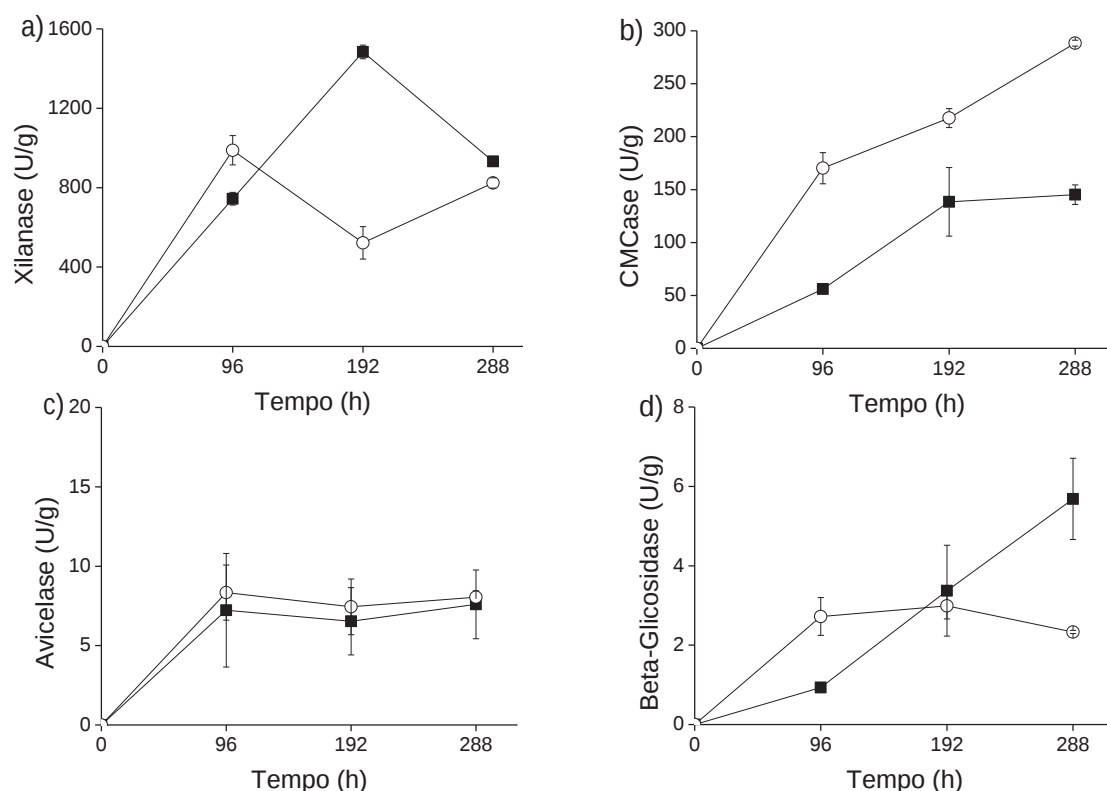


Figura 21: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por *Chaetomium sp.* N13. (■) 1º uso do material lignocelulósico, (○) Reuso do material lignocelulósico.

O substrato escolhido para o cultivo do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi a mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). Verificou-se que a produção de todas as enzimas foi maior no primeiro uso do material lignocelulósico que no reuso (Fig. 22). Dentro da metodologia proposta para a análise das atividades enzimáticas, não foi possível detectar a atividade de avicelase no cultivo com o material reutilizado (Fig. 22c). A produção de beta-glicosidase foi muito semelhante no cultivo com os dois tipos de materiais apenas nas primeiras 96h de fermentação. Em seguida, houve queda na produção da enzima com o reuso do material lignocelulósico, indicando a inviabilidade do processo (Fig. 22d).

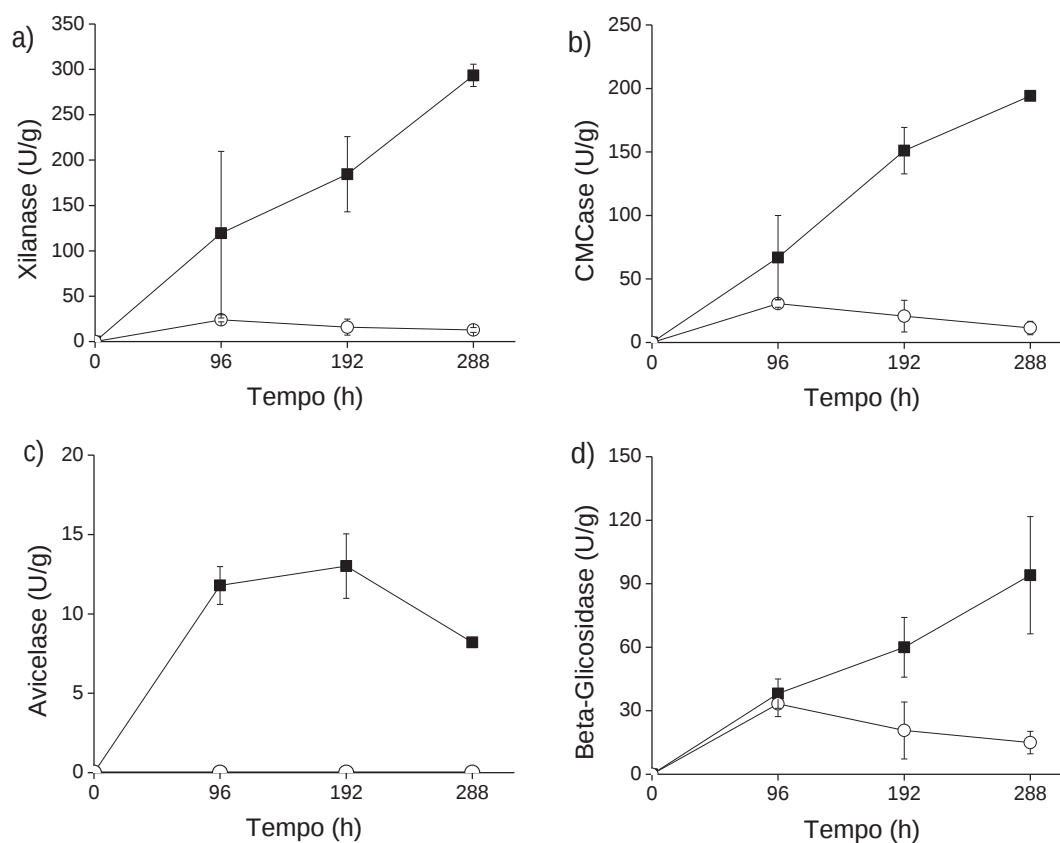


Figura 22: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por *Humicola grisea* var. *thermoidea*. (■) 1º uso do material lignocelulósico, (○) Reuso do material lignocelulósico.

Para o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, o substrato escolhido para o reuso, foi a mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:9). A produção de xilanase foi levemente superior no reuso do que no primeiro uso do material lignocelulósico (Fig. 23a). Entretanto, mesmo não aconteceu com as atividades de CMCase, avicelase e beta-glicosidase que, foram maiores no primeiro uso do material (Fig. 23b, 23c e 23d).

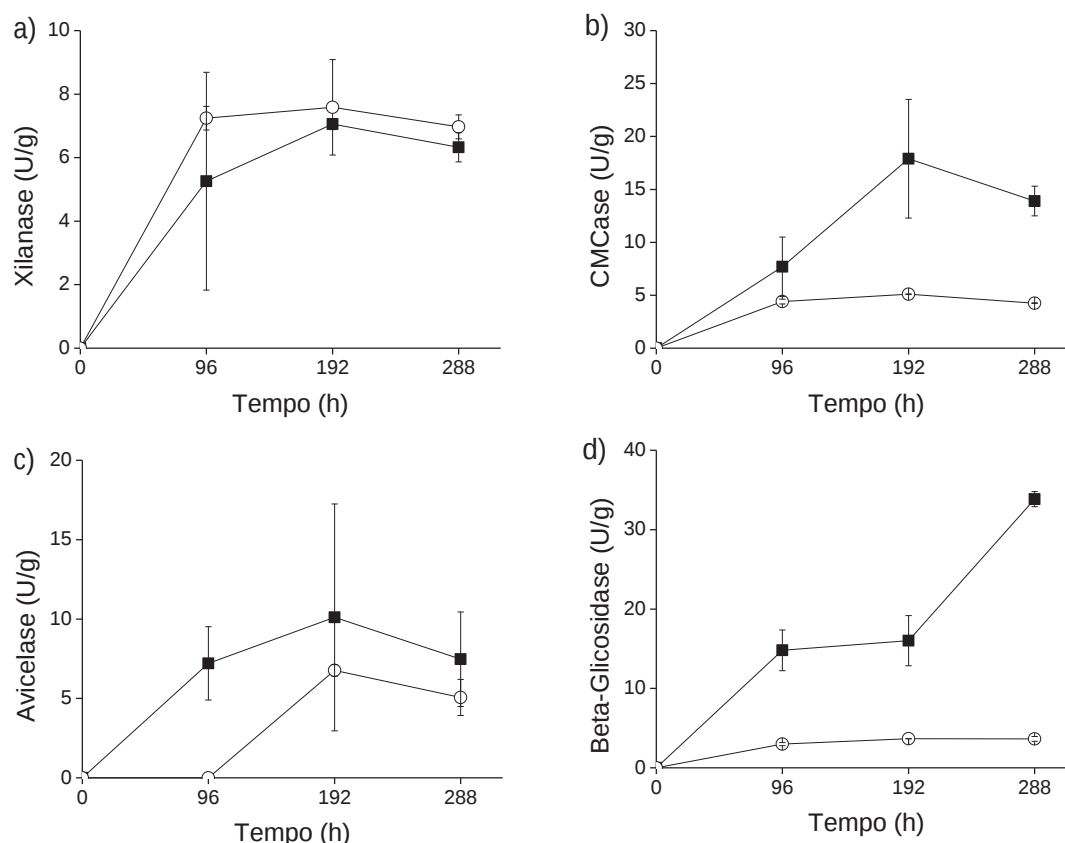


Figura 23: Perfil comparativo da produção de xilanase e celulasas em duas fermentações em estado sólido consecutivas por *Thermomucor indiciae-seudaticae*. (■) 1º uso do material lignocelulósico, (○) Reuso do material lignocelulósico.

Os resultados indicam que o reuso do material lignocelulósico para FES, torna a produção de celulasas viável apenas para o fungo *Chaetomium sp.* N13.

A menor atividade das enzimas no meio quando se utilizou o material residual de fermentação anterior pode ser justificado por: 1) Os fungos consumiram na primeira fermentação os açúcares solúveis e com isso atingiram um nível maior de miceliação, promovendo maior secreção de enzimas. Uma vez que as enzimas de fungos filamentosos são secretadas pelas pontas das hifas, os níveis de miceliação e/ou ramificação dos micélios estão diretamente relacionados com o número de extremidades de hifas potencialmente secretoras; 2) o crescimento do fungo na primeira fermentação consumiu os sacarídeos indutores das enzimas; 3) a ação das enzimas secretadas pelos fungos na primeira fermentação sobre as fibras do material lignocelulósico levaram a hidrólise daqueles polímeros mais acessíveis, restando no material as estruturas mais organizadas e portanto, mais recalcitrantes à degradação microbiana. Essa dificuldade de acesso as fibras pode ter afetado o desenvolvimento do fungo.

Destaca-se que toda hipótese baseada no crescimento micelial deve ser considerada com restrições visto que o crescimento fúngico não foi quantificado neste trabalho.

Existem poucos trabalhos na literatura descrevendo o uso do mesmo substrato lignocelulósico em vários processos fermentativos consecutivos. A maioria dos trabalhos descreve o pré-tratamento biológico do material lignocelulósico por fungos da podridão branca. Camassola & Dillon (2009) avaliaram o pré-tratamento do bagaço de cana pelo fungo da podridão branca *Pleurotus sajor-caju* PS2001 e, subsequente uso desta biomassa na produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* 9A02S1. Eles observaram que a atividade enzimática obtida com a biomassa pré-tratada foi menor que nos tratamentos controle, que foram realizados com bagaço sem pré-tratamento e celulose. Para o meio suplementado com bagaço de cana pré-tratado o pico médio das atividades obtidas foram de 0,13, 1,0, 0,18 e 0,33 U/mL para FPase, endoglucanase, beta-glicosidase e xilanase, respectivamente. Para o controle com celulose e com o bagaço sem pré-tratamento os valores foram de 0,52, 1,20, 0,20 e 1,46 U/mL, e de 0,95, 1,60, 0,21 e 1,49 U/mL, respectivamente.

Xia & Cen (1999), utilizaram o mesmo substrato (talo de milho e farelo de trigo) em vários processos consecutivos de fermentação por batelada e, constataram que o reuso do substrato sólido foi viável por pelo menos três vezes, sendo que a maior atividade de celulase (158 U/g de FPase), foi obtida no segundo processo de batelada consecutivo. Este trabalho ainda indicou o aumento da atividade de celobiase nos três primeiros reusos.

5.7. Produção dos extratos enzimáticos para a hidrólise

Uma vez determinado o perfil de produção enzimática dos três fungos avaliados, escolheu-se os extratos de *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* produzidos a partir da FES em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) para a realização da hidrólise enzimática. Dessa forma, realizou-se uma nova fermentação, nas mesmas condições da fermentação anterior, para a obtenção dos extratos enzimáticos. O extrato do *Chaetomium* sp. N13 foi extraído em 192h de cultivo, enquanto que do *Humicola grisea* var. *thermoidea* em 240h de fermentação.

5.8. Efeito do pH e temperatura na atividade das enzimas produzidas por *Chaetomium sp* N13 e *Humicola grisea var. thermoidea*

Os extratos produzidos para a hidrólise enzimática foram avaliados em relação ao efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas. A xilanase produzida por *Chaetomium sp.* N13 exibiu sua atividade máxima em pH 5,5, enquanto que a CMCase foi mais ativa em pH 5,0 e a beta-glicosidase em pH 4,5 (Fig. 24a, 24b e 24c). As mesmas enzimas produzidas por *Humicola grisea var. thermoidea* apresentaram atividade máxima em pH 6,0-6,5, 6,5 e 5,0-7,5 respectivamente, indicando que a beta-glicosidase desse fungo foi altamente ativa em uma ampla faixa de pH (Fig. 24d, 24e e 24f).

Com relação à temperatura ótima, as xilanases e CMCases de ambos os fungos apresentaram maior atividade em 65-70°C e 65°C, respectivamente (Fig. 24d e 24e). A beta-glicosidase de *Chaetomium sp.* N13 foi mais ativa a 65°C, enquanto que a de *Humicola grisea var. thermoidea* na faixa de 65-75°C (Fig. 24f).

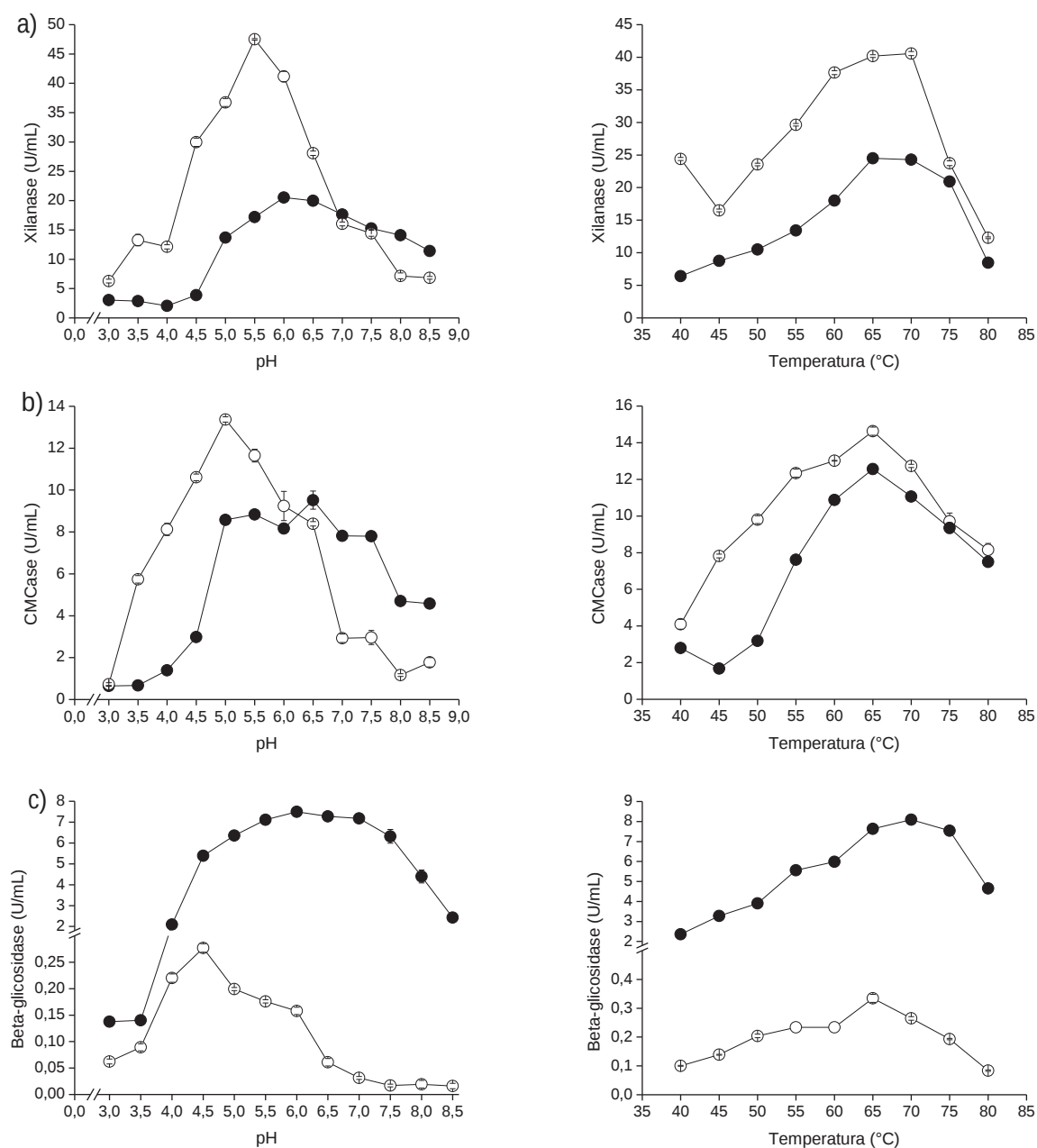


Figura 24: Efeito do pH e temperatura na atividade de (a) xilanase, (b) CMCase e (c) beta-glicosidase produzidas por FES em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1); (○) *Chaetomium sp. N13*, (●) *Humicola grisea var. thermoidea*.

Os resultados apresentados por ambos os fungos estão de acordo com os relatados na literatura. Lucena-Neto & Ferreira Filho (2004) purificaram uma xilanase (X2) de culturas de *Humicola grisea var. thermoidea* cultivado em farelo de trigo. A enzima foi mais ativa em intervalos de pH e temperatura de 4,5-6,5 e 55-60°C, respectivamente.

Li et al., (2003), encontraram valores de 60°C e pH 4,0 para uma endocelulase purificada de *Chaetomium thermophilum* CT2.

No geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0) (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), com exceção de alguns actinomicetos cujas celulasas possuem melhor atuação em temperaturas por volta dos 50°C e valores de pH entre neutros e moderadamente ácidos (JANG; CHENG, 2003). Já a maioria das xilanases tem pH e temperatura ótimos na faixa de 4,5-6,5 e 50-70°C (MAHESHWARI et al.,2000).

5.9. Hidrólise enzimática do material lignocelulósico

Uma celulase comercial, POWERCELL, cedida pela Prozyn BioSolutions e as soluções enzimáticas brutas de *Chaetomium sp* N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, foram testadas quanto às suas capacidades de converter bagaço de cana *in natura*, bagaço de cana pré-tratado e palha de cana *in natura*, em açúcares solúveis. Na tentativa de aumentar a hidrólise enzimática, a mistura dos extratos enzimáticos de *Chaetomium sp* N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* também foi utilizada na proporção(1:1) (v/v), para avaliar uma possível complementaridade de suas enzimas, uma vez que a solução enzimática de *Chaetomium sp*. N13 apresenta maior atividade de xilanase e CMCase, enquanto que a de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, maior atividade de beta-glicosidase (Tabela 11).

Tabela 11: Atividade enzimática (U/g substrato seco utilizado na hidrólise) de POWERCELL e dos preparados enzimáticos de *Chaetomium sp* N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* utilizados nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana *in natura*, pré-tratado e palha de cana *in natura*.

Solução enzimática	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	Avicelase (U/g)	Beta-Glicosidase (U/g)
<i>Chaetomium sp</i> N13	1985	655	20	10
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	770	430	25	295
Mistura <i>Chaetomium sp</i> . N13 e <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	1377,5	542,5	22,5	152,5
Enzima Comercial	1710	7275	210	695

A figura 25a apresenta os dados da hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* utilizando as soluções enzimáticas citadas acima. Em 6h de hidrólise é possível notar certa diferença nos teores de açúcares liberados pela ação das diferentes soluções enzimáticas utilizadas. Neste período, o valor de açúcares liberados, pela ação da enzima comercial 21,6 (mg/g peso seco), foi um pouco acima do valor encontrado para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* 17,9 (mg/g peso seco). Os teores de açúcares liberados pela ação das enzimas do *Chaetomium* sp. N13 6,7 (mg/g peso seco) foram menores quando comparados com a ação das enzimas dos demais fungos, sendo quase 3 vezes menor eficiente que a solução enzimática do *Humicola grisea* var. *thermoidea*. A mistura dos extratos enzimáticos de *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* apresentou resultados intermediários, liberando 12 (mg/g peso seco) em 6h de ensaio. Em 24h de hidrólise os valores de açúcares liberados pela ação das enzimas sobre o bagaço de cana *in natura* aumentaram, entretanto, o comportamento das soluções enzimáticas manteve-se semelhante ao descrito em 6h de ensaio, com exceção da mistura dos extratos enzimáticos dos dois fungos. Em 24h de hidrólise, o extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi quase 2 vezes mais eficiente que o extrato enzimático do *Chaetomium* sp. N13. Os teores de açúcares liberados pela ação das enzimas em 24h de hidrólise foram de 23,6 (mg/g peso seco) e 14,6 (mg/g peso seco), respectivamente. O uso da mistura dos extratos enzimáticos dos dois fungos apresentou efeito positivo na hidrólise do bagaço de cana, com liberação máxima de açúcares 27,4 (mg/g peso seco) em 24h do ensaio. Nota-se que neste caso, não houve saturação das enzimas pelo substrato, uma vez que pela projeção da curva ainda deveria ocorrer um aumento crescente na liberação de açúcares. Isso se deve provavelmente pela complementaridade das enzimas, ou seja, equilíbrio entre as quantidades de xilanase, CMCase e beta-glicosidase apresentados pela mistura. Com relação à enzima comercial, os teores de açúcares liberados foram bem próximos aos do *Humicola grisea* var. *thermoidea*, demonstrando o poder de sacarificação da solução enzimática bruta desse fungo. O peso seco do bagaço de cana *in natura* submetido a sacarificação enzimática não variou significativamente. Houve pequena perda de peso seco nas primeiras 6h de hidrólise, independente da solução enzimática utilizada. Isto pode ter ocorrido pela degradação da fração celulósica mais facilmente disponível, caracterizando a fase inicial rápida da hidrólise. No ensaio em que a mistura dos extratos enzimáticos de *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi utilizada houve maior redução no peso seco do material lignocelulósico (Fig. 25b).

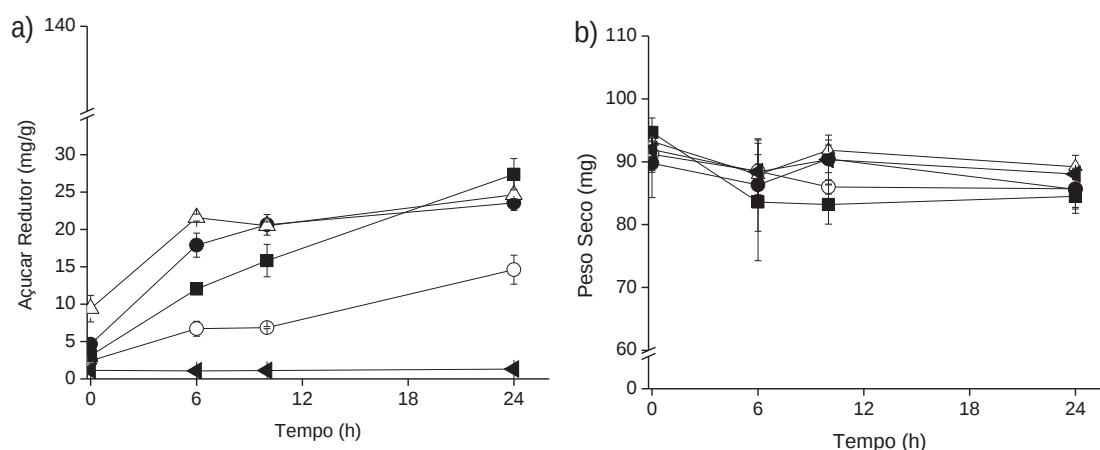


Figura 25: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática do bagaço de cana *in natura*. b) Peso seco do bagaço de cana *in natura* após hidrólise enzimática. (○) Enzimas de *Chaetomium* sp. N13, (●) Enzimas de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, (△) Enzima comercial, (■) Mistura de enzimas de *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (◄) Controle usando água

Para avaliar a capacidade hidrolítica dos fungos, um novo ensaio foi realizado utilizando palha de cana como substrato. A palha de cana apresenta maior conteúdo de hemicelulose, sendo um material menos recalcitrante que o bagaço de cana. Esta característica pode facilitar o acesso das enzimas às fibras, aumentando a eficiência da hidrólise. Os teores de açúcares liberados da palha de cana pela ação das enzimas de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, da mistura dos extratos enzimáticos de *Chaetomium* sp N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* e da enzima comercial foram semelhantes ao longo do experimento, atingindo 44,1, 40,5 e 47,9 (mg/g peso seco), respectivamente, em 24h de hidrólise. Os teores de açúcares liberados pela ação das enzimas do *Chaetomium* sp. N13 foram novamente menores quando comparados com a ação das enzimas dos demais fungos, atingindo 31,0 (mg/g peso seco) em 24h (Fig. 26a).

O peso seco da palha de cana submetida a hidrólise enzimática apresenta redução de até 10% em 24h de ensaio, o que demonstra a maior facilidade de degradação da palha de cana por parte das enzimas utilizadas (Fig. 26b).

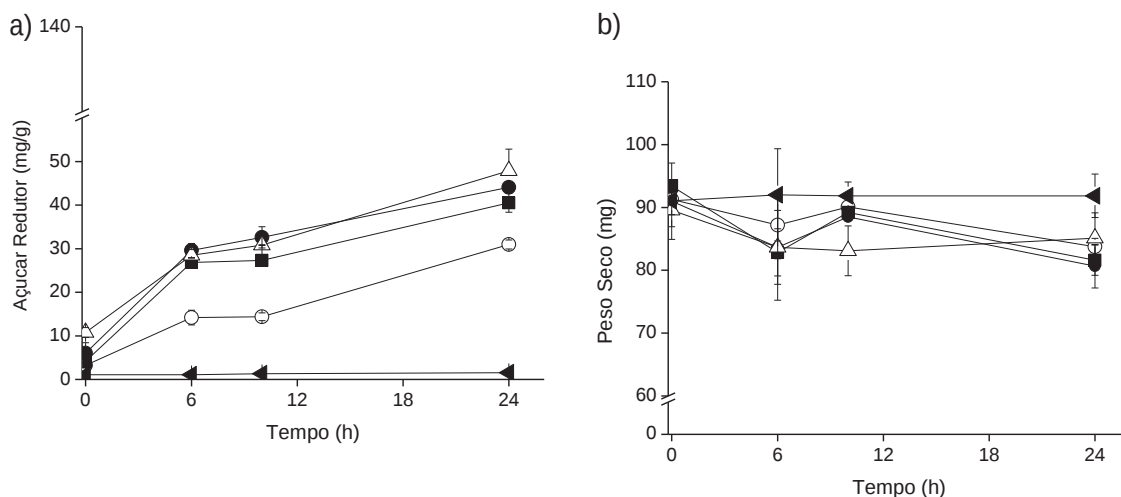


Figura 26: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática da palha de cana. b) Peso seco da palha de cana após hidrólise enzimática. (○) Enzimas de *Chaetomium* sp. N13, (●) Enzimas de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, (△) Enzima comercial, (■) Mistura de enzimas de *Chaetomium* sp. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (▲) Controle usando água

A menor eficiência da solução enzimática de *Chaetomium* sp. N13, na liberação de açúcares a partir dos substratos lignocelulósicos, pode ser explicada pela reduzida atividade de beta-glicosidase desse extrato (Tabela 11). As beta-glicosidases são responsáveis pela clivagem da celobiose em glicose, dessa forma elas controlam a velocidade global da reação de hidrólise do material celulósico. Isso porque as demais enzimas do complexo celulolítico sofrem repressão catabólica pelo produto final da hidrólise. Neste sentido, as beta-glicosidases não só produzem glicose a partir de celobiose, como também reduzem o efeito inibitório da celobiose permitindo a maior eficiência tanto das endo quanto das exoglucanases (PARRY et al., 2001).

Maeda et al., (2011), avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado utilizando oito misturas enzimáticas diferentes obtidas dos extratos enzimáticos brutos de *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma harzianum*, bem como, da combinação desses extratos com um coquetel enzimático comercial. Eles constataram que houve acúmulo de celobiose no hidrolisado obtido a partir do preparado enzimático comercial. Isso porque este preparado apresentou a menor proporção entre a atividade de FPase e beta-glicosidase (1:1), enquanto que os extratos enzimáticos brutos de *P. funiculosum* e *T. harzianum* apresentaram a proporção de 1:4,5 e 1:3,7, respectivamente.

A capacidade hidrolítica do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* também foi testada com relação à sacarificação do bagaço de cana pré-tratado. O material lignocelulósico na sua forma original é muito resistente a ataques microbianos, entretanto, a remoção da hemicelulose e lignina através do pré-tratamento, promove uma grande mudança nesse material, e poderia tornar a celulose mais acessível e consequentemente melhorar a hidrólise enzimática.

O extrato enzimático deste fungo foi escolhido por ter promovido a maior liberação de açúcares redutores nos ensaios anteriores. A fim de comparação, o ensaio também foi realizado com a enzima comercial. O valor de açúcares liberados em 24h de hidrólise, pela ação da enzima comercial 111,7 (mg/g peso seco), foi um pouco acima do valor encontrado para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* 71,3 (mg/g peso seco) (Fig. 27a). Quando comparada a hidrólise do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado, a quantidade de açúcares redutores liberados pela ação das enzimas do *Humicola grisea* var. *thermoidea* e da enzima comercial sobre o bagaço pré-tratado foram 3 e 4,5 vezes maiores do que os teores liberados pela ação das mesmas enzimas na hidrólise do bagaço *in natura* (Fig. 25a e 27a). Indicando que o pré-tratamento exerceu influência positiva na sacarificação enzimática do bagaço. O peso seco do bagaço de cana pré-tratado submetido a hidrólise enzimática não variou significativamente. Houve pequena redução no peso seco após 6h de ensaio independente da solução enzimática utilizada (Fig. 27b).

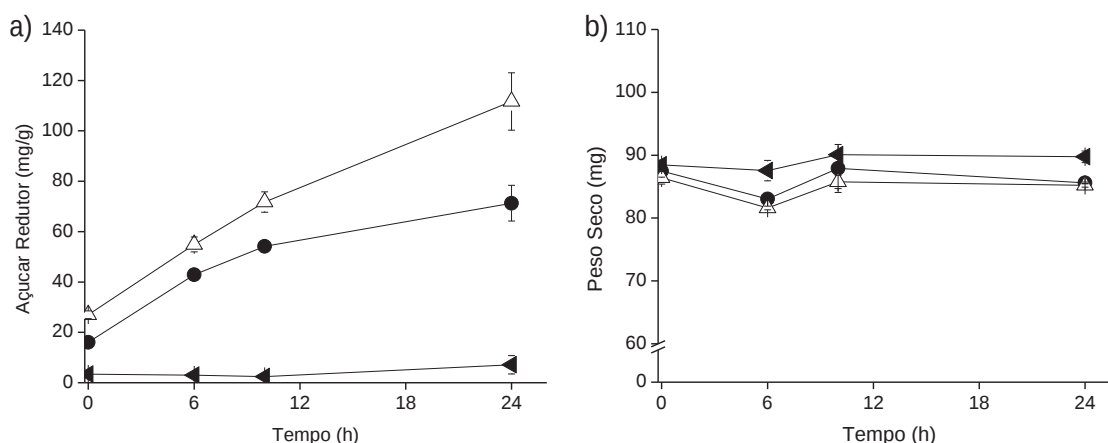


Figura 27: a) Liberação de açúcares redutores (mg/g peso seco) pela sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado. b) Peso seco do bagaço de cana pré-tratado após hidrólise enzimática. (●) Enzimas de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, (Δ) Enzima comercial, (◄) Controle usando água

Sukumaran et al., (2009) avaliaram o poder de hidrólise da solução enzimática bruta de *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus niger* MTCC 7956 sobre bagaço de cana e palha de arroz pré-tratados com álcali e obtiveram 890 (mg/g) e 1310 (mg/g) de açúcares redutores liberados por grama de biomassa tratada. Os valores de açúcares redutores foram menores (880 mg/g) e (550 mg/g) respectivamente, quando a biomassa tratada com ácido foi submetida aos mesmos preparados enzimáticos.

Liu et al., (2011), investigaram a hidrólise de palha de milho pré-tratada com 0,1 N HCl por 1 hora a 120°C em autoclave, pela ação da solução enzimática bruta de *Aspergillus fumigatus* Z5. O teor de açúcares redutores obtidos foi de 450 mg/g substrato seco.

Deswal et al., (2011) isolaram o fungo da podridão parda *Fomitopsis sp.* RCK2010 e usaram sua solução enzimática bruta para a hidrólise da palha de trigo e arroz pré-tratadas com álcali. Os teores de açúcares redutores liberados foram de 214 mg/g para a palha de trigo e 157 mg/g para a palha de arroz. Quando esses substratos foram tratados com ácido, a quantidade de açúcares liberados foi menor.

Os teores obtidos da liberação de açúcares pela ação das enzimas de *Chaetomium sp.* N13 e *Humicola grisea var. thermoidea* sobre o material lignocelulósico, são menores quando comparados com aqueles encontrados na literatura, entretanto, tal comparação é difícil pois a maioria dos relatos demonstram o rendimento da hidrólise pela porcentagem de celulose convertida à glicose. Dessa forma, novos estudos serão feitos a fim de definir a composição química dos substratos utilizados, para que os reais rendimentos da hidrólise sejam calculados.

Apesar dos resultados observados serem menores que os encontrados na literatura, os fungos apresentam um potencial hidrolítico bastante interessante quando comparados com a atuação da enzima comercial, principalmente o *Humicola grisea var. thermoidea*. Além disso, os resultados podem ser melhorados com a otimização das condições de ensaio.

Sharma et al., (2002) testaram várias condições para a hidrólise de talos de girassol pré-tratados por explosão a vapor, a partir da solução enzimática bruta de *Trichoderma reesei* Rut-C 30 NRRL 11460. A sacarificação enzimática máxima, que correspondeu a liberação de 436,6 mg/g de açúcares redutores por grama de substrato seco, foi observada nas seguintes condições, 5% (p/v) de substrato pré-tratado, celulasas de *T. reesei* Rut-C 30 (25 FPU/g), 50°C por 72h. Antes da otimização o teor de açúcares redutores liberado foi de 112,63 mg/g de substrato seco.

Os pesos secos das amostras de bagaço de cana *in natura*, palha de cana e bagaço de cana pré-tratado submetidos a sacarificação enzimática não variaram significativamente (Fig. 25b, 26b e 27b). A perda de massa do material lignocelulósico tem sido apontada como referência para a avaliação da ação das enzimas sobre o material lignocelulósico (Gueddes et al., 2010), entretanto, neste trabalho os dados não permitiram uma inferência sobre o potencial das enzimas testadas na sacarificação enzimática da biomassa em questão.

6. CONCLUSÕES

Os fungos *Chaetomium sp* N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foram capazes de produzir celulasas e hemicelulasas tanto em fermentação em estado sólido quanto em fermentação submersa.

A produção das enzimas foi fortemente influenciada pela fonte de carbono e tipo de processo fermentativo utilizado.

A FES mostrou-se mais eficiente para a produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase, enquanto que a FSm foi o melhor processo para a produção de avicelase no cultivo com *Chaetomium sp* N13 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. No cultivo com *Humicola grisea* var. *thermoidea* a FES mostrou-se mais eficiente para a produção de CMCase, avicelase e beta-glicosidase, enquanto que a FSm foi o melhor processo para a produção de xilanase.

Com relação à produção enzimática, o fungo *Chaetomium sp*. N13 apresentou a maior produção de xilanase. O *Humicola grisea* var. *thermoidea* apresentou bons resultados para as enzimas CMCase e avicelase, sendo um ótimo produtor de beta-glicosidase e, o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu baixas quantidades das enzimas em questão.

O reuso do material lignocelulósico em uma nova FES não foi considerado promissor, uma vez que, a produção enzimática com o material reutilizado foi menor do que o cultivo com o primeiro uso do material.

As soluções enzimáticas brutas secretadas por *Chaetomium sp*. N13 e *Humicola grisea* var. *thermoidea* foram capazes de hidrolisar a palha de cana e o bagaço de cana *in natura* e pré-tratado.

Estes resultados indicam a viabilidade da incorporação de fontes de carbono de baixo custo tais como bagaço de cana, farelo de trigo, cevada e palha de milho, no meio, para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas e, estimulam a continuação de novos estudos, visando a compreensão dos parâmetros envolvidos na sacarificação enzimática para a obtenção das melhores condições de ensaio, como temperatura, tempo, pH e relação enzima/ substrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

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

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. 1st. Academic press, 2011, p. 229-250.

CALADO, V. M. M.; DILLON, A. J. P.; SALGUEIRO, A. A. Produção de celulases por linhagens de *Humicola grisea* sob cultivo submerso. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 1, 2007.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 642-647, 2009.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2196-2204, 2007.

CARDONA, C. A.; QINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

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

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. **Bioresource Technology**, *in press*, 2009.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1462-1466, 2008.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p 8308-8314, 2010.

DA SILVA, R., YIN, D. K.; PARK, Y. K.; Application of thermostable xylanases from *Humicola sp.* For pulp improvement. **Journal Ferment Bioenergin**, v. 77, p. 109-111, 1994.

DAROIT, D. J.; SILVEIRA, S. T.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, p 904-908, 2007.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1695-1699, 2007.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCREIER, P. β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physic-chemical and biocatalytic properties. **Journal Agric. Food Chemistry**, v. 48, p. 4929-4936, 2000.

DE-PAULA, E. H., RAMOS, L. P.; AZEVEDO, M. D. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 35-41, 1999.

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

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 404-411, 2009.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of

lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457-462, 2008.

ERIKSSON, K. E. L.; BERMEK, H. In: Lignin, lignocelluloses, ligninase. **Applied Microbiology: Industrial**, p. 373-384, 2009.

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.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valorization**, v. 1, p. 65-76, 2010.

GAMEZ, S., GONZALES-CABRIALES, J. J.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G.; VASQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

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.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; BOLADO, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G. Chemical Oxidation with Ozone as Pre-treatment of Lignocellulosic Materials for Bioethanol Production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 21, 2010.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1608–1613, 2009.

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.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GUEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G. MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Optimizing the saccharification of cane

bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal celulasases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1851-1857, 2010.

HEBEISH, A.; HASHEM, M.; SHAKER, N.; RAMADAN, M; EL-SADEK, B. Effect of post-and pré-crosslinking of cotton fabrics on the efficiency of biofinishing with cellulose enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p 953-960, 2009.

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

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology Biotechnolgy**, v. 19, p. 263-268, 2003.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanases production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

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

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

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

KATAPODIS, P.; CHRISTAPOULOU, V; KEKOS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p 136-141, 2007.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1515-1523, 2009.

KO, J. K.; BAK, J. S.; JUNG, M.W.; LEE, H. J.; CHOI, I.; KIM, T. H. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4374-4380, 2009.

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

LI, D.-C.; LU, M.; LI, Y.-L.; LU, J. Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 932-937, 2003.

LI, H.; KIM, N.; JIANG, M.; KANG, J. W.; CHANG, H. N. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3245-3251, 2009.

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

LUCENA-NETO; S. A.; FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola* grisea var. *Thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 86-90, 2004.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p. 506-577, 2002.

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

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196-1201, 2011.

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

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R. B.; WALDRON, K. W.; FAULDS, C. B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces*

stipitatus and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5130–5133, 2008.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1581–1586, 2011.

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

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

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

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.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grow on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 37–45, 2003.

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

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 54–59, 2007.

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

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources Conservation & Recycling**, 2006, *in press*.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 61-66, 2010.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J.; GONZÁLEZ, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 244-250, 1999.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 160–166, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

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

SCHOBER, G.; TRÖSCH, W. Degradation of digestion residues by lignolytic fungi. **Wat. Res.**, v. 34, n. 13, p. 3424-3430, 2000.

SHARMA, S. K.; KALRA, K. L.; GREWAL, H. S.; Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 237-243, 2002.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, *in press*, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARANA, 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.

SINGHVI, M.S., ADSUL, M.G., GOKHALE, D.V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of avicel and cellulose, **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.014.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 06, 2009.

SOMOGY-NELSON, N. A. A photometric adaptation of somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 135, p. 136-175, 1944.

SONI, R.; SANDHU, D. K.; SONI, S.K. Localisation and optimisation of cellulase production in *Chaetomium erraticum*. **Journal of Biotechnology**, v 73, p. 43–51, 1999.

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

SUN, F.; CHEN, H. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6156–6161, 2008.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 4, p. 707-738, 2007.

VIDAL, P.F., MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, v. 16, p. 1–17, 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.

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

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

XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5427-5435, 2008.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; RODERICK I. MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Chapter 1. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, 2010.

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

ZHOU, J.; WANG, Y.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; YING, P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T100-14. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6826-6833, 2008.

8. APÊNDICE

Substratos mais favoráveis para a produção enzimática

Chaetomium sp. N13

Tempo	Xilanase		CMCase		Avicelase		Beta-Glicosidase	
	C+FT (9:1)	B+FT (1:1)	C+FT (9:1)	B+FT (1:1)	PM+FT (9:1)	PM+C (9:1)	B+FT (1:9)	FT
48h	277,1 ± 217,3	202,7 ± 54,9	31,2 ± 25,3	35,7 ± 3,0	7,4 ± 0,0	6,3 ± 2,3	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2
96h	744,1 ± 32,1	778,4 ± 85,8	56,1 ± 2,9	63,9 ± 10,4	11,0 ± 0,2	9,0 ± 4,5	3,2 ± 0,5	2,1 ± 0,2
144h	1392,8 ± 76,9	765,2 ± 38,0	80,9 ± 1,2	83,9 ± 6,9	12,7 ± 4,9	4,9 ± 7,0	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3
192h	1483,7 ± 34,3	917,9 ± 342,7	138,4 ± 32,4	192,1 ± 42,4	7,1 ± 0,7	6,4 ± 9,1	7,9 ± 1,9	4,0 ± 0,9
240h	1379,5 ± 7,0	1569,4 ± 46,0	140,1 ± 3,8	86,2 ± 5,7	10,6 ± 1,9	4,5 ± 6,4	13,9 ± 0,6	7,9 ± 0,4
288h	932,3 ± 14,8	525,8 ± 15,0	145, ± 9,2	58,2 ± 17,4	4,2 ± 0,1	9,2 ± 2,5	6,6 ± 2,6	6,4 ± 0,4
336h	968,3 ± 302,8	443,6 ± 20,0	145,2 ± 35,5	68,9 ± 13,4	10,5 ± 0,5	9,4 ± 7,2	10,4 ± 7,2	7,9 ± 0,9

Humicola grisea var. *thermoidae*

Tempo	Xylanase		CMCase		Avicelase		Beta-Glicosidase	
	B+FT (1:1)	B+FT (1:9)	B+FT (1:1)	B+FT (1:9)	C+FT (9:1)	B+FT (1:1)	B+FT (1:1)	B+FT (1:9)
48h	54,3 ± 17,8	70,3 ± 3,6	41,7 ± 6,0	33,7 ± 2,2	13,1 ± 2,9	16,1 ± 0,9	20,6 ± 3,6	13,4 ± 5,2
96h	108,9 ± 90,1	127,7 ± 4,3	66,8 ± 33,2	61,2 ± 11,7	14,4 ± 3,5	11,8 ± 1,2	38,1 ± 6,9	28,3 ± 17,7
144h	155,3 ± 95,2	178,0 ± 62,7	102,5 ± 57,8	75,5 ± 17,3	16,1 ± 1,3	9,7 ± 0,7	44,3 ± 18,4	45,9 ± 2,4
92h	184,5 ± 41,5	89,3 ± 4,6	151,0 ± 18,3	69,0 ± 2,9	18,1 ± 5,7	13,0 ± 2,0	60 ± 14,1	55,8 ± 12,9
240h	167,1 ± 5,6	73,9 ± 1,5	232,2 ± 3,9	64,7 ± 7,1	16,7 ± 2,4	7,6 ± 0,4	116,4 ± 13,3	87,7 ± 17,0
288h	293,4 ± 12,3	175,4 ± 34,2	194,2 ± 0,0	89,5 ± 15,2	17,2 ± 0,7	8,2 ± 0,1	94 ± 27,7	124,9 ± 37,5
336h	212,6 ± 28,3	76,1 ± 11,5	216,8 ± 26,8	81,7 ± 6,3	10,3 ± 3,2	8,1 ± 4,0	96,7 ± 13,8	90 ± 31,8
								123,1 ± 29,4

Thermomucor indiciae *seudaticae* N31

Tempo	Xylanase		CMCase		Avicelase		Beta-Glicosidase	
	FT	B+FT (1:9)	B+FT (1:9)	FT	B+FT (1:1)	C+ FT (9:1)	B+FT (1:9)	FT
48h	7,1 ± 1,6	7,3 ± 0,6	8,3 ± 1,2	7,7 ± 0,0	11,1 ± 3,4	7,6 ± 4,0	4,5 ± 1,0	4,2 ± 0,9
96h	9,5 ± 2,6	5,3 ± 3,4	7,7 ± 2,8	8,6 ± 1,2	5,8 ± 1,5	9,5 ± 0,4	14,8 ± 2,6	16,4 ± 1,1
144h	8,0 ± 2,0	10,3 ± 0,0	11,5 ± 3,0	13,6 ± 1,5	8,8 ± 1,9	14,4 ± 2,3	26,7 ± 2,5	31,7 ± 0,9
192h	13,5 ± 6,8	7,1 ± 0,2	20,1 ± 6,2	19,5 ± 9,6	4,9 ± 0,2	5,7 ± 1,2	16,0 ± 3,2	35,5 ± 5,6
240h	9,4 ± 4,6	10,1 ± 5,8	18,0 ± 0,8	17,0 ± 3,9	7,9 ± 4,5	8,7 ± 5,5	36,1 ± 4,1	30,0 ± 4,6
288h	5,6 ± 1,4	6,3 ± 0,5	15,5 ± 1,5	13,2 ± 0,5	6,2 ± 1,9	9,2 ± 2,8	33,8 ± 1,0	32,8 ± 14,0
336h	4,4 ± 0,2	6,1 ± 0,0	15,2 ± 3,3	17,1 ± 2,1	5,7 ± 1,3	7,5 ± 2,8	42,8 ± 4,7	46,7 ± 18,7