

Josiani de Cassia Pereira

**Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes
produtores de celulasas e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na
sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Aplicada 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 São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins

Co-orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto – SP

2013

Pereira, Josiani de Cassia.

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/
termotolerantes produtores de celulasas e xilanases e aplicação dos extratos
enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar / Josiani de
Cassia Pereira. -- São José do Rio Preto, 2013

121 f. : il., tabs.

Orientador: Daniela Alonso Bocchini Martins

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

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações
industriais. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Bagaço de cana –
Microbiologia. 5. Lignocelulose. I. Martins, Daniela Alonso Bocchini. II.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

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

Josiani de Cássia Pereira

Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/
termotolerantes produtores de celulases e xilanases e
aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de
cana-de-açúcar

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.

Comissão Examinadora



Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini Martins
UNESP – Araraquara
Orientadora



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
USP – Ribeirão Preto



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

São José do Rio Preto
Novembro de 2013

Sumário

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	10
Resumo	11
Abstract.....	12
INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO I.....	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. Lignocelulose	16
1.1.Celulose	17
1.2.Hemicelulose	18
1.3.Lignina.....	20
2. Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico microbianos	22
3. Fermentação em estado sólido (FES).....	24
4. Uso de resíduos lignocelulósicos como substratos para produção de enzimas por fungos filamentosos por FES	26
4.1. Bagaço de cana-de-açúcar	28
5. Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar	29
6. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	29
7. Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO II	35
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE CELULASES E XILANASES E ESTUDOS DAS ENZIMAS.....	35
Resumo.....	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Meios nutrientes.....	38
2.2. Isolamento dos fungos filamentosos.....	39
2.3. Avaliação da influência da temperatura sobre o crescimento dos isolados.....	40
2.4. Avaliação qualitativa da produção de celulases e xilanases	40
2.5. Pré-inóculos para as fermentações em estado sólido.....	41
2.6. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido.....	41
2.7. Determinação das atividades enzimáticas	41
2.8. Caracterização físico-química das enzimas	43
2.9. Identificação do isolado selecionado	44

3. Resultados e discussão	44
3.1. Isolamento dos fungos	44
JCP 4-1.....	45
3.2. Avaliação qualitativa da produção das enzimas pelo uso do Vermelho Congo	46
3.3. Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas e pré-seleção dos melhores produtores	47
3.4. Avaliação influência da temperatura no crescimento dos isolados pré-selecionados	51
3.5. Avaliação da influência de diferentes substratos lignocelulósicos na produção das enzimas pelos isolados pré-selecionados	53
3.6. Influência do tempo de cultivo na produção das enzimas	57
3.7. Caracterização físico-química das enzimas	63
4. Conclusões.....	77
5. Referências bibliográficas	78

CAPÍTULO III.....90

Avaliação da influência do pré-tratamento com glicerol e explosão a vapor na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato enzimático produzido por *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4.....90

1. Introdução.....	91
2. Material e métodos	92
2.1. Bagaço de cana-de-açúcar	92
2.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	92
2.3. Caracterização bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	92
2.5. Micro-organismo	92
2.6. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES)	93
2.7. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	93
2.8. Análise açúcares, alcoóis e inibidores por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	93
3. Resultados e discussão	94
3.1. Caracterização do Bagaço de cana <i>in natura</i> e tratado com glicerol e explosão à vapor	94
3.2. Sacarificação do bagaço pré-tratado com glicerol e explosão a vapor utilizando extrato enzimático de <i>Miceliophthora thermophila</i> JCP 1-4.....	95
3.3. Análise das atividades enzimáticas de Fpase e β -glicosidase depois das hidrólises enzimáticas utilizando bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão a vapor	97
4. Conclusões.....	99
5. Referências Bibliográficas	100

Lista de figuras

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal. FONTE: adaptado de Kondo (1997).....	6
Figura 2. Estrutura representativa das cadeias de celulose. FONTE: adaptado de Festucci-Buselli; Otoni; Joshi (2007).....	7
Figura 3. Organização estrutural da fibra de celulose. Adaptado de Jones; Bartlett (2013).....	8
Figura 4. Esquema representativo da estrutura de <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Ac: grupo acetil; α -4- <i>O</i> -Me-GlcA: ácido α -4- <i>O</i> -metilglucurônico. FONTE: Sunna; Antranikian (1997).....	9
Figura 5. Estrutura de arabino 4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana presente em madeiras macias. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. α -araf: arabinofuranose; α -4- <i>O</i> -Me-GlcA: ácido α -4- <i>O</i> -metilglucurônico. FONTE: Sunna; Antranikian (1997).....	10
Figura 6. Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter β - <i>O</i> -4. FONTE: adaptado de Anke; Weber (2006).....	11
Figura 7. Os fenilpropanóides constituintes da lignina. FONTE: Adaptado de Onnerud et al. (2002).....	11
Figura 8. Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano. Os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas são mostrados, além de um caminho alternativo de formação de sofrose pela atividade de transglicosilação de β -glicosidase. FONTE: adaptado de Aro et al. (2005).....	13
Figura 9. Representação esquemática do sistema xilanolítico microbiana (exemplo de degradação da arabinoxilana). FONTE: Aro et al. (2005).....	14
Figura 10. Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorrem durante a FES. Gás (g); líquido (l); substrato (s); calor (Q); temperatura (T). FONTE: adaptado de Hölker; Lenz (2005).....	15

CAPÍTULO II

Figura 1. Avaliação qualitativa da produção de endoglucanase pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b).....	44
Figura 2. Crescimento dos isolados pré-selecionados sob diferentes temperaturas. (a) JCP 1-4; (b) JCP 1-9; (c) JCP 1-15; (d) JCP 1-17; (e) JCP 5-1; (f) DABM 11/45.....	49
Figura 3. Produção de celulases e xilanases pelo isolado DABM 11/45, por FES, em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p), a 45 e 50°C, em 96h.....	51
Figura 4. Produção de celulases pelos isolados pré-selecionados: endoglucanase (a), β -glicosidase (b), avicelase (c) e FPase (d). Triagem inicial em bagaço de cana e farelo de trigo (BC+FT) e demais cultivos em bagaço de cana e farelo de soja (BC+FS), bagaço de cana e aveia (BC+A) e bagaço de cana submetido à explosão a vapor e farelo de trigo (BE+FT). Todas as misturas foram utilizadas na proporção 1:1 (p/p) e os cultivos foram mantidos por 96h, como descrito no item 3.6.....	54
Figura 5. Produção de xilanases pelos isolados pré-selecionados: endoxilanase (a) e β -xilidase (b). Triagem inicial em bagaço de cana e farelo de trigo (BC+FT) e demais cultivos em bagaço de cana e farelo de soja (BC+FS), bagaço de cana e aveia (BC+A) e bagaço de cana submetido à explosão a vapor e farelo de trigo (BE+FT). Todas as misturas foram utilizadas na proporção 1:1 (p/p) e os cultivos foram mantidos por 96h, como descrito no item 3.6.....	55
Figura 6. Perfil de produção de endoglucanase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em mistura de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.....	56
Figura 7. Produção de β -glicosidase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.....	57
Figura 8. Produção de avicelase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo.....	57
Figura 9. Perfil de produção de FPase ao longo do tempo pelo isolado JCP 1-4, por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.....	58
Figura 10. Produção de xilanase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.....	59
Figura 11. Perfil de produção de β -xilidase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.....	60

Figura 12. Influência do pH sobre as atividades de endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase do fungo JCP 1-4 (d).....	62
Figura 13. Influência da temperatura sobre as atividades de endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase do fungo JCP 1-4 (d).....	63
Figura 14. Condições de estabilidade sob pH da endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase (c) e avicelase (d) do fungo JCP 1-4 (c).....	64
Figura 15. Condições de termoestabilidade da endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase (d).....	65
Figura 16. Efeito da glicose (a) e etanol (b) sobre as atividades de β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45.....	70
Figura 17. Regressão linear do plote de Ln da U/ml residual pelo tempo de incubação, a 65°C, 67,5°C e 70°C para endoglucanase (a) e β -glicosidase (b) e a 90°C, 92,5°C e 95°C para avicelase (c), para a determinação do Kd.....	72
Figura 18. Atividade residual das enzimas endoglucanase (a), β -glicosidase (b) e avicelase (c) em função do tempo de incubação.....	74
Figura 19. Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das enzimas endoglucanase (a), β -glicosidase (b) e avicelase (c).....	75

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Conteúdo de lignina, celulose e xilana no bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol (a) e explosão à vapor (b). LAI : Lignina ácida insolúvel. LAS: Lignina ácida solúvel. LT: Ligninas totais.....131
- Figura 2.** Rendimentos (%) na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e com explosão à vapor na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose.....133
- Figura 3.** Atividades enzimáticas de Fpase e β -glicosidase após hidrólise com bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão à vapor. BG = Bagaço com glicerol, BE = Bagaço explodido.....135

Lista de tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos utilizando-se resíduos lignocelulósicos como substratos.....	17
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Dados sobre o isolamento dos fungos filamentosos termofílicos.....	43
Tabela 2. Produção de celulasas e xilanases pelos isolados.....	46
Tabela 3. Produções máximas de celulasas e xilanases obtidas pelo cultivo dos isolados pré-selecionados em diferentes misturas de substratos, por FES, em 96h.....	52
Tabela 4. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.....	66
Tabela 5. Constante de termoinativação e tempo de meia vida para endoglucanase, β -glicosidase e avicelase em diferentes temperaturas de incubação.....	73

CAPÍTULO III

Tabela 1. Quantidades de compostos fenólicos totais no bagaço de cana in natura e pré-tratado com glicerol.....	132
Tabela 2. Liberação de glicose e xilose durante a sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão à vapor. BC = Bagaço de Cana.....	132
Tabela 3. Dados na literatura em relação aos rendimentos (%) na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e com explosão à vapor na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose.....	134

Resumo

Devido à ampliação das aplicações industriais das celulasas e hemicelulasas, é crescente o interesse na produção destas enzimas por micro-organismos através de processos que promovam altos rendimentos a baixo custo. Assim, o cultivo de fungos filamentosos por fermentação em estado sólido (FES) utilizando-se resíduos lignocelulósicos como substratos tem sido frequentemente citado na literatura. Os fungos termofílicos tem se destacado neste sentido, por produzirem enzimas geralmente mais ativas e estáveis sob altas temperaturas, uma vantagem do ponto de vista das aplicações industriais. No presente trabalho, foram isolados 32 fungos termofílicos do ambiente a partir de amostras de silagem, compostagem e outros materiais orgânicos. Uma triagem inicial dos melhores produtores foi feita pelo cultivo dos isolados, por FES, em mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 p/p) como substratos, por 96h. A partir destes cultivos foram pré-selecionados 7 isolados, os quais foram então cultivados por FES em diferentes misturas de resíduos agro-industriais, por 96h, a fim de se avaliar a influência dos mesmos na produção das enzimas, buscando-se maiores rendimentos. Foram então selecionados para dar continuidade ao trabalho os isolados que mais se destacaram na produção das enzimas: *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 (endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e avicelase) e DABM 11/45 (β -glicosidase, xilanase e avicelase). A influência do tempo de cultivo na produção das enzimas pelos dois isolados selecionados foi avaliada e as enzimas foram caracterizadas físico-quimicamente. O extrato enzimático produzido por *M. thermophila*, por FES, em mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja (1:1 p/p) foi utilizado para a sacarificação de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado glicerol e explosão à vapor. Os bagaços *in natura* e pré-tratados foram caracterizados quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina. As atividades enzimáticas foram monitoradas durante os experimentos de sacarificação do bagaço pré-tratado, observando-se um aumento nas atividades enzimáticas ao longo das sacarificações.

Abstract

Due to the expansion of industrial applications of cellulases and hemicellulases, there is increasing interest in the production of these enzymes by micro-organisms through processes that promote high yields at low cost. Thus, the cultivation of filamentous fungi by solid state fermentation (SSF) using lignocellulose residues as substrates has been frequently cited in the literature. The thermophilic fungi has excelled in this regard, since they produce enzymes usually more active and stable under high temperatures, an advantage from the point of view of industrial applications. In this work, 32 thermophilic fungi were isolated from the environment, from samples of silage, composting and other organic materials. An initial screening of the best producers was made by cultivation of isolates, by SSF, in a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran (1:1 w/w) as substrates, for 96h. From these cultivations 7 isolates were pre-selected, which were then cultured by SSF in different mixtures of agro-industrial residues, for 96h, in order to assess the influence of these substrates in enzymes production, seeking higher yields. Then, were selected to give continuity to the work the isolates that stood out in the production of enzymes: *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 (endoglucanase, β -glucosidase, xylanase and avicelase) and DABM 11/45 (β -glucosidase, xylanase and avicelase). The influence of the time on the enzymes production by the two selected isolates was assessed and the enzymes were characterized physico-chemically. The enzymatic extract produced by *M. thermophila*, by FES, in a mixture of sugar cane bagasse and soybean meal (1:1 w/w) was used for the saccharification of *in natura* and pre-treated glycerol and steam exploded sugarcane bagasse. The *in natura* and pre-treated bagasse were characterized regarding the content of cellulose, hemicellulose and lignin. The enzymatic extract produced by newly isolated fungus *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 was shown to be as efficient as the commercial enzymes in the releasing of glucose from the pre-treated bagasse. The enzymes activities were monitored during the experiments of pre-treated bagasse saccharifications, and it was observed an increase on the enzymatic activities during saccharifications.

INTRODUÇÃO

O uso de resíduos lignocelulósicos (agroindustriais, florestais e urbanos) em bioprocessos tem despertado grande interesse científico nos últimos anos. A utilização destes materiais como substratos para o cultivo de micro-organismos, visando a produção de ácidos orgânicos, etanol, cogumelos, metabólitos secundários biologicamente importantes, enzimas e biocombustíveis tem sido reportada e representa uma alternativa para redução de custos de produção, bem como para os problemas causados pelo seu descarte no ambiente (REDDY et al., 2003; SÁNCHEZ, 2009).

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte de lignocelulose, sendo excelentes substratos para o cultivo de fungos por fermentação em estado sólido (FES), visando a produção de enzimas xilanolíticas, celulolíticas e ligninolíticas, bem como de outras enzimas de degradação de material vegetal (GAO et al., 2013; SILVA et al., 2005; LEITE et al., 2008). Entre os diversos resíduos empregados para esta finalidade podem ser citados bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, sabugo e palha de milho, palha e casca de arroz, farelo de soja, cevada e casca de café, entre outros (SÁNCHEZ 2009). Estes resíduos são abundantes no Brasil, especialmente o bagaço de cana-de-açúcar, constantemente gerado em grande volume pela indústria sucroalcooleira. Os fungos filamentosos são os melhores produtores de enzimas de degradação de material lignocelulósico e a busca por novas linhagens com alto potencial de produção destas enzimas é de grande interesse biotecnológico, não apenas para obtenção de biocatalisadores que apresentem características adequadas aos processos industriais aos quais se destinam, mas também para o conhecimento e exploração da biodiversidade microbiana.

Celulases, xilanases e ligninases de origem microbiana são enzimas que apresentam potencial para aplicação em diversos processos biotecnológicos (BHATIA et al., 2002). O uso destas enzimas em processos de desestruturação e hidrólise do bagaço de cana para obtenção de açúcares fermentescíveis (especialmente a glicose, proveniente da celulose) tem se destacado nos últimos anos como uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração (SINGHANIA et al., 2009; LIU et al., 2011). Contudo, para a obtenção de maiores rendimentos na sacarificação, uma etapa de pré-tratamento é necessária, visando a desorganização/remoção da lignina e da hemicelulase, facilitando assim o acesso das celulases às fibras de celulose e, conseqüentemente, aumentando o rendimento em glicose.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou o isolamento de fungos termofílicos/termotolerantes a partir do ambiente, a avaliação da produção de celulases e xilanases pelos fungos isolados, por FES, utilizando-se misturas de materiais lignocelulósicos como substratos, a caracterização físico-química das enzimas produzidas pelos fungos selecionados, o pré-tratamento do bagaço de cana com glicerol e bagaço explodido e a sacarificação do bagaço de

cana-de-açúcar utilizando-se extrato enzimático do fungo selecionado *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 ou enzimas comerciais.

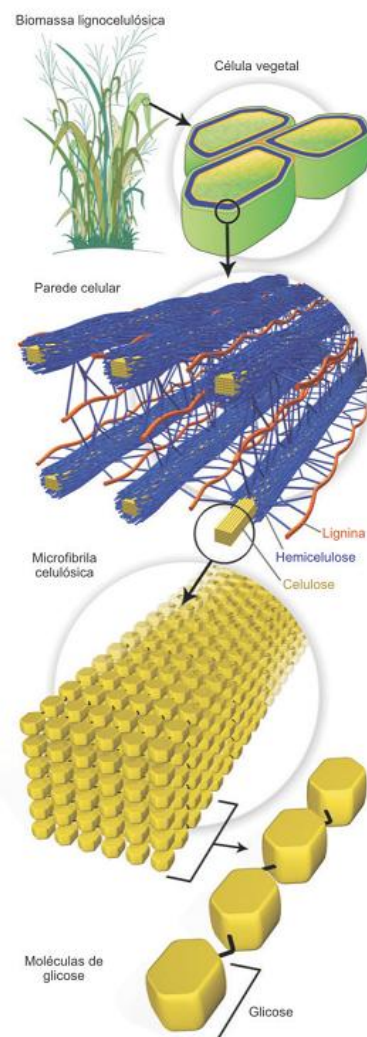
CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Lignocelulose

Na parede celular de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão embebidas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose. Estes três tipos de polímeros ligam-se fortemente uns aos outros por forças não covalentes, bem como por ligações covalentes, compondo o material conhecido como lignocelulose, o qual representa mais de 90% do peso seco da célula vegetal (Figura 1). A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie, a época de colheita do vegetal e, ainda, entre as diferentes partes de um mesmo vegetal (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal. FONTE: adaptado de Kondo (1997).

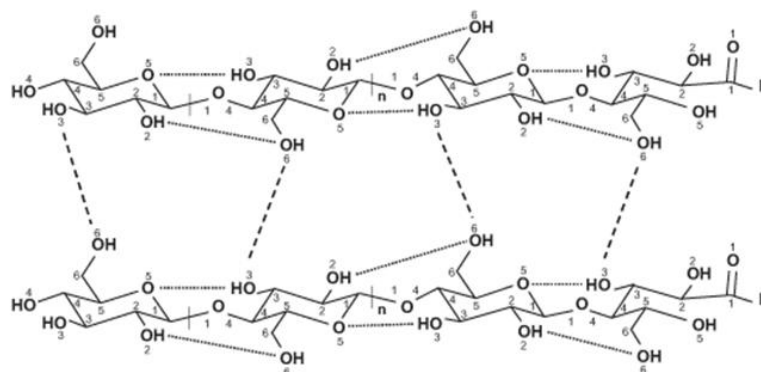


1.1. Celulose

A parede celular dos vegetais é constituída principalmente por celulose, polímero responsável pela resistência à pressão osmótica observada tanto nas células de frutas e hortaliças quanto nas de plantas de porte superior, portanto intimamente relacionado com a sustentação. A celulose constitui cerca de 40% da biomassa vegetal e é consequentemente o mais abundante polímero natural na Terra (YEOMAN et al., 2010).

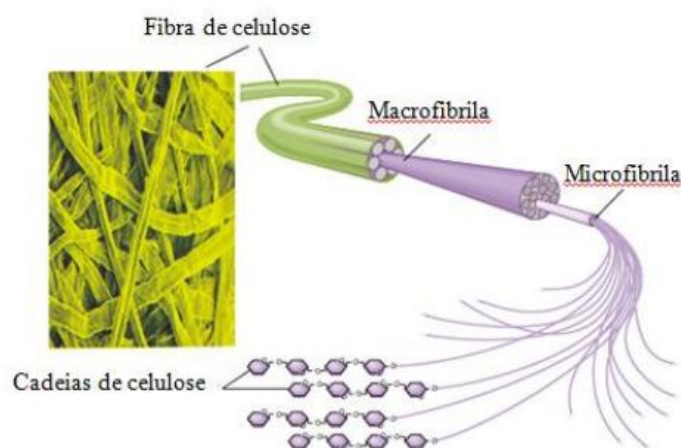
A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glicose unidos por ligações β -1,4, com orientações alternativas (BADHAN et al., 2007); YEOMAN et al., 2010). Cada molécula de glicose relaciona-se com a seguinte por uma rotação de 180 graus, e o átomo de oxigênio do anel estabelece uma ligação de hidrogênio com o grupamento 3-OH da molécula seguinte (Figura 2) .

Figura 2. Estrutura representativa das cadeias de celulose. FONTE: adaptado de Festucci-Buselli;Otoni; Joshi (2007).



A conformação β permite que a celulose forme cadeias lineares extensas. Várias cadeias dispostas paralelamente e interligadas por ligações de hidrogênio formam as microfibrilas. As microfibrilas organizam-se em macrofibrilas as quais, por sua vez, constituem as fibras de celulose (Figura 3).

Figura 3. Organização estrutural da fibra de celulose. Adaptado de Jones; Bartlett (2013).



As fibras apresentam regiões cristalinas e amorfas. Nas regiões cristalinas, as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares estão altamente organizadas e coesas, o que dificulta o acesso de enzimas e moléculas de água (STRYER, 1995; VOUTILAINEN et al., 2007). Além da cristalinidade, o fato da celulose estar intimamente associada com moléculas de hemicelulose, pectina e lignina também dificulta o acesso de enzimas a este substrato (VIGNON et al., 2004; ZYKWINSKAET et al., 2007; POPPER; FRY, 2008)

1.2. Hemicelulose

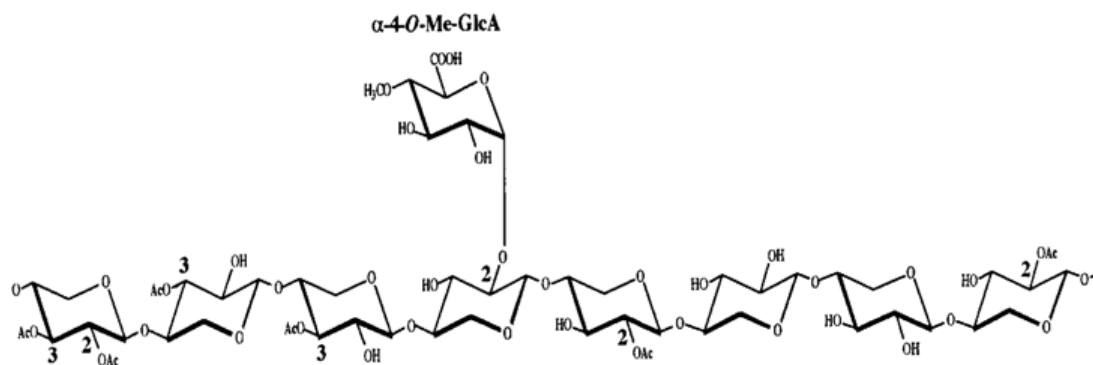
A hemicelulose constitui uma classe de polímeros heterogêneos representando cerca de 15-35% da biomassa vegetal, tendo como açúcares constituintes as pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metil-galacturônico e ácido α -D-galacturônico). Outros açúcares também podem estar presentes como α -L-raminose e α -L-fucose, porém em menores quantidades e com seus grupos hidroxil possivelmente substituídos por grupos acetil (GÍRIO et al., 2010).

1.2.1. Xilanas

Dentre as hemiceluloses, as mais relevantes são as xilanas e glucomananas, sendo que as xilanas são as mais abundantes. As xilanas são os principais componentes da parede celular secundária, constituindo cerca de 20-30% da biomassa de plantas herbáceas e lenhosas. São consideradas o segundo recurso natural mais abundante, podendo ser bioconvertido em produtos úteis (KNOB; CARMONA, 2009). Além disso, xilanas podem compor até 50% de alguns tecidos de gramíneas e cereais (EBRINGEROVÁ et al., 2005).

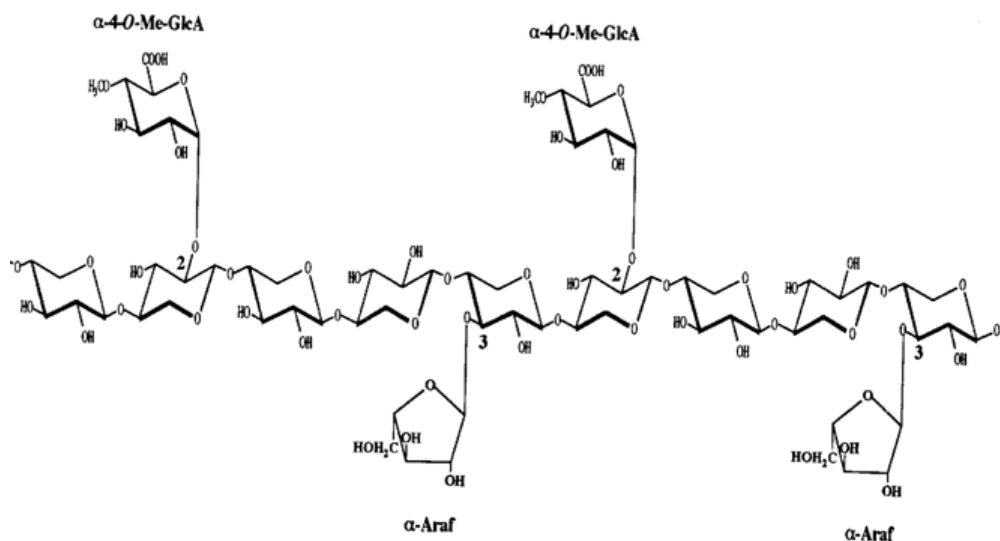
Este complexo heteropolissacarídeo consiste em unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações β -1,4 podendo apresentar várias substituições (KNOB; CARMONA, 2009). As xilanas encontradas em madeiras duras (angiospermas como eucalipto e carvalho) (15-30% do peso total) são *O*-acetil-4-*O*-metil-glucuronoxilanas altamente acetiladas (Figura 4). A presença desses grupos acetil é responsável pela solubilidade parcial da xilana em água (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Figura 4. Esquema representativo da estrutura de *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Ac: grupo acetil; α -4-*O*-Me-GlcA: ácido α -4-*O*-metilglucurônico. FONTE: Sunna; Antranikian (1997).



Madeiras macias (gimnospermas como pinho e cedro), gramíneas e cereais são compostas por arabino-4-*O*- metil-glucuronoxilanas (7-12% do peso seco total), as quais contêm unidades de α -L-arabinofuranosil ao invés de grupos acetil (Figura 5) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; WHISTLER; RICHARDS, 1970; WONG; TAN; SADDLER, 1988).

Figura 5. Estrutura de arabino 4-*O*-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. α -araf: arabinofuranose; α -4-*O*-Me-GlcA: ácido α -4-*O*-metilglucurônico. FONTE: Sunna; Antranikian (1997).



1.3. Lignina

A lignina é um dos polímeros mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose, constituindo-se de um polímero fenilpropanóide amorfo composto por unidades de álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figuras 6 e 7), interconectadas por ligações carbono/carbono e éter biologicamente estáveis (BOURBONNAIS; PAICE, 1988; HIGUCHI, 2004).

Figura 6. Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter β -O-4. FONTE: adaptado de Anke; Weber (2006).

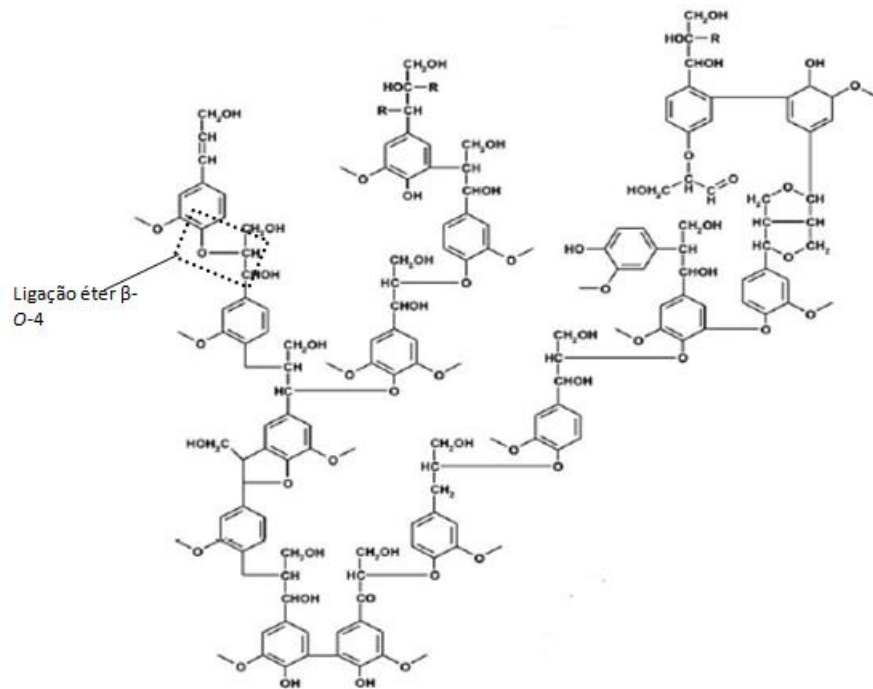
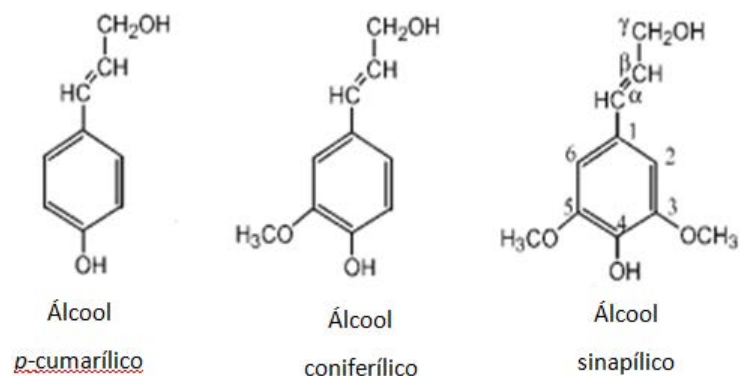


Figura 7. Os fenilpropanóides constituintes da lignina. FONTE: Adaptado de Onnerud et al. (2002).



Entre as funções biológicas da lignina destacam-se: dar rigidez e força à parede celular secundária das plantas vasculares; conferir hidrofobicidade à parede celular (o que permite maior eficiência no transporte de água pelos tecidos vasculares das plantas) e dificultar o ataque

microbiano aos tecidos do vegetal, pois torna-os tão compactos que dificulta a penetração de macromoléculas como enzimas hidrolíticas (ÖNNERUD et al., 2002).

A lignina é um polímero de difícil degradação, pois suas ligações não são hidrolisáveis sob condições biológicas. As estruturas predominantes, perfazendo quase metade do seu total, são as de éter com ligação β -O-4. Já foi claramente demonstrado que a lignina é racêmica e, conseqüentemente, mesmo um simples dímero com ligação β -O-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de sub-unidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas definidas (HAMMEL; CULLEN, 2008).

2. Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico microbianos

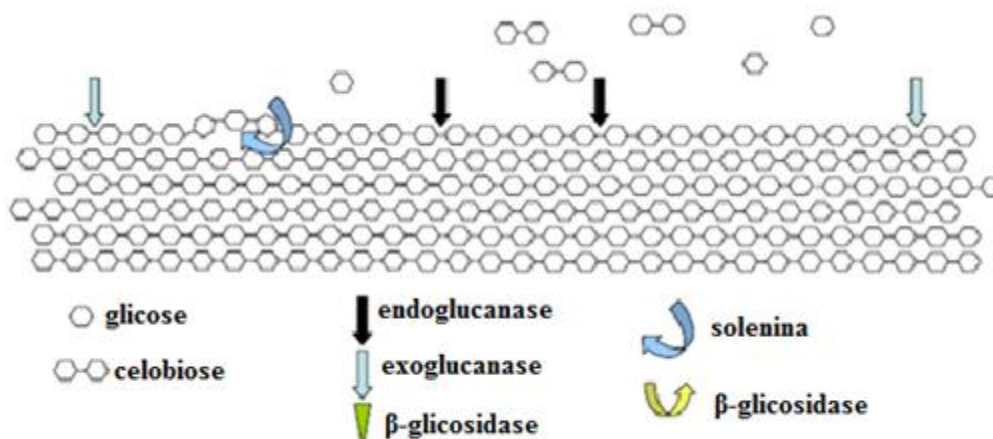
A hidrólise da celulose envolve a ação sinérgica de várias enzimas, específicas para diferentes sítios da molécula (Figura 8):

- endoglucanases (EG, endo-1,4- β -D-glico-4-glicanohidrolases, EC 3.2.1.4): responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose, hidrolisam randomicamente as ligações internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. A endoglucanase é responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, diminuindo seu GP devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010);

- exoglucanases ou celobiohidrolases ou avicelases (CBH, 1,4- β -D-glico-celobiodehidrolases, EC 3.2.1.91): atuam nas extremidades redutoras e não redutoras das regiões cristalinas, preferencialmente, liberando celobiose (WOOD; BHAT, 1988; TEERI et al., 1998). O ataque às regiões amorfas ocorre de forma lenta (VOUTILAINEN, 2011);

- β -glicosidases (EC 3.2.1.21): hidrolisam celobiose e outros celooligossacarídeos solúveis em glicose (DA-SILVA et al., 1997; PALMA-FERNANDEZ, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; BANSAL et al., 2012), tornando-se o fator limitante na regulação de todo o processo de degradação da celulose YEOMAN et al., 2010).

Figura 8. Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano. Os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas são mostrados, além de um caminho alternativo de formação de sofrose pela atividade de transglicosilação de β -glicosidase. FONTE: adaptado de Aro et al. (2005).



Em relação à hemicelulose, a hidrólise dos heteropolissacarídeos constituintes também requer a ação sinérgica de várias enzimas, incluindo aquelas que atuam nas cadeias laterais dos polímeros (Figura 9):

- *xilanases* (Endo-1,4- β -D-xilanases, EC 3.2.1.8): catalisam a hidrólise das ligações 1,4- β -D-xilosídicas de maneira aleatória, xilooligossacarídeos e xilobiose, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo (KOLENOVA et al., 2006; MASLEN et al., 2007; DODD; CANN, 2009);

- *β-xilosidases* (1,4- β -D-xilosidases EC 3.2.1.37): catalisam a clivagem de xilobiose e atacam as extremidades não redutoras em pequenos xilooligossacarídeos, liberando xilose (SORENSEN et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2006). São importantes na degradação da xilana por remover produtos finais que poderiam inibir as endoxilanases e, com isso, limitar a hidrólise do polissacarídeo (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

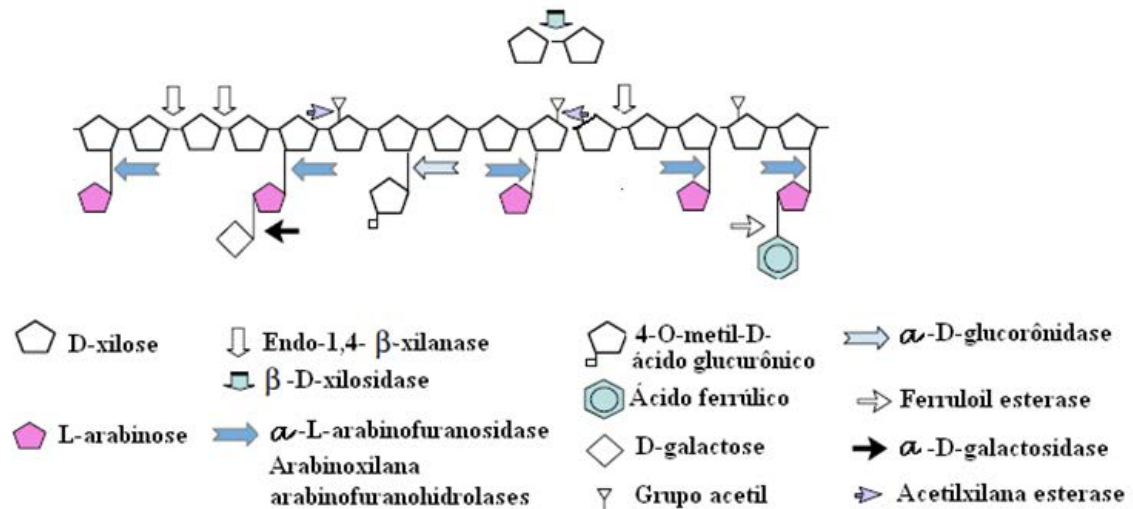
- *α-L-arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55): hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais;

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

- *acetil xilana esterases* (EC 3.1.1.72): hidrolisam as ligações entre xilose/ácido acético e xilose/ácido ferúlico;

- *p-coumárico esterases* (EC 3.1.1): removem ácidos pirúvico e coumárico dos resíduos de arabinose das cadeias laterais (ARO et al., 2005).

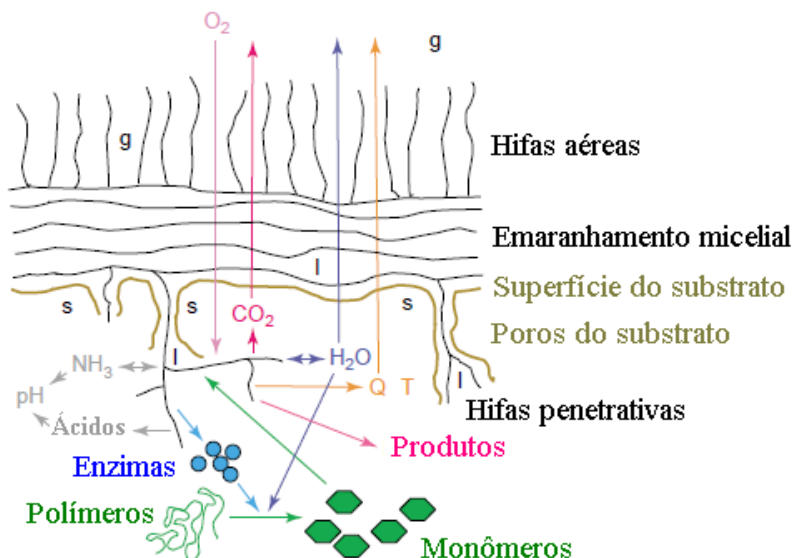
Figura 9. Representação esquemática do sistema xilanolítico microbiano (exemplo de degradação da arabinoxilana). FONTE: Aro et al. (2005).



3. Fermentação em estado sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido denota o cultivo de micro-organismos em substratos sólidos onde a fase aquosa é mínima, isto é, em nível que suporte o crescimento microbiano. Neste tipo de cultivo o substrato sólido atua como um suporte inerte para o crescimento do micro-organismo e/ou como fonte de nutrientes. Além disso, a FES simula as condições ambientais em que muitos fungos filamentosos vivem, sendo adequada como método de cultivo para tais micro-organismos por permitir a penetração das hifas nos poros entre as partículas de substratos, o que auxilia as trocas gasosas e a manutenção metabólica (Figura 10) (HÖLKER; LENZ, 2005).

Figura 10. Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorrem durante a FES. Gás (g); líquido (l); substrato (s); calor (Q); temperatura (T). FONTE: adaptado de Hölker; Lenz (2005).



Nos cultivos de fungos filamentosos por FES, as hifas formam um emaranhado micelial que pode projetar-se formando hifas aéreas ou penetrar o substrato (Figura 10). Os espaços vazios entre as hifas aéreas são frequentemente preenchidos por gás, enquanto que os espaços vazios entre as hifas que penetraram no substrato são preenchidos por líquido. A atividade metabólica ocorre principalmente próximo à superfície do substrato e entre os poros. Contudo, regiões expostas do micélio (hifas aéreas) também exibem metabolismo e servem como transportadoras de substâncias para as hifas penetrativas. Enzimas hidrolíticas são produzidas pelo micélio, difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação de polímeros em seus monômeros constituintes. O O₂ é consumido e CO₂, H₂O, calor e produtos bioquímicos são produzidos. Portanto, gradientes se desenvolvem dentro de biofilmes que, por exemplo, forçam o O₂ a difundir-se para a fase gasosa em regiões mais profundas do biofilme e o CO₂ para fases mais gasosas, como esquematizado na Figura 10. A liberação de calor faz com que ocorra rapidamente um aumento na temperatura, o que representa um problema durante a FES. O calor é removido do substrato via condução e evaporação. O sistema de equilíbrio de H₂O também inclui a H₂O que passa lentamente pelo micélio, o consumo de H₂O durante as reações de hidrólise e a produção da mesma durante a respiração. Outro importante fator é o pH local, que pode ser alterado devido a liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia (HÖLKER; LENZ, 2005).

É importante que os níveis de umidade sejam mantidos ao longo do processo de FES. Uma condição ótima deve ser estabelecida, pois baixos níveis de umidade reduzem a difusão de nutrientes, crescimento microbiano, estabilidade enzimática e a absorção do substrato. No geral, os níveis de umidade em processos de FES variam entre 30 a 85%. No caso de fungos filamentosos,

podem variar entre 20 a 70% (KRISHNA, 2005), sendo este último valor comumente citado na literatura para o cultivo visando a produção de enzimas.

Outra variável física importante que pode afetar significativamente o processo de FES é a temperatura, pois tem íntima influência no crescimento e produção/estabilidade de enzimas. Como dito anteriormente, ao longo do processo de FES a temperatura tende a aumentar devido ao metabolismo microbiano e à dificuldade de difusão de calor no sistema, especialmente em substratos mais compactos (KRISHNA, 2005). Este fato deve ser levado em consideração na escolha do substrato e do micro-organismo a serem utilizados. Neste contexto, os fungos termofílicos se destacam como os mais adequados para cultivos por FES, por apresentam crescimento ótimo entre 45 e 55°C, suportando melhor o aumento de temperatura, especialmente em biorreatores de larga escala. Além disso, secretam enzimas geralmente mais ativas e estáveis em altas temperaturas, propriedades importantes também do ponto de vista de aplicações industriais (MAHESHWARI et al., 2000). Discutir questão do uso de energia na indústria

Em relação ao substrato, o tamanho das partículas é um fator importante e determina o espaço vazio que é ocupado pelo ar. Uma vez que a taxa de transferência de oxigênio para o espaço vazio afeta o crescimento, o substrato deve conter partículas de tamanho adequado para evitar a compactação do meio e melhorar a transferência de massa (KRISHNA, 2005). Partículas de substrato menores geralmente proporcionam maior área de superfície para ação microbiana. Contudo, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração de substrato, podendo interferir na troca gasosa e, portanto, resultar em baixo crescimento (KRISHNA, 2005).

4. Uso de resíduos lignocelulósicos como substratos para produção de enzimas por fungos filamentosos por FES

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse no uso de resíduos lignocelulósicos como substratos para o cultivo de micro-organismos, especialmente os fungos filamentosos que são bem adaptados ao processo de FES. Tais cultivos visam principalmente a produção de enzimas de degradação de material vegetal, uma vez que as possibilidades de aplicação destas enzimas também tem sido ampliadas (BANSAL et al., 2012). A Tabela 1 traz alguns exemplos relacionados às celulasas e xilanases.

Tabela 1. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos utilizando-se resíduos lignocelulósicos como substratos.

Fungo	Substrato	Temperatura de crescimento	Enzimas	Tempo	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Farelo de trigo	55°C	Xilanase	168h	Alam et al. (1994)
<i>Thermoascus auranticus</i>					
<i>Acremonium zeae</i> EA0802	Bagaço de cana	28°C	Fpase, endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e β -xilosidase	192h	De Almeida et al. (2011)
<i>Acremonium sp</i> EA0810					
<i>Aspergillus niger</i> NS-2	Farelo de trigo	30°C	Fpase, endoglucanase e β -glicosidase	96h	Bansal et al. (2012)
<i>Aspergillus foetidus</i> ATCC 14916	Sabugo de milho				
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 1808		28°C	Xilanase	96h	Christov et al. (1999)
<i>Gliocladium viride</i> CBS 658.70	aveia				
<i>Aspergillus Niger</i>	palha de arroz e farelo de trigo	30°C	Fpase, endoglucanase, β -glicosidase e xilanase	96-144h	Dhillon et al. (2011)
<i>Trichoderma reesei</i>					
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	farelo de trigo	30°C	Fpase, endoglucanase, β -glicosidase	96-192h	Falkoski et al. (2013)
<i>Thermoascus auranticus</i>	palha de trigo	50°C	Xilanase	120h	Kalogeris et al. (1998)

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., originada no sudoeste da Ásia e oeste da Índia, tem sido cultivada no Brasil há cerca de 500 anos e é utilizada para produção de açúcar e etanol. Até setembro de 2013, o país produziu cerca de $1,33 \times 10^3$ milhões de toneladas, alcançando em metade do ano o correspondente à produção mundial (HOFSETZ; SILVA, 2012; UNICA, 2013).

Desde 1975, quando surgiu o programa PROÁLCOOL, o Brasil assumiu uma política de redução da dependência do petróleo de outros países, visando aumentar a produção de etanol de cana para utilização como um substituto para a gasolina ou em adição a este combustível, numa proporção de até 24% (HOFSETZ; SILVA, 2012). A produção de etanol a partir da cana ocorre com a utilização do sumo ou do melaço da planta e o combustível assim obtido é chamado de etanol de primeira geração. Visando aumentar a produção, pesquisas tem focado o uso de resíduos lignocelulósicos como fonte de açúcares fermentescíveis, especialmente glicose proveniente da celulose, para a obtenção do chamado etanol de segunda geração. Subprodutos agrícolas e agroindustriais são considerados matérias-primas atrativas para produção de etanol de segunda geração, devido a seu baixo custo e grande disponibilidade no ambiente (CARDONA; SANCHÉZ, 2007). Entre estes resíduos lignocelulósicos destaca-se, no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto gerado em grande quantidade pela indústria sucroalcooleira.

O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso resultante da extração do suco pela moagem da cana, cuja composição varia de acordo com diversos fatores, como o processo de extração, a variedade da cana e a composição do solo. De modo geral, é composto por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Apresenta pequenas quantidades de outros compostos como pectinas, proteínas, minerais e compostos de baixo peso molecular, além de apresentar baixo teor de cinzas (em torno de 2,4%), o que representa uma grande vantagem para sua bioconversão por micro-organismos quando comparado com outros resíduos, como a palha de arroz e de trigo, que contêm aproximadamente 17,5 e 11% de cinzas, respectivamente PANDEY et al., 2000).

Em geral, o processamento de uma tonelada de cana gera em torno de 280 kg de bagaço. Embora boa parte deste bagaço seja utilizada para fins energéticos na própria usina, o restante ainda representa uma grande oportunidade para agroindústria nacional. Há, portanto, um amplo reconhecimento de que a produção anual de bagaço de cana atinge cifras vultuosas e que o aproveitamento deste resíduo é uma necessidade nacional, com amplo espaço para o desenvolvimento de atividades mais nobres do que a geração direta de energia por combustão. Segundo alguns autores, a utilização do bagaço excedente viabiliza economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool à produção de etanol de segunda geração,

favorecendo o abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo (GÁMEZ et al., 2006).

5. Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar

Para que o bagaço de cana e outros resíduos lignocelulósicos possam ser utilizados como fontes de açúcares fermentescíveis, principalmente a glicose, é necessária uma etapa de pré-tratamento para remover ou desestruturar a lignina, diminuir o grau de cristalinidade da celulose e, assim, facilitar o acesso das celulasas ao substrato. Vários métodos físicos e químicos podem ser empregados como pré-tratamentos, entre os quais podem ser citados pirólise, explosão a vapor, radiação gama, tratamento com alcali, peróxido de hidrogênio, solventes e ozônio (PANDEY et al., 2000; BALAT, 2011).

6. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Como citado anteriormente, para a obtenção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica é necessária a etapa de pré-tratamento para remoção/desestruturação da lignina e diminuição da cristalinidade da celulose e, posteriormente, sacarificação enzimática da celulose para liberação de glicose, que será convertida a etanol pelo micro-organismo fermentativo. A hemicelulose representa uma fonte pentoses, principalmente xilose, porém a levedura tradicionalmente empregada nos processos de fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de fermentar este açúcar em etanol.

A hidrólise enzimática para a sacarificação de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana tem sido explorada por apresentar vantagens importantes em relação à hidrólise química, como condições moderadas de temperatura e pressão, o que diminui a demanda no consumo de energia, e pouca ou nenhuma produção de subprodutos tóxicos, devido à alta especificidade. A conversão enzimática da celulose em glicose requer o uso de “pools” enzimáticos microbianos compostos principalmente pelas hidrolases endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase (LYND et al., 2002; ARANTES; SADDLER, 2010). Essas enzimas podem ser produzidas por muitos micro-organismos, especialmente pelos fungos filamentosos (CASTRO et al., 2010; MAEDA et al., 2013). Cabe ressaltar que, durante a sacarificação enzimática, o uso de enzimas auxiliares, como a feruloil esterase e as ligninases, é importante para uma degradação mais eficiente da lignocelulose, facilitando o acesso das celulasas à celulose (SANDGREN et al., 2005; SELIG et al., 2008).

Além das hidrolases do complexo celulolítico, enzimas oxidativas podem contribuir para a conversão da celulose em glicose, as quais tem sido recentemente identificadas em análises de

transcriptomas e proteomas (BERKA, et al., 2011; PHILLIPS; IAVARONE; MARLETTA, 2011; PHILLIPS et al., 2011).

Além dos obstáculos representados pela estrutura recalcitrante da lignina e pela cristalinidade da celulose, outra dificuldade encontrada para uma eficiente sacarificação enzimática da celulose relaciona-se à reciclagem das celulasas ($-\text{turnover}$), pois as características de adsorção destas enzimas em substratos lignocelulósicos ainda não são totalmente entendidas. A degradação enzimática da celulose é um processo complexo que ocorre no limite das fases sólido/líquida, onde as enzimas são os componentes móveis. Quando as celulasas agem *in vitro* sobre o substrato insolúvel, três processos ocorrem simultaneamente: (a) mudanças físicas e químicas na celulose na fase sólida (ainda não solubilizada); (b) hidrólise primária, envolvendo a liberação de intermediários solúveis a partir da superfície das moléculas de celulose que estão em reação e (c) hidrólise secundária, envolvendo a hidrólise dos intermediários solúveis em outros de baixo peso molecular e, por último, em glicose (MOSIER; LADISCH; LADISCH, 2002).

De modo geral, a taxa de hidrólise enzimática do material celulósico diminui rapidamente, sendo a degradação enzimática da celulose caracterizada por uma rápida fase inicial, seguida por uma lenta fase secundária, que pode durar até que todo o substrato seja degradado. Isto tem sido explicado muito freqüentemente pela rápida hidrólise da fração celulósica facilmente acessível, forte inibição das enzimas pelo produto, especialmente as β -glicosidases, e lenta inativação de moléculas de enzimas adsorvidas (BALAT, 2011).

O custo de produção das enzimas para obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos é um dos principais obstáculos a serem superados para a viabilização econômica do processo de produção de etanol de segunda geração. Assim, a busca de novas enzimas a partir de fontes microbianas, que apresentem alta taxa de hidrólise e baixa inibição pelo produto e por etanol, e que possam ser obtidas pelo cultivo dos micro-organismos a baixo custo, torna-se necessária. Neste contexto, o uso de micro-organismos superprodutores de celulasas, ou de celulasas com características melhoradas têm despertado interesse (LIMA, 2001; MIELENZ, 2001; LIMA, 2005; FUJITA, 2004).

Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos termofílicos destacam-se pelo crescimento em diferentes substratos lignocelulósicos, como resíduos agroindustriais, sob temperaturas altas, produzindo uma ampla variedade de enzimas de degradação de biomassa vegetal, especialmente as celulasas, ativas e estáveis em temperaturas mais elevadas, o que estimula estudos de bioprospecção e isolamento/clonagem dos genes de interesse.

7. Referências bibliográficas

- ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDINT, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p. 298-302, 1994.
- ANKE, H.; WEBER, R. W. S. White rots, chlorine and the environment – a tale of many twist. **Mycologist**, v. 20, p. 83-89, 2006.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.4, pp.1-11, 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 719–739, 2005.
- BERKA, R. M.; et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 922, 2011.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v. 255, p. 445-450, 1988.
- DE ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; BISCHOFF, K. M.; et al. Cellulases and hemicellulases from endophytic Acremonium species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 594–610, 2011.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 1, p. 1–10, 2013.
- BADHAN, A K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–10, 2007a.
- BAJPAI, P.; CENTRE, T. Xylanases. **Applied Microbiology: Industrial**, p. 600–612, 2009.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011. Elsevier Ltd.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**, v. 32, n. 7, p. 1341–6, 2012. Elsevier Ltd.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375–407, 2002.

- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 120–130, 2008.
- CHRISTOV, L. ; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 511–517, 1999.
- DELABONA, P. D. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.
- DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6–13, 2012.
- DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, 2011.
- DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–71, 2011.
- DURAND, H. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi : mesophiles *Trichoderma reei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 6, p. 175–180, 1984.
- FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.
- FLANNIGAN, B.; SELLARS, P. N. Amylase, β -glucosidase and β -xylosidase activity of thermotolerant and thermophilic fungi isolated from barley. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 69, n. 2, p. 316–317, 1977.
- FRACHEBOUD, D.; CANEVASCINI, G. Isolation , purification , and properties of the exocellulase from *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 11, p. 220-229, 1989.
- GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396–400, 2013.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010. Elsevier Ltd.
- HAN, Y.; CHEN, H. Biochemical characterization of a maize stover beta-exoglucanase and its use in lignocellulose conversion. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6111–7, 2010.
- HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.
- JAIN, M. K.; KAPOOR, K. K.; MISHRA, M. M. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 73, n. 1, p. 85–89, 1979.

- JÚNIOR, G. S.; MARA, S.; FRANCHETTI, M.; et al. Mycelial growth and microscopic characteristics of *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinskaya in YpSs medium with different carbon sources. **Hochnea**, v. 34, n. 2, p. 239–243, 2007.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099–1104, 2003.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. . Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 155–163, 1998.
- KNOB, A.; CARMONA, E. C. Cell-associated acid beta-xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New biotechnology**, v. 26, n. 1-2, p. 60–7, 2009.
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2005.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.
- LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011. Elsevier Ltd.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.
- MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Use of a Mixture of Thermophilic Enzymes Produced by the Fungus *Thermoascus aurantiacus* to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of the Sugarcane Bagasse Cellulose. , v. 5, n. 4, p. 468–476, 2010.
- MORETTI, M. M. S. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1062–1071, 2012.
- MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; ISHMAEL, N.; et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal biology**, v. 116, n. 4, p. 489–502, 2012.
- NG, I.-S.; LI, C.-W.; CHAN, S.-P.; et al. High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1310–7, 2010.
- ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜ, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 7-8, p. 689–695, 2001.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000a.

- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, p. 205–211, 2004.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–91, 2005.
- REDDY, G. V.; RAVINDRA BABU, P.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1457–1462, 2003.
- SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic Fungi : Taxonomy and Biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, p. 77–107, 2007.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.
- SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 352–357, 1997.
- SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; et al. Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 235–241, 2005.
- SINGH, S.; REDDY, P.; HAARHOFF, J.; et al. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 119–28, 2000.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.
- SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1561–9, 2005.
- VOUTILAINEN, S. P.; BOER, H.; LINDER, M. B.; et al. Heterologous expression of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B, and random mutagenesis to improve its thermostability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 234–243, 2007.
- YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; et al. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 1–55, 2010.
- ZHU, Z.; ZHU, M.; WU, Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with $\text{NH}_4\text{OH} - \text{H}_2\text{O}_2$ and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 199–207, 2012.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMOFÍLICOS PRODUTORES DE CELULASES E XILANASES E ESTUDOS DAS ENZIMAS

Resumo

Fungos filamentosos apresentam alta capacidade de produção de enzimas de degradação de lignocelulose. As enzimas que hidrolisam os carboidratos constituintes deste material são as endoglucanases, β -glicosidases, avicelases, xilanases e β -xilosidases. Assim, substratos lignocelulósicos como resíduos agroindustriais podem ser utilizados para crescimento dos micro-organismos e indução da produção de tais enzimas. É crescente o interesse por cepas capazes de produzir enzimas hemi-celulolíticas ativas e estáveis em ampla faixa de pH e sob altas temperaturas, não inibidas ou fracamente inibidas por seus produtos, uma vez que tais características são importantes para aplicações industriais. Neste trabalho foram isolados 32 fungos filamentosos do ambiente, a partir de amostras de silagem de cana e milho, compostagem e restos de frutas. Dentre os isolados, *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e DABM 11/45 foram pré-selecionados para a avaliação do perfil de produção das enzimas hemi-celulolíticas ao longo do tempo, por FES, bem como para a avaliação das características físico-químicas. O cultivo do isolado *M. thermophila* JCP 1-4 em mistura de bagaço de cana e farelo de soja proporcionou as maiores produções de endoglucanase, avicelase e xilanase: 227,97 U/g em 240h; 37,67 U/g em 96h e 137,46 U/g em 48 h, respectivamente. Para o isolado DABM 11/45 foram obtidas produções de 8,04 U/g de endoglucanase após 144h de cultivo, 14,87 U/g de avicelase após 96h e 113,86 U/g de xilanase após 96h de cultivo em farelo de trigo com bagaço de cana tratado sob explosão à vapor, em FES. A produção máxima de β -glicosidase foi obtida pelo isolado DABM 11/45 utilizando a mistura de bagaço de cana submetido à explosão a vapor e farelo de trigo (67,27 U/g em 96h) como substratos. As β -glicosidases de ambos os isolados apresentaram alta estabilidade frente às altas concentrações de glicose e etanol, tornando-se interessantes para aplicações industriais.

1. Introdução

As celulasas microbianas são enzimas que podem ser aplicadas em diversos processos industriais nas áreas de alimentos, têxtil, papel e celulose, detergentes entre outros (DHILLON et al., 2012). Recentemente, o interesse nestas enzimas tem crescido devido à possibilidade de aplicação na sacarificação de materiais lignocelulósicos, visando a obtenção de etanol de segunda geração (DIAS et al., 2011). Xilanases constituem o principal grupo de hemicelulasas comerciais, sendo aplicadas na indústria alimentícia (BRIENZO et al., 2008), de ração animal (MATHLOUTHI; JUIN; LARBIER, 2003), têxteis (PRADE, 1995), de polpa de papel (BOCCHINI et al., 2003), entre outras. Nos últimos anos tem se destacado o uso de xilanases também em processos de desestruturação e hidrólise de material lignocelulósico visando a produção de etanol de segunda geração (SINGHANIA et al., 2010). No entanto, o elevado custo de produção das enzimas destinadas a aplicações industriais ainda é um obstáculo a ser superado e estimula estudos envolvendo o uso de substratos alternativos para o cultivo dos micro-organismos produtores por fermentação em estado sólido (FES) (LEITE et al., 2008). Entre estes substratos destacam-se os resíduos lignocelulósicos (DHILLON et al., 2012).

A celulose é o principal polissacarídeo presente nos resíduos lignocelulósicos, sendo um homopolissacarídeo constituído por monômeros de D-glicose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas. Após a celulose, a fração de carboidrato mais abundante é a hemicelulose, heteropolissacarídeo composto por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos orgânicos. O principal componente da hemicelulose é a xilana, que consiste em uma cadeia de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4. Por fim, a lignina, é o principal componente não-carboidrato dos materiais lignocelulósicos. É constituída por polímeros fenólicos de natureza amorfa, compostos por *p*-hidroxifenil, guaiacil e sinrigil, capazes de formar uma variedade de ligações C-C, resultando numa complexa e estável rede ramificada (GLAZER; NIKAIDO, 1995; RAMOS, 2003; WENG; BONAWITZ; CHAPPLE, 2008, MORETTI et al., 2012).

Muitos micro-organismos são capazes de degradar a biomassa lignocelulósica pela ação de celulasas, hemicelulasas e ligninases. As enzimas hidrolíticas que atacam os carboidratos liberam açúcares que posteriormente podem ser utilizados na obtenção de produtos de altos valores agregados, como o etanol de segunda geração (DIAS et al., 2011; MORETTI et al., 2012)

Entre as celulasas, a endoglucanase (EG, endo-1,4- β -D-glico-4-glicanohidrolase, EC 3.2.1.4) hidrolisa as cadeias de celulose internamente, resultando em uma rápida redução grau de polimerização; a exoglucanase (CBH, 1,4- β -D-glico-celobiodehidrolase, EC 3.2.1.91) remove unidades de celobiose a partir de extremidades da cadeia de celulose e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21)

hidrolisa celobiose e outras celodextrinas a glicose. As três enzimas do complexo sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. As principais enzimas de degradação de hemicelulose são as xilanases (β -1,4-xilanases ou endoxilanases, EC 3.2.1.8) – que hidrolisam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, liberando xilooligossacarídeos ou xilobiose – e as β -xilosidases (β -1,4-D-xylan xylohydrolases, EC 3.2.1.37), que hidrolisam a xilobiose em xilose (KNOB; CARMONA, 2009).

Os fungos filamentosos são os micro-organismos que mais se destacam na produção de enzimas de degradação de lignocelulose, especialmente por processos de FES, aos quais são bem adaptados uma vez que os substratos e as condições utilizadas simulam seus habitats naturais (HÖLKER; LENZ, 2005). Os fungos termofílicos despertam especial interesse pois apresentam crescimento ótimo entre 45 e 55°C e suportam melhor o possível aumento de temperatura comum em processos de FES, devido à dificuldade de dissipação de calor, especialmente em biorreatores de larga escala. Tais fungos geralmente secretam enzimas mais ativas e estáveis em altas temperaturas, uma vantagem do ponto de vista de aplicações industriais (MAHESHWARI et al., 2000b).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos o isolamento de fungos filamentosos termofílicos, a avaliação da produção de celulasas e xilanases pelo cultivo por FES utilizando-se misturas de diferentes resíduos lignocelulósicos como substratos, bem como a avaliação das características físico-químicas das enzimas produzidas pelo isolado selecionado, o qual foi identificado no nível de espécie.

2. Material e Métodos

2.1. Meios nutrientes

2.1.1. Meio nutriente líquido para as coletas de amostras

Para a coleta dos fungos filamentosos foi utilizado o meio nutriente composto por (g/L): glicose (10,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4), KH_2PO_4 (2,0), CaCl_2 (0,3), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), peptona (5,0), extrato de levedura (2,0), uréia (0,3), Tween 80 (1,0), solução de sais a 0,1% e 0,25% de antibiótico. A solução de sais foi composta por (mg/mL): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4), CoCl_2 (2,0).

2.1.2. Meio nutriente sólido para isolamento, repique e manutenção das colônias

Para isolamento, repiques periódicos e conservação das culturas puras foi utilizado o meio nutriente Sabouraud. As culturas puras foram mantidas em criotubos, sob solução de glicerol a 20%, em freezer a -80°C e também pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939 *apud* FIGUEIREDO, 1967).

2.1.3. Meio nutriente para a triagem qualitativa em placa

Para a avaliação qualitativa da produção de endoglucanase e endoxilanase foi utilizado o meio nutriente composto por (g/L): NaNO_3 (3,0); K_2HPO_4 (1,0); MgSO_4 (0,5); KCl (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,01); agar (15,0) e carboximetilcelulose (CMC) ou xilana birchwood (10,0). Após o crescimento dos isolados nestes meios seletivos, para avaliação do halo enzimático, foi utilizada a técnica do vermelho-congo. (Achar referencias e descrição do vermelho-congo)

2.1.4. Meios de cultivo para as fermentações em estado sólido (FES)

Os fungos foram cultivados em 5,0g das seguintes misturas (1:1 p/p): bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (triagem inicial), bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e aveia, bagaço de cana-de-açúcar submetido à explosão a vapor (gentilmente cedido pelo CTC – Centro de Tecnologia Canavieira, de Piracicaba/SP) e farelo de trigo. A estas misturas foram adicionados 11,0 mL de solução nutriente (proporcionando uma umidade inicial de cerca de 70%) 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), Tween 80 (10,0) e solução de sais (item 2.1.1) a 0,1% , sendo o pH ajustado para 5,0. Os substratos foram lavados e secos a 65°C . O bagaço de cana *in natura* foi triturado e peneirado, sendo utilizadas partículas de 1 a 3 mm.

2.2. Isolamento dos fungos filamentosos

O isolamento dos fungos foi realizado com base no procedimento descrito por Da Silva (1992), coletando-se amostras de material orgânico do ambiente e em compostagem. Aproximadamente 0,5g de amostra foi coletada e diretamente transferida para frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 20,0 mL de meio nutriente (item 2.1.1), vedados com rolha de algodão. Os frascos foram imediatamente levados ao laboratório e mantidos em estufa, a 45°C , sob agitação de 100 rpm, por

24-48 horas. Após este período, 0,1 mL deste pré-cultivo foi assepticamente transferido para o centro de uma placa de Petri contendo o meio nutriente Agar Sabouraud. O material foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalski e a placa foi incubada a 45°C, até o aparecimento das colônias. As colônias de fungos filamentosos isoladas foram diferenciadas com base no aspecto do micélio e cor dos esporos (quando presentes), e foram re-inoculadas, através de estrias de esgotamento, em meio de isolamento, até a obtenção de culturas puras, as quais foram estocadas.

2.3. Avaliação da influência da temperatura sobre o crescimento dos isolados

Os isolados pré-selecionados foram cultivados a 45°C em ágar Sabouraud, por 72h, e então inoculados no centro de uma placa de Petri contendo o mesmo meio. Como inóculo foi utilizado um disco de micélio de 8,0 mm de diâmetro. As placas foram incubadas a 40, 45 e 50°C e o diâmetro das colônias foi medido a cada 24 horas.

2.4. Avaliação qualitativa da produção de celulasas e xilanases

A avaliação qualitativa foi feita com base nas enzimas endoglucanase e endoxilanase, as mais freqüentemente produzidas pelos fungos celulolíticos e xilanolíticos, respectivamente. Os isolados foram pré-cultivados em meio Ágar Sabouraud, em placas de Petri, por 48 horas, sob a temperatura que mais favoreceu o crescimento. Após este pré-cultivo, foram inoculados (disco micelial de 8,0 mm de diâmetro) no centro de placas de Petri contendo o meio nutriente descrito no item 2.1.3. As placas foram incubadas sob a mesma temperatura, por 48 horas. Após este período, 10 mL de uma solução de corante Vermelho Congo (1,0 g/L) foram adicionados em cada placa, por 15 minutos (para os fungos que esporulam, os esporos foram inicialmente removidos utilizando-se um fio de água destilada). A solução foi então removida e as placas foram lavadas com 5,0 mL de solução de NaCl 1,0 mol/L, por 15 minutos. Esta solução foi então descartada e a exibição de um halo de coloração mais clara ao redor da colônia indicaria a hidrólise da carboximetilcelulose ou da xilana (BAHARUDDIN et al., 2010). Quando o halo de hidrólise ultrapassa a margem da colônia, é possível calcular o índice enzimático (Ie), para fins de comparação entre as linhagens:

$$Ie = \text{diâmetro do halo de hidrólise (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$$

2.5. Pré-inóculos para as fermentações em estado sólido

Para cada cultivo por FES foi feito um pré-inóculo em ágar Sabouraud, mantendo-se as placas por 72h a 45°C. Após este período, discos miceliais de 8,0 mm de diâmetro foram tomados e utilizados como inóculo (5 discos para para cada saco de fermentação contendo 5,0 g de substrato). Optou-se por discos miceliais como inóculo pois a contagem de esporos seria dispendiosa para o número de fungos isolados (32).

2.6. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido

As FES foram conduzidas em sacos de polipropileno (16 x 20 cm), utilizando-se 5g de substrato (item 2.1.4.). Nas triagens iniciais, os cultivos foram mantidos por 96h, tempo necessário para um completo crescimento micelial e esporulação sobre o substrato (avaliação visual). Nos cultivos para a avaliação da influência do tempo sobre a produção das enzimas, amostras foram tomadas a cada 48h, até 336h. Após o tempo de cultivo, a cada saco de fermentação foram adicionados 50mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm), por 1 hora. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000 xg por 15 min, a 5°C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

2.7. Determinação das atividades enzimáticas

2.7.1. Xilanase

Inicialmente, a atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático e 0,9 mL de solução de substrato xilana Birchwood (Sigma X0502) (10,0 g/L), em solução tampão acetato 0,10 mol/L, pH 5,0). Posteriormente, buscando economia no processo, os volumes foram reduzidos para 25 e 225 μ L, respectivamente. A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL (ou 250 μ L, no caso da reação com volumes reduzidos) do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

2.7.2. FPase

A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi avaliada como proposto por Ghose (1987) em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol/L, pH 4,8, uma fita de papel de filtro Whatman nº1 de 1 x 6,0 cm e 0,5 mL de extrato enzimático. Após uma hora de reação, a 60°C, a mesma foi paralisada em banho de gelo e quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação, com base em curva analítica de glicose.

2.7.3. Endoglucanase

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 3.7.1), porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação.

2.7.4. β -glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidase, 50 µL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250 µL de solução tampão acetato (0,10 mol/L, pH 5,0) e 250 µL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L) – PNPG, Sigma. A reação foi mantida a 60°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (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.

2.7.5. β -xilosidase

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

2.8. Caracterização físico-química das enzimas

2.8.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

Para a determinação do pH ótimo, as atividades enzimáticas foram avaliadas como descrito no item 2.7, utilizando-se soluções de substrato em uma ampla faixa de pH (3,5 - 10,0). Para a avaliação do efeito do pH nas atividades de endoglucanase, avicelase e β -glicosidase foram utilizados os tampões McIlvaine (pH 3,5-8,0) e Glicina-NaOH (pH 8,5-11,0). Para avaliação do efeito do pH na atividade ótima da xilanase, foram utilizados os tampões citrato (pH 3,5-8,0) e Glicina-NaOH (pH 8,5-11,0).

Para avaliar a temperatura ótima das enzimas foram avaliadas utilizando uma faixa de temperatura de 35°C à 80°C. Para atividade enzimática foi utilizado tampão de acordo com o pH ótimo respectivo para cada enzima, respeitando o protocolo descrito no item 2.7.

2.8.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas

A temperatura de estabilidade foi estudada pela incubação das enzimas, por 1 hora, sob diferentes temperaturas (entre 30 e 95°C). Posteriormente, a atividade enzimática remanescente foi quantificada sob condições ótimas.

2.8.3. Efeito de glicose e etanol sobre as atividades de β -glicosidase

Para a determinação do efeito da glicose e etanol, a atividade enzimática foi quantificada com a adição destes compostos, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0 - 100 mmol/L de glicose e 0 - 40% de etanol). Os ensaios foram realizados a 70°C, em tampão acetato de sódio 0,10 mol/L, pH 5,0.

2.8.4. Determinação da constante de termoinativação (K_d) e meia-vida ($t_{1/2}$) das celulasas

As cinéticas foram medidas como descrito por Tomazic e Klibanov (1988), com pequenas modificações. O percurso de tempo de termoinativação das enzimas endoglucanase, β -glicosidase e avicelase foi medido incubando-se as respectivas enzimas (em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0), sob diferentes temperaturas, acondicionadas em tubos de vidros pequenos vedados com tampas de borracha. Periodicamente, usando uma seringa com agulha, amostras foram retiradas,

esfriadas a 25°C, armazenadas sob esta temperatura por 24 h, quando então foram determinadas as atividades residuais. As temperaturas de pré-incubação e os tempos para remoção foram: 65°C, a cada 10 min até 120 min; a 67,5°C, a cada 5 min até 65 min; a 70°C, a cada 3 min até 30 min para endoglucanase e β -glicosidase e 90°C, a cada 30 min até 210 min; 92,5°C a cada 15 min até 200 min e 95°C a cada 5 min até 60 min para avicelase. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas foi definido como o tempo no qual, após incubação, a atividade residual da enzima foi equivalente a 50% da atividade original. O $t_{1/2}$ foi determinado de acordo com a equação (1) abaixo. O coeficiente de velocidade de termoinativação (Kd) foi determinado por regressão linear da representação gráfica do logaritmo natural da atividade residual (Ln ar) em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas indicadas, nos quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas, obedecendo cinética de velocidade de primeira ordem. O Kd foi representado pelo valor absoluto da inclinação da reta de regressão.

$$T_{1/2} = 0,693/Kd \text{ (1)}$$

2.9. Identificação do isolado selecionado

O isolado JCP 1-4 e DABM 11/45 foram identificados como *Myceliophthora thermophila* e *Rhizopus orizae*, respectivamente, em projeto de pesquisa paralelo.

3. Resultados e discussão

3.1. Isolamento dos fungos

A partir de resíduos orgânicos e materiais depositados no ambiente (compostagem, silagem de cana-de-açúcar e de milho, ninhos abandonados de vespas, frutas em decomposição, galhos, rações armazenadas para alimentação de cobaias de laboratório e animais errantes – como formigas), foram isolados 32 fungos filamentosos (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre o isolamento dos fungos filamentosos termofílicos.

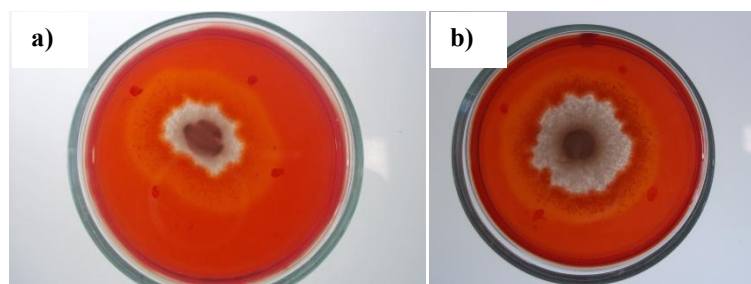
Isolado	Data e local de coleta	Material Coletado
JCP 1-1	9/09/2011 Sítio Vila Formosa, Potirendaba – SP	Material depositado na pilha de silagem de cana
JCP 1-2		
JCP 1-3		
JCP 1-4		
JCP 1-5		
JCP 1-6		
JCP 1-7		
JCP 1-8		
JCP 1-9		Material depositado na pilha de silagem de cana e milho
JCP 1-10		
JCP 1-11		
JCP 1-12		
JCP 1-13		
JCP 1-14		
JCP 1-15		
JCP 1-16		
JCP 1-17		
JCP 1-18		
JCP 2-1	18/10/2011 Constroeste Onda Verde – SP	Compostagem
JCP 3-1	Campus UNESP São José do Rio Preto - SP	Frutas em decomposição
JCP 4-1		Ninhos de vespa
JCP 4-2		Ração animal
JCP 5-1		
JCP 6-1		Frutas em decomposição
JCP7-1		Animais errantes
JCP 8-1		
JCP 8-2		
DABM 10/45	07 de janeiro de 2011 Fazenda Apta Colina – SP	Tronco de árvore
DABM 11/45		Monte de bagaço de cana
DABM 12/45		Madeira depositada ao solo
DABM 23/45		Tronco de árvore depositado ao solo
DABM 24/45		Capim depositado ao solo

Os fungos filamentosos termofílicos são os componentes principais da microflora que se desenvolve em pilhas de produtos agrícolas e silvícolas, grãos armazenados, madeira, material de nidificação de animais e em outros acúmulos de matéria orgânica. Estes ambientes quentes e úmidos, sob condições aeróbias, fornecem as condições básicas para o seu desenvolvimento. De forma geral, eles constituem um grupo que compreende diversos gêneros distribuídos de acordo com sua fisiologia, como os Phycomycetes, Ascomycetes, Fungos Anamórficos (MAHESHWARI et al., 2000b; JÚNIOR et al., 2007; SALAR; ANEJA, 2007; MORGENSTERN et al., 2012).

3.2. Avaliação qualitativa da produção das enzimas pelo uso do Vermelho Congo

Esta metodologia havia sido escolhida para uma primeira triagem dos isolados quanto à capacidade de produção de celulasas e xilanases. Entretanto, não foi possível calcular o índice enzimático (Ie) para a grande maioria dos fungos, uma vez que os halos de hidrólise não ultrapassavam as margens das colônias. Pela Figura 1 pode-se constatar que, para alguns fungos avaliados, as margens das colônias coincidiam com as margens dos halos de hidrólise. Observou-se também que o crescimento não foi intenso, uma vez que as colônias expandiam-se na placa, mas o crescimento das hifas não era volumoso. Provavelmente, isso ocorreu devido o uso de apenas carboximetilcelulose como fonte de carbono. Quando observou-se as placas contra a luz, os halos de hidrólise não ultrapassaram as margens das colônias, o que pode ser devido ao fato de as enzimas secretadas não serem bem difusíveis no meio de cultivo. Foram feitas várias adaptações na metodologia, incluindo diminuição da concentração da fonte de carbono, acidificação da solução de NaCl usada para descoramento e inoculação por agulha no centro da placa. Contudo, não foi possível determinar o índice enzimático, pois os halos continuavam a não ultrapassar as margens das colônias (dados não mostrados).

Figura 1. Avaliação qualitativa da produção de endoglucanase pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b).



Há várias citações na literatura científica sobre o uso do Vermelho Congo para a seleção de micro-organismos produtores de celulasas e xilanases (KUMARI; SRI; SUDHAKAR, 2011; RUEGGER et al., 2004; HAGERMAN; BLAU; McCLURE, 1985). Alguns trabalhos citam o uso do índice enzimático como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes (TEATHER; WOOD, 1982).

Uma vez que esta metodologia não foi adequada para a seleção dos melhores produtores no presente trabalho, optou-se por uma triagem inicial pelo cultivo dos isolados por FES, em mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p) como substratos, por 96 horas, como descrito no item 2.6.

3.3. Avaliação quantitativa inicial da produção das enzimas e pré-seleção dos melhores produtores

Dos 32 isolados, 26 foram cultivados por FES em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 p/p) como substratos (foram excluídos os pertencentes ao gênero *Aspergillus* devido ao amplo conhecimento de sua produção enzimática de celulasas). O tempo de cultivo de 96 horas foi fixado com base no período requerido para um completo desenvolvimento micelial sobre o substrato (avaliação visual) e também visando-se selecionar um isolado que fosse capaz de produzir quantidades significativas das enzimas em um curto período. Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo foram escolhidos como substratos por serem bons para o crescimento fúngico e para a indução da produção de várias enzimas de degradação de material vegetal em processos de FES (DHILLON et al., 2011; BRIJWANI et al. 2010; TOPAKAS et al., 2003; SONIA et al., 2005).

De acordo com Brijwani et al. (2010) e Leite et al. (2008), farelo de trigo constitui uma boa fonte de carbono e nitrogênio e tem sido usado para produção de celulasas e hemicelulasas. Este resíduo é composto por proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gorduras (6%), vitamina B, celulose (7,57%), hemicelulose (31,19%) e apresenta baixo teor de lignina (4,06%). Além disso, seu grau de porosidade possibilita a transferência de oxigênio e proporciona uma grande área de superfície (BAKRI et al., 2003; BABU; SATYANARAYANA, 1995). O baixo teor de lignina torna este resíduo menos recalcitrante do que o bagaço de cana-de-açúcar e, provavelmente, este é o substrato preferencialmente utilizado pelos fungos nos tempos iniciais de crescimento.

O uso do bagaço de cana-de-açúcar contribui para maior aeração ao meio contendo farelo de trigo, evitando a compactação e facilitando ainda a expansão das hifas. Além disso, o bagaço fornece nutrientes para o crescimento do micro-organismo, consistindo em aproximadamente celulose (50%), hemicelulose (25%), lignina (25%) e de cinzas (2,4%) (PANDEY et al., 2000b).

Entre os 26 fungos cultivados, 7 destacaram-se na produção das enzimas nesta primeira triagem: JCP 1-4, JCP 1-9, JCP 1-15, JCP 1-17, JCP 5-1, DABM 11/45 e DABM 23/45 (Tabela 2). Tais fungos foram pré-selecionados para dar continuidade ao trabalho, especialmente por terem se destacado na produção das celulases, enzimas chave para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar (etapa final do trabalho).

Tabela 2. Produção de celulases e xilanasases pelos isolados.

Atividade Enzimática (U/g de substrato seco)*						
Isolados	Endoglucanase	β -glicosidase	FPase (FPU)	Avicelase	Xilanase	β -xilosidase
JCP 1-2	5,83	2,47	0,02	0,27	6,12	5,70
JCP 1-3	28,30	2,05	0	0,66	6,62	1,23
JCP 1-4	357,51	45,42	0,24	3,58	931,11	1,03
JCP 1-6	68,28	6,96	0,09	4,15	204,26	5,80
JCP 1-7	4,33	2,43	0,20	0,55	3,01	0,50
JCP 1-8	27,02	3,07	0,05	0,43	3,12	0,55
JCP 1-9	260,37	16,97	0,21	1,59	17,26	2,17
JCP 1-11	12,58	14,56	0,04	0,55	7,38	10,57
JCP 1-12	23,62	5,06	0,11	4,25	4,19	4,32
JCP 1-15	142,71	10,51	0,08	2,54	323,96	8,26
JCP 1-16	20,16	5,96	0,11	0,08	79,48	3,48
JCP 1-17	93,99	8,54	0,10	8,32	346,40	6,61
JCP 1-18	33,90	5,21	0,21	0,83	34,98	4,52
JCP 2-1	5,93	2,83	0,10	0,64	6,87	3,21
JCP 3-1	12,37	8,95	0,14	1,21	10,99	2,85
JCP 4-1	30,15	0,76	0,12	2,16	15,86	0,59
JCP 4-2	24,92	0,43	0,09	0,83	5,52	1,00
JCP 5-1	32,93	34,65	0,19	4,25	509,10	1,73
JCP 6-1	20,61	8,55	0,03	0,93	10,18	2,10
JCP 8-1	6,68	4,78	0,13	0,36	9,34	1,13
DABM 10/45	11,02	4,79	0,15	0,17	5,63	3,70
DABM 11/45	43,53	55,08	0,24	0,82	355,33	4,28
DABM 12/45	3,28	1,83	0,02	0,55	7,20	0,87
DABM 23/45	314,27	25,72	0,18	3,30	712,21	0,97
DABM 24/45	15,92	37,92	0,10	0,45	8,61	1,35

* Em todo o texto, U/g refere-se à unidade de atividade enzimática por grama de substrato seco.

As melhores produções de endoglucanase (CMCase) foram obtidas pelos isolados JCP 1-4 (357,51 U/g), JCP 1-9 (260,37 U/g) e DABM 23/45 (314,27 U/g). Bansal et al. (2012) e Ghez (2007), ao avaliarem a produção de endoglucanase pelos fungos *Aspergillus niger* NS-2 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, respectivamente, pelo cultivo por FES utilizando farelo de trigo como substrato, obtiveram 310,6 e 12,30 U/g, em 96h de cultivo. Delabona et al. (2012), ao estudarem o fungo *Aspergillus fumigatus* P40M2, obtiveram produções de endoglucanase de 43,65 U/g pelo cultivo em farelo de trigo, em 120h, e 112,6 U/g pelo cultivo em bagaço de cana, em 72h. Observa-se que as produções obtidas pelos isolados JCP 1-4, JCP 1-9 e DABM 23/45 foram próximas às citadas para *A. niger* NS2 e superiores às citadas para *T. indicae-seudaticae* N3 e *A. fumigatus* P40M2. Jecu (1999) obteve uma produção de endoglucanase 99,30 U/g pelo cultivo do fungo *Aspergillus niger* em farelo de trigo e palha de trigo, por FES, em 96h.

Na produção de β -glicosidase, os isolados DABM 11/45 (55,08 U/g), JCP 1-4 (45,42 U/g), DABM 24/45 (37,92 U/g), JCP 5-1 (34,65 U/g), DABM 23/45 (25,72 U/g) e JCP 1-9 (16,97 U/g), foram os que mais se destacaram. A produção pelo isolado DABM 11/45 é satisfatória quando comparada com dados na literatura, como os citados por Dhillon et al. (2011) que, ao trabalharem com os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, obtiveram produções desta enzima de 21,69 e 13,58 U/g, pelo cultivo por FES em farelo de trigo, em 96h. Leite et al. (2008) relataram produções de 58,0 e 10,0 U/g pelo cultivo dos fungos *Thermoascus auranticus* e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente, por FES em farelo de trigo, em 96h. Quando cultivados por FES em farelo de soja, as produções obtidas foram de 42,0 e 1,5 U/g, respectivamente, em 96h. Badhan et al. (2007b), relatou a produção de 3,83 U/g pelo fungo *Myceliophthora* sp em FES ao utilizar farelo de trigo como substrato, em 120h, que são bem inferiores às obtidas no presente trabalho.

Já em relação à produção de avicelase, os valores obtidos foram baixos. Ghez (2007), ao cultivar o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por FES em farelo de trigo como substrato, obteve também uma baixa produção de avicelase (5,50 U/g). Jatinder et al. (2006) também relatam baixa produção desta enzima pelo fungo termofílico *Melanocarpus* sp utilizando diversas fontes de carbono (palha de arroz: 0,16 U/g; palha de trigo: 0,15 U/g; sabugo de milho: 0,13 U/g) por FES, em 168h. Comumente, os fungos habitantes do rumem como *Neocallimastix* spp (EKINCI et al, 2006) e *Piromyces* spp (ATANASOVA-PANCEVSKA, 2008), destacam-se na produção de avicelase. Provavelmente esta característica de produção de avicelase está ligada à alta cristalinidade do material vegetal ingerido pelos ruminantes associados ao ambiente anaeróbico (De Almeida et al., 2011). Bhat; Bhat (1997), ao estudarem o perfil dos fungos habitantes do rúmen, afirmam que estes micro-organismos apresentam um complexo enzimático similar ao das bactérias anaeróbias, que degradam a celulose cristalina, pela produção de avicelases.

Como se pode observar pelos dados mostrados na Tabela 2, as produções de FPase obtidas foram muito baixas e não são satisfatórias quando comparadas com as citadas na literatura. Cabe ressaltar que foi utilizado o método proposto por Ghose (1987), comumente citado como um método padrão para a determinação da atividade desta enzima. Entretanto, esta metodologia não tem fornecido bons resultados para enzimas de vários fungos, mesmo aqueles que apresentam produções significativas de pelo menos uma das enzimas do complexo celulolítico, como observado no presente trabalho. Desta forma, a atividade de FPase não foi levada em consideração na seleção dos fungos para as etapas posteriores do trabalho.

Com relação à produção de xilanase, os melhores resultados foram obtidos pelos isolados JCP 1-4 (931,11 U/g), DABM 23/45 (712,21 U/g), JCP 5-1 (509,10 U/g), DABM 11/45 (355,33 U/g), JCP 1-17 (346,40 U/g), JCP 1-15 (323,96 U/g) e JCP 1-6 (204,26 U/g). Sonia et al. (2005) ao cultivarem o fungo termofílico *Thermomyces laguginosus* D2W3 por FES utilizando palha de milho como substrato, obtiveram uma produção de xilanase de 10,14 U/g de substrato em 144h. Alam et al. (1994) ao cultivarem o fungo *Thermoascus aurantiacus* BJT 190 por FES em farelo de trigo e bagaço de cana, obtiveram produções de 843,0 U/g e 292,6 U/g, em 168h. Tuohy et al. (1989) conseguiram uma produção de 1.435,0 U/g pelo cultivo do fungo *Thermoascus auranticus* por FES em farelo de trigo, em 120h. As produções de xilanase obtidas no presente trabalho podem ser consideradas significativas, podendo ainda ser otimizadas.

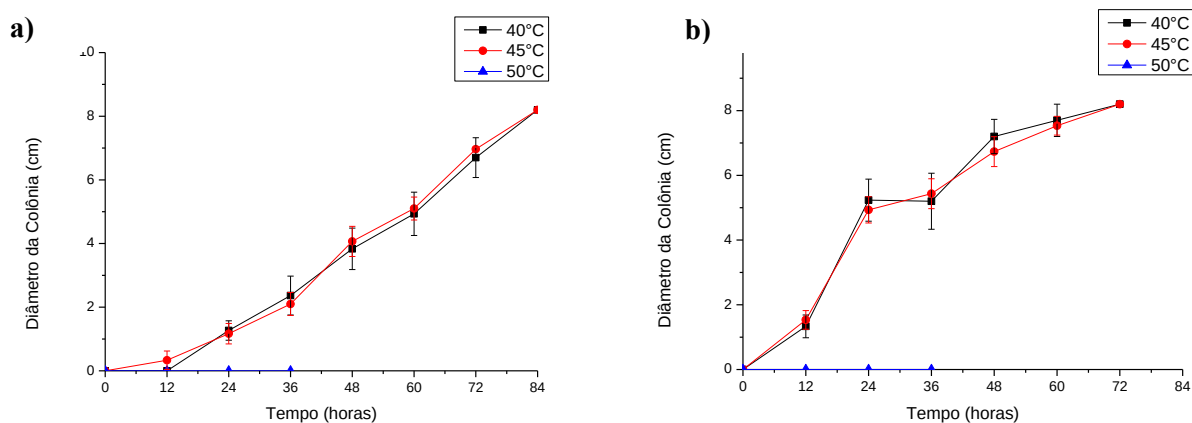
Na produção de β -xilosidase destacaram-se os isolados DABM 10/45 (3,70 U/g); DABM 11/45 (4,28 U/g); JCP 1-12 (4,32 U/g); JCP 1-18 (4,52 U/g); JCP 1-2 (5,70U/g); JCP 1-6 (5,80 U/g); JCP 1-17 (6,61 U/g); JCP 1-15 (8,26 U/g); JCP 1-11 (10,57 U/g). A literatura científica cita vários fungos como produtores de β -xilosidase. Entretanto, a maioria dos dados são obtidos a partir de cultivos por fermentação submersa, tornando difícil a comparação com os resultados do presente trabalho (GUERFALI et al., 2008; SARASWAT; BISARIA, 1997; FLANNIGAN; SELLARS, 1977). Dados de produção desta enzima por FES são discutidos abaixo, no item que se refere ao perfil de produção ao longo do tempo.

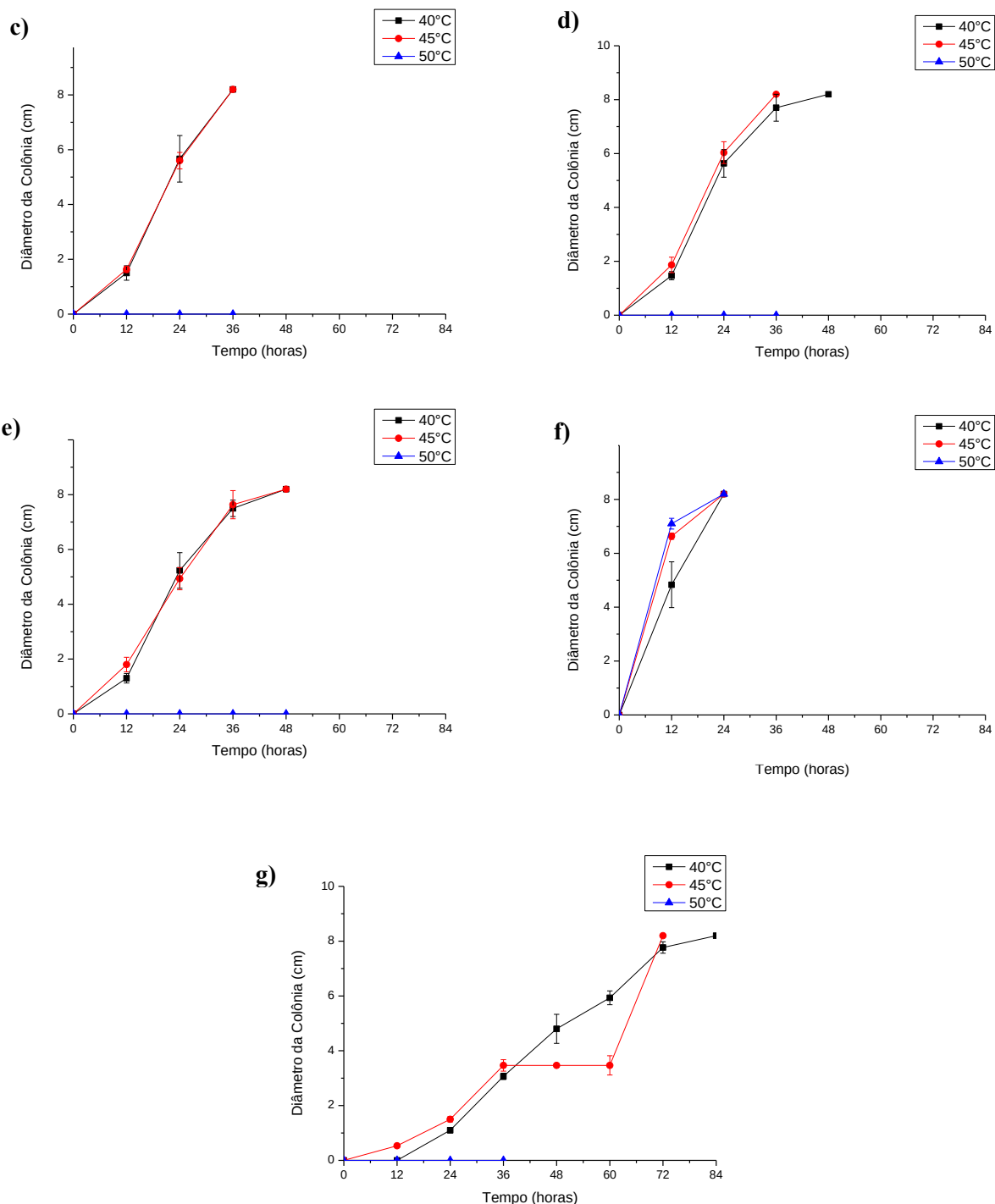
3.4. Avaliação influência da temperatura no crescimento dos isolados pré-selecionados

Segundo Akinyele; Adetuyi (2005), a temperatura é um dos principais fatores ambientais que influenciam o crescimento de muitos micro-organismos. Maheshwari et al. (2000b) classificam os fungos termofílicos como aqueles capazes de crescer em temperaturas entre 20 e 50°C. Tansey; Brock (1972) citam 60-62°C como as temperaturas máximas de crescimento para estes fungos.

Sales-Campos; Andrade (2010) citam a medida do diâmetro das colônias em meio sólido como um método adequado para a avaliação do crescimento fúngico, uma vez que na natureza os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos como resíduos vegetais e animais ou no solo (BONONI et al., 1999). Assim, a fim de se verificar a influência da temperatura no crescimento dos isolados pré-selecionados, estes foram cultivados em placas de Petri contendo agar Sabouraud a 40, 45 e 50°C (item 2.3) e os diâmetros das colônias foram medidos a cada 12 horas. Para todos os isolados, exceto DABM 11-45, a melhor temperatura de crescimento entre as avaliadas foi 45°C, levando-se em consideração o diâmetro do micélio (Figura 2a-g) e a temperatura dos cultivos por FES subsequentes foi, portanto, mantida a 45°C.

Figura 2. Crescimento dos isolados pré-selecionados sob diferentes temperaturas. (a) JCP 1-4; (b) JCP 1-9; (c) JCP 1-15; (d) JCP 1-17; (e) JCP 5-1; (f) DABM 11/45; (g) DABM 23/45.

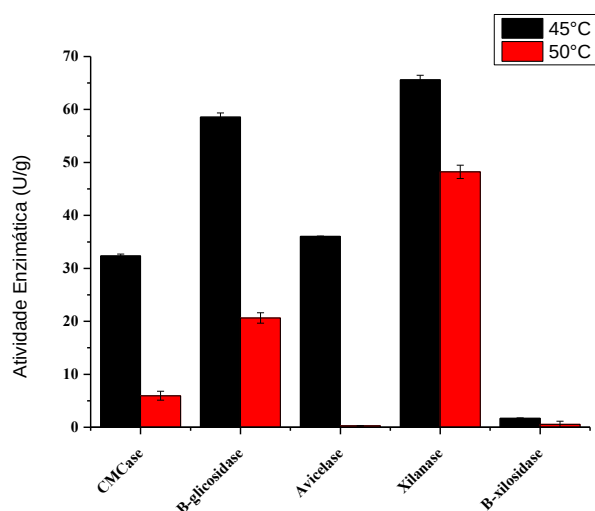




Para o isolado DABM 11/45, o crescimento a 50°C foi ligeiramente maior do que a 45°C nas primeiras 12 horas de cultivo, sendo este um fungo de crescimento rápido, tomando toda a placa em cerca de 24h. A partir deste dado, foi realizado um cultivo por FES em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p) como substratos, como descrito no item 2.6, sendo este cultivo mantido a 50°C, por 96h. Os dados da Figura 3 mostram que as produções enzimáticas foram inferiores às observadas pelos cultivos a 45°C, principalmente em relação à endoglucanase e à avicelase. Neste caso, pode-se

também inferir que, com o aumento da temperatura, as enzimas tenham sofrido desnaturação ou ainda que a umidade do meio de cultivo tenha diminuído consideravelmente, desfavorecendo a produção ou estabilidade das enzimas. Desta forma, os cultivos posteriores utilizando-se este isolado também foram mantidos a 45°C.

Figura 3. Produção de celulases e xilanases pelo isolado DABM 11/45, por FES, em bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p), a 45 e 50°C, em 96h.



3.5. Avaliação da influência de diferentes substratos lignocelulósicos na produção das enzimas pelos isolados pré-selecionados

A fim de se avaliar a influência de outros substratos na produção das enzimas, buscando-se melhores rendimentos, os isolados pré-selecionados JCP 1-4, JCP 1-9, JCP 1-15, JCP 1-17, JCP 5-1, DABM 11/45 e DABM 23/45 foram cultivados por FES em diferentes misturas de materiais lignocelulósicos, embora estes experimentos não estivessem previstos no cronograma inicial do Projeto.

Materiais ricos em polissacarídeos são bons substratos para o cultivo de fungos filamentosos por FES, dadas as propriedades estruturais e composicionais que favorecem sua utilização como suporte e fonte de nutrientes (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, 2010).

Os substratos sólidos utilizados na FES devem possuir partículas de porosidade e tamanho adequados, com grande área superficial por unidade de volume, para facilitar a acessibilidade e a penetração do organismo intra e interpartículas. Os substratos lignocelulósicos escolhidos para esta

etapa do trabalho foram misturas (1:1 p/p) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja ou farelo de aveia e também mistura de bagaço de cana tratado por explosão a vapor e farelo de trigo.

O bagaço submetido à explosão a vapor é menos recalcitrante, pois este tratamento promove deslignificação, diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose e hidrólise parcial ou total da hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Esta característica de menor recalcitrância tende a favorecer o crescimento dos fungos e a indução da produção das celulasas, proporcionando maiores rendimentos.

Farelo de soja e farelo de aveia também tem sido citados na literatura como bons indutores da produção de enzimas celulolíticas (KALOGERIS et al., 2003; JAIN et al., 1979; LEITE et al., 2008; BADHAN et al., 2007b; DELABONA et al., 2012).

Os isolados pré-selecionados foram cultivados nestas novas misturas e a produção das enzimas foi avaliada após 96h de cultivo. A Tabela 3 traz as produções máximas das enzimas para cada isolado.

Tabela 3. Produções máximas de celulasas e xilanases obtidas pelo cultivo dos isolados pré-selecionados em diferentes misturas de substratos, por FES, em 96h.

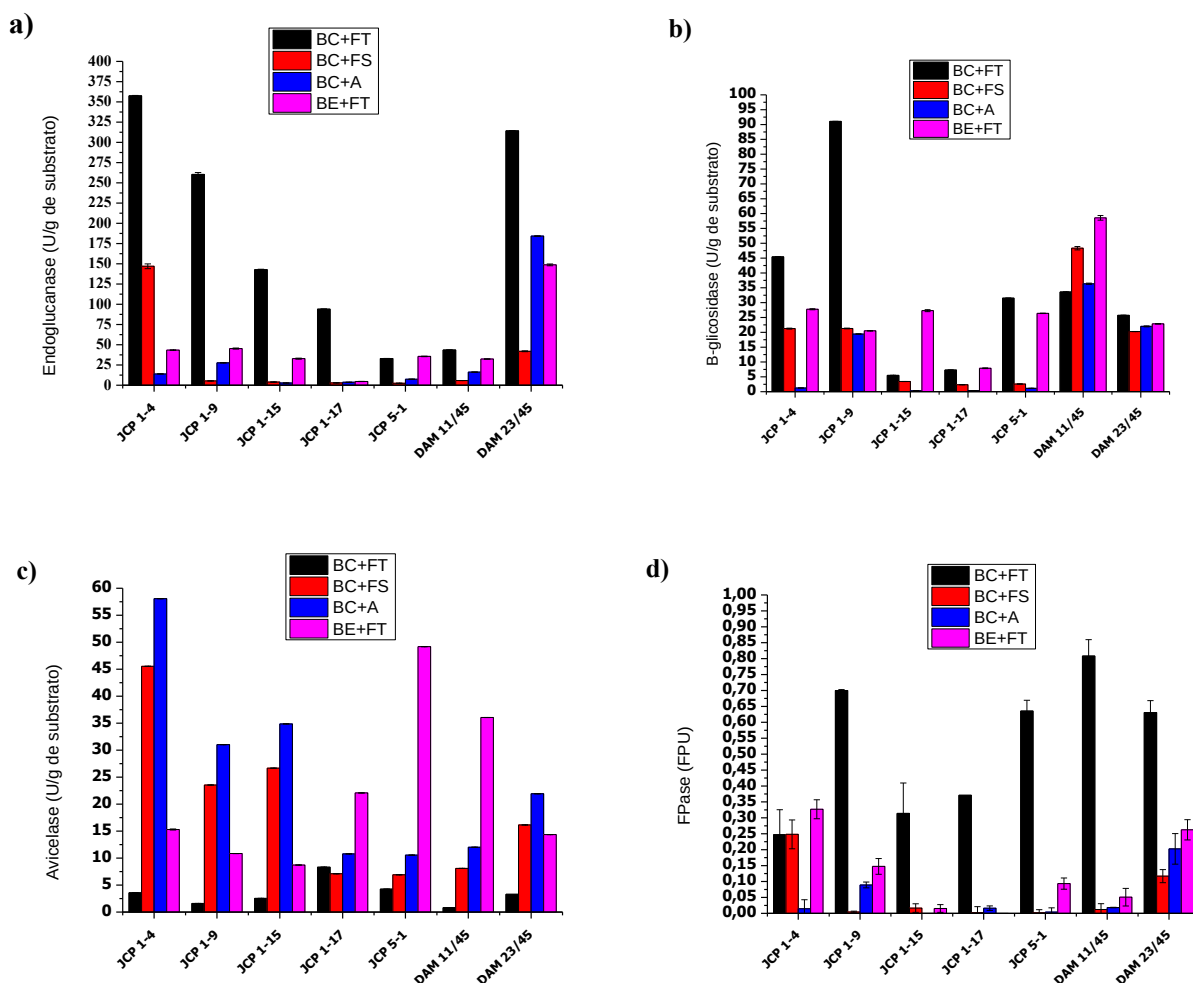
Isolado	Enzimas					
	CMCase (U/g)	β -glicosidase (U/g)	Avicelase (U/g)	FPase (FPU)	Xilanase (U/g)	β -xilosidase (U/g)
JCP 1-4	146,90	21,20	45,50	0,25	512,60	1,39
JCP 1-9	260,40	91,0	1,60	0,70	17,20	1,30
JCP 1-15	142,70	5,50	2,54	0,31	323,90	11,90
JCP 1-17	93,90	7,30	8,30	0,37	346,40	9,80
JCP 5-1	32,9	31,5	4,2	0,64	509,1	2,5
DABM 11/45	32,40	58,60	36,00	0,05	65,60	1,70
DABM 23/45	180,20	22,0	22,0	0,20	364,20	0,70

Em relação à produção das celulasas (Figura 4 a-d), os isolados que mais se destacaram na produção de endoglucanase na triagem inicial em bagaço de cana e farelo de trigo foram (JCP 1-4, JCP 1-9 e DABM 23/45) enquanto os cultivos nas demais misturas de substratos não proporcionaram melhores produções da enzima (Figura 4a). Para JCP 1-4 e JCP 1-9 a produção foi bem inferior, enquanto que para DABM 23/45 a produção praticamente manteve-se no mesmo nível em meio com bagaço de cana explodido e farelo de trigo.

Já em relação à β -glicosidase (Figura 4 b), os isolados que mais se destacaram na primeira triagem (cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo) foram JCP 1-4, JCP-19, JCP 5-1, DABM 11/45 e DABM 23/45. Entre estes fungos, apenas DABM 11/45 produziu maiores quantidades da enzima quando cultivado nas demais misturas de substratos: 48,34 U/g em bagaço de cana e farelo de soja; 36,35 U/g em bagaço de cana e aveia e 58,56 U/g em bagaço explodido e farelo de trigo.

O cultivo inicial em bagaço de cana e farelo de trigo não havia favorecido a produção de avicelase para os isolados citados acima. Entretanto, quando cultivados nas demais misturas de substratos, a produção da enzima foi significativamente induzida, destacando-se o isolado JCP 1-4 como o melhor produtor (58,08 U/g quando cultivado em bagaço de cana e aveia) (Figura 4c).

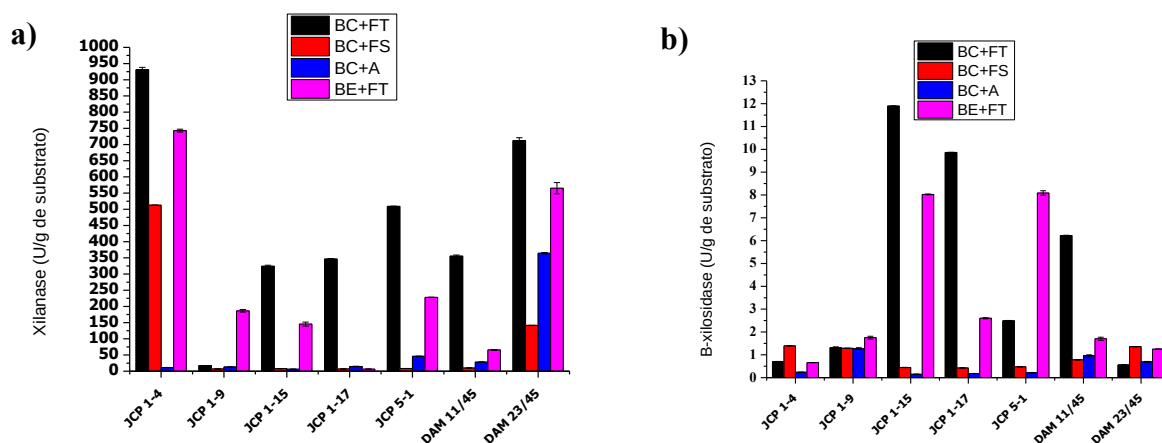
Figura 4. Produção de celulasas pelos isolados pré-selecionados: endoglucanase (a), β -glicosidase (b), avicelase (c) e FPase (d). Triagem inicial em bagaço de cana e farelo de trigo (BC+FT) e demais cultivos em bagaço de cana e farelo de soja (BC+FS), bagaço de cana e aveia (BC+A) e bagaço de cana submetido à explosão a vapor e farelo de trigo (BE+FT). Todas as misturas foram utilizadas na proporção 1:1 (p/p) e os cultivos foram mantidos por 96h, como descrito no 3.6.



Em relação à xilanase, os cultivos nas novas misturas de substratos não favoreceram a produção da enzima (Figura 5a). Nestes cultivos, as maiores produções foram observadas para JCP 1-4 (742,97 U/g em bagaço explodido e farelo de trigo) e DABM 23/45 (364,25 U/g em bagaço de cana e aveia).

De modo geral, a produção de β -xilosidase manteve-se baixa (Figura 5b). Apenas o isolado JCP 5-1 teve a produção desta enzima induzida pelo cultivo em bagaço explodido e farelo de trigo (8,09 U/g), em comparação com a produção obtida na triagem inicial (2,49 U/g).

Figura 5. Produção de xilanases pelos isolados pré-selecionados: endoxilanase (a) e β -xilosidase (b). Triagem inicial em bagaço de cana e farelo de trigo (BC+FT) e demais cultivos em bagaço de cana e farelo de soja (BC+FS), bagaço de cana e aveia (BC+A) e bagaço de cana submetido à explosão a vapor e farelo de trigo (BE+FT). Todas as misturas foram utilizadas na proporção 1:1 (p/p) e os cultivos foram mantidos por 96h, como descrito no item 3.6.



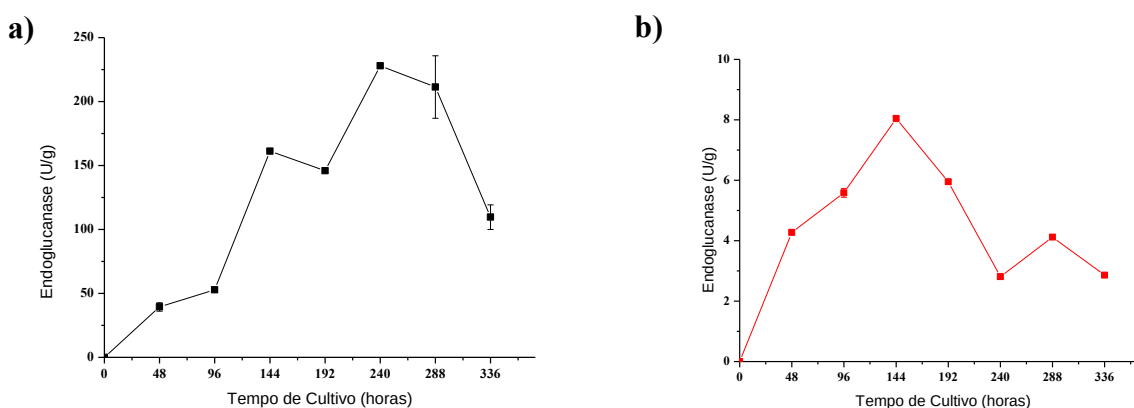
A partir destes dados, os isolados JCP 1-4 e DABM 11/45 foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, por terem se destacado na produção das celulases, especialmente em relação à β -glicosidase (enzima-chave para a sacarificação) e avicelase (importante para a hidrólise da celulose microcristalina) (Tabela 3) e levando-se ainda em consideração a escassez de dados na literatura referentes a esta última enzima. Os isolados JCP 1-9, JCP 1-15 e DABM 23/45 se destacaram na produção de endoglucanase e β -glicosidase, mas não na produção de avicelase. Foram selecionados apenas dois isolados, a fim de não comprometer o cronograma de execução do Projeto com um número elevado de experimentos. Os isolados JCP 1-9 e DABM 23/45 foram direcionados para trabalhos em paralelo realizados pelo Grupo de Pesquisa.

Nas etapas subsequentes do trabalho, os isolados selecionados JCP 1-4 e DABM 11/45 foram cultivados nos substratos que mais favoreceram a produção das celulases: mistura de bagaço de cana e farelo de soja e mistura de bagaço de cana explodido e farelo de trigo, respectivamente.

3.6. Influência do tempo de cultivo na produção das enzimas

Os isolados JCP 1-4 e DABM 11/45 foram cultivados por FES, por até 336h, e as produções das celulasas e xilanases foram avaliadas tomando-se amostras a cada 48h. Os picos de produção de endoglucanase foram obtidos em 240h (227,97 U/g ou 22,97U/mL) e 144h (8,04 U/g ou 0,804 U/mL), respectivamente (Figura 6 a-b).

Figura 6. Perfil de produção de endoglucanase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em mistura de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.

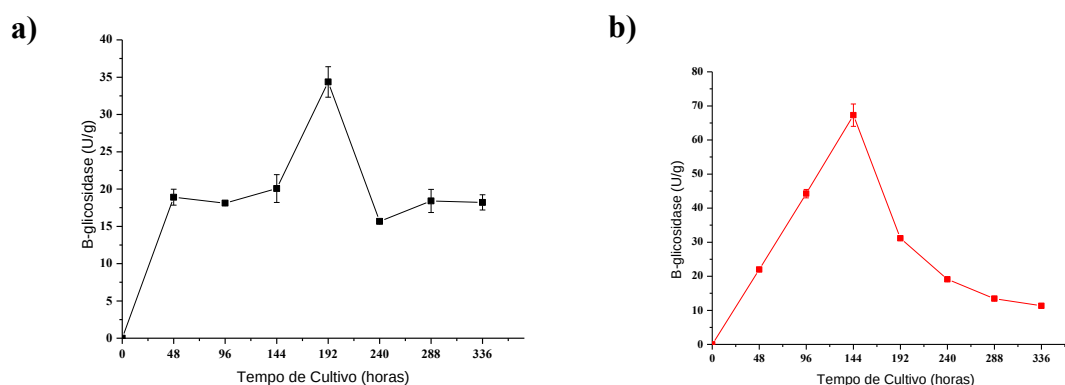


Jatinder et al. (2006) obtiveram produções máximas de endoglucanase de 27,6 e 38,1 U/g por FES em 168h, utilizando como substratos farelo de trigo e bagaço de cana pelo fungo *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, respectivamente. A produção de endoglucanase por alguns fungos mesofílicos chega a ser semelhante à obtida pelo cultivo do isolado JCP 1-4. Delabona et al. (2012) ao traçarem o perfil de produção da endoglucanase do fungo *Aspergillus fumigatus* P40M2, obtiveram uma produção máxima de 160,1 U/g em farelo de soja, 122,8 U/g em farelo de trigo e 112,6 U/g em bagaço de cana com farelo de trigo, todos em 72h. Monte et al. (2012) ao estudarem o fungo *Thermoascus auranticus*, obtiveram uma produção máxima de endoglucanase (108,9 U/g) em 216h de cultivo por FES em bagaço de cana. Resultados semelhantes com os do isolado JCP 1-4 são encontrados no trabalho de Bansal et al. (2012), que ao estudar o fungo *Aspergillus niger* NS – 2 em FES utilizando farelo de trigo como substrato durante 96h de fermentação, obtiveram uma produção máxima de 296 U/g. Estes estudos ressaltam a boa produção de CMCase pelo isolado termofílico JCP 1-4 presente no estudo.

Em relação à β -glicosidase, as produções máximas foram observadas em 192h para o isolado JCP 1-4 (34,36U/g ou 3,43 U/mL) e 144h para o isolado DABM 11/45 (67,27U/g ou 6,72 U/mL) (Figura 7 a-b). Estas produções são próximas ou superiores às obtidas por outros autores, em

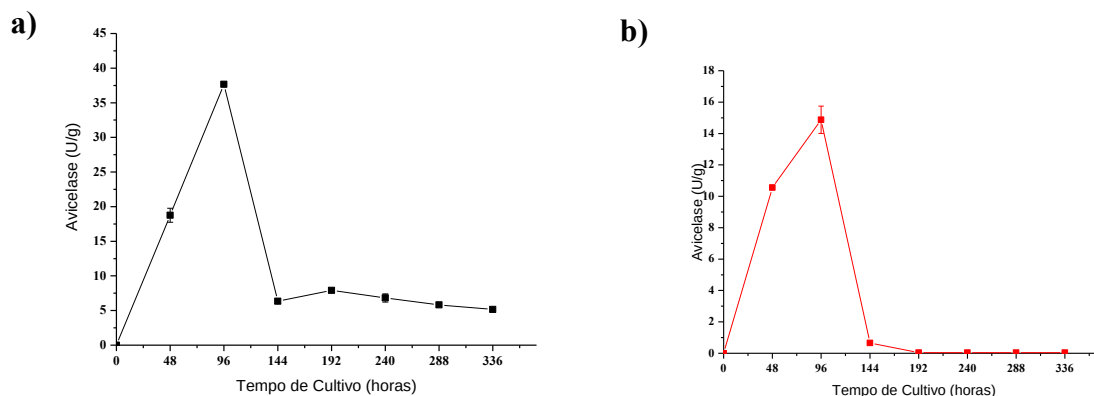
estudos com fungos termofílicos. Quando cultivado por FES em farelo de trigo ou bagaço de cana, por 168h, o fungo *Melanocarpus* sp produziu 31,4 e 37,40U/g, respectivamente (JATINDER et al., 2004). Resultados semelhantes podem ser encontrados em trabalho realizado por Leite et al. (2008) que, ao cultivarem o fungo termofílico *Thermoascus auranticus* por FES em farelo de trigo, obtiveram uma produção máxima de 70 U/g em 72h de cultivo. Já Monte et al. (2010) cultivaram *T. auranticus* em farelo de trigo e bagaço de cana e obtiveram produções máximas de 1,7 e 7,2 U/g, respectivamente, em 216h. Bansal et al. (2012) ao utilizarem o fungo *Aspergillus niger* NS-2 por FES em farelo de trigo, obtiveram uma máxima produção de β -glicosidase de 32 U/g em 96h de fermentação. Estes resultados destacam a significativa produção de β -glicosidase pelo isolado DABM 11/45.

Figura 7. Produção de β -glicosidase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.



Em relação à atividade de avicelase, as produções máximas foram obtidas em 96h de fermentação, para ambos os isolados (JCP 1-4: 37,67U/g; DABM 11/45: 14,87U/g (Figura 8 a-b). Esta produção é significativa quando comparada com as de outros fungos termofílicos citadas na literatura.

Figura 8. Produção de avicelase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo.

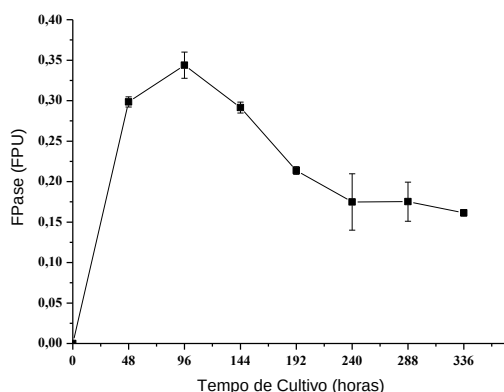


Jatinder et al. (2006) obtiveram produção máxima de 0,54 U/g em 168h, pelo cultivo de *Melanocarpus* sp por FES em farelo de trigo. Ögel et al. (2001), citam a produção máxima de 0,13 U/mL, em 192h, pelo cultivo de *Scytalidium thermophilum* por FES em farelo de trigo.

Fungos mesofílicos importantes em produção celulolítica como os do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* apresentaram também baixa produção na atividade de avicelase. Macris; Galiotou-Panayotou (1985), ao estudarem os mutantes *Aspergillus ustus* WT, *Aspergillus ustus* M22, *Aspergillus ustus* M35, *Trichoderma harzianum* WT, *Trichoderma harzianum* M5 e *Trichoderma harzianum* M19, obtiveram produções de 0,11, 0,27, 0,32, 0,32, 0,40 e 0,35 U/mL, respectivamente, em 144h, pelo cultivo em FES.

Com relação à atividade de FPase, o isolado JCP 1-4 apresentou baixa produção (Figura 9 a-b). Já para o isolado DABM 11/45, a produção foi desprezível, com 0,05 FPU. Jain et al. (1979) ao estudarem a produção de FPase pelo fungo termotolerante *Aspergillus fumigatus* e pelos termofílicos *Humicola insolens* 1, *H. insolens* 2, *H. laguginosa*, *Malbranchea pulchella*, *Mucor miehei*, *Talaromyces dupontii* e *Torula thermophila*, por FES, utilizando farelo de trigo como substrato, conseguiram produções de 5,37, 6,43, 2,09, 1,59, 9,52, 0,19, 0,11 e 10,31 FPU, respectivamente, em 120h. Os resultados obtidos no presente trabalho são bem inferiores, mesmo tendo os isolados apresentado significativas produções das enzimas endoglucanase, avicelase e/ou β -glicosidase, o que mais uma vez indica que a seleção dos fungos com base na produção de FPase não é adequada.

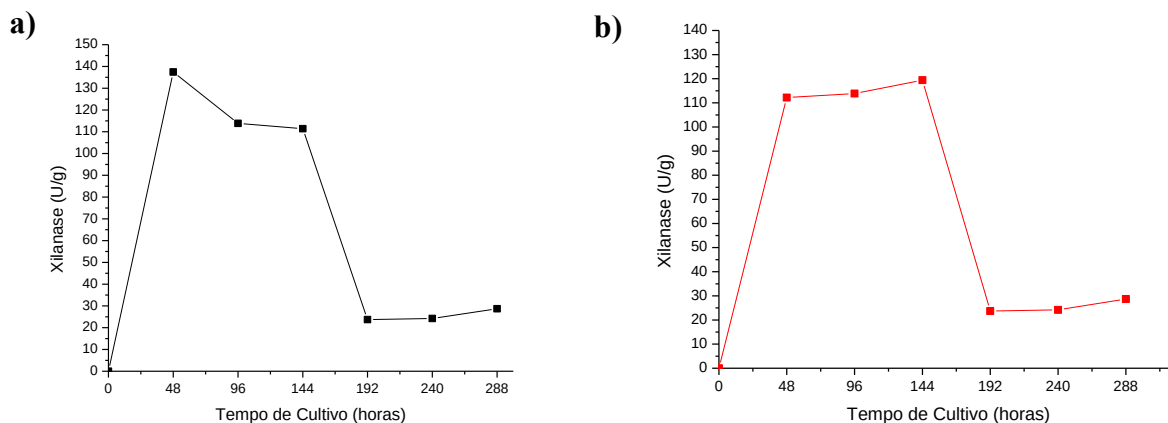
Figura 9. Perfil de produção de FPAse ao longo do tempo pelo isolado JCP 1-4, por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.



Delabona et al. (2012), ao avaliarem a produção de celulases totais por *Aspergillus fumigatus* cultivados por FES em bagaço de cana e farelo de trigo, obtiveram em 96 horas 5,0 FPU. Grigorevski-Lima et al. (2009), relatam a produção de 5,35 FPU cultivando o fungo *Aspergillus fumigatus*, por FES, em farelo de trigo, por 96h. Também utilizando *A. fumigatus*, Soni et al. (2010) e Sukumaran et al. (2009) obtiveram 2,11 FPU e 4,55 FPU pelo cultivo em farelo de trigo, por FES, em 96h. Utilizando *Aspergillus ellipticus*, Gupta; Madamwar (1997) relataram uma produção de 3,75 FPU durante o cultivo por FES em bagaço de cana como substrato.

Em relação à xilanase, as produções máximas foram obtidas em 48h de fermentação para o isolado JCP 1-4, (137,46U/g) e em 96h para o isolado DABM 11/45 (113,86U/g) (Figura 10 a-b).

Figura 10. Produção de xilanase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.

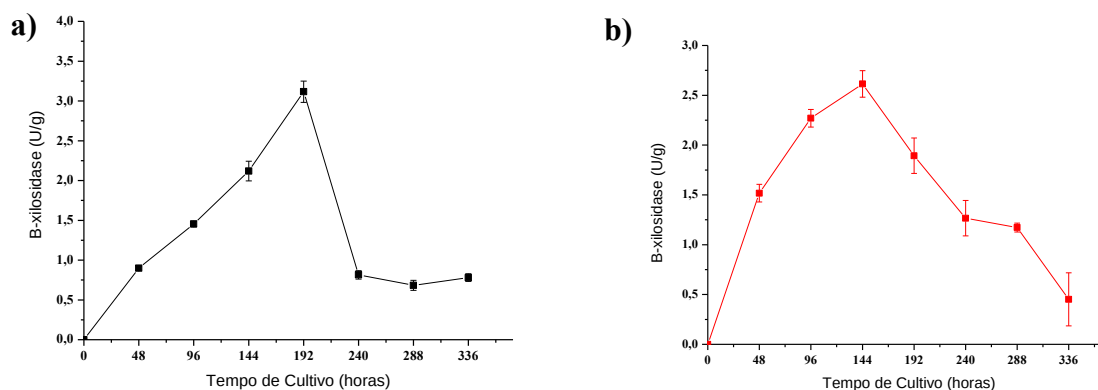


Em 120h de FES, Simões et al. (2009) obtiveram 18,9 U/mL e 36,6 U/mL de xilanase, em farelo de trigo como substrato, utilizando os fungos *Mucor circinelloides* e *Rhizopus microsporus*, respectivamente. Monte et al. (2010), ao estudarem o perfil de produção de xilanase do fungo *Thermoascus auranticus* em FES utilizando bagaço de cana como substrato, obtiveram 978,1 U/g em 216h de cultivo, enquanto que em farelo de trigo a produção foi de 1315,9 U/g. Estes dados de fungos termofílicos levam-nos a concluir que os isolados utilizados no trabalho apresentam boa produção de xilanase. Moretti et al. (2012) ao estudar o fungo *Myceliophthora thermophila* M 7.1 cultivado em bagaço de cana com farelo de trigo em FES obteve uma produção de 1040 U/g de xilanase. Gao et al. (2008) e Kang et al. (2004), obtiveram 243 U/g e 19,5 U/g, respectivamente, de xilanase ao estudar os micro-organismos *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* KK2 em farelo de trigo.

Segundo Polizeli et al. (2005), as xilanases são produzidas tanto por fermentação submersa quanto em estado sólido. Contudo, cerca de 80 a 90% da produção de xilanase citada na literatura provém de cultivos submersos. Na literatura podem ser encontradas várias referências citando fungos termofílicos e termotolerantes cultivados por fermentação submersa para a produção de xilanases: *Melanocarpus albomyces* IIS 68 (MAHESHWARI; KAMALAM, 1985), *Neurospora crassa* 870 (MISHRA et al., 1984), *Paecilomyces varioti* IMD RK 032 (KELLY et al., 1989), *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 (BRANA-CASTILLO; BERRY, 1992).

De modo geral, a atividade de β -xilosidase foi baixa ao longo de todo o percurso fermentativo (Figura 11 a-b), sendo os picos observados em 144 e 192h, para os isolados JCP 1-4 (3,11U/g) e DABM 11/45 (2,61 U/g).

Figura 11. Perfil de produção de β -xilosidase ao longo do tempo pelos isolados JCP 1-4 (a) e DABM 11/45 (b), por FES, em misturas de bagaço de cana com farelo de soja e bagaço explodido com farelo de trigo, respectivamente.



A β -xilosidase é uma enzima que, ao contrário das xilanases, permanece ligada às células ou solúveis no citosol em algumas bactérias e leveduras (BAJPAI; CENTRE, 2009). Dessa maneira, nestes micro-organismos, xilo-oligossacarídeos devem entrar na célula antes do processo de hidrólise (BIELY, 1985) ou ser hidrolisados próximo à parede celular. Em relação aos fungos filamentosos, as β -xilosidases ficam associadas ao micélio durante o crescimento, sendo secretadas para o meio externo com o passar do tempo ou caso ocorra lise celular (WONG; SADDLER, 1992).

Guerfali et al. (2008), ao cultivarem o fungo termofílico *Talaromyces thermophilus* em farelo de trigo, por fermentação submersa, obtiveram em 120h uma produção de 0,5 U/mL. Monte et al. (2010) cultivaram o fungo termofílico *Thermoascus auranticus* por FES em bagaço de cana, farelo de trigo, palha de cana, e sabugo de milho e obtiveram produções de 0,8, 0,4, 2,2 e 25,2 U/g, respectivamente, em 216h. Saraswat; Bisaria (1997) cultivaram o fungo termofílico *Melanocarpus albomyces* por fermentação submersa em palha de trigo como fonte de carbono e obtiveram uma produção 0,76 U/mL em 160h de cultivo. Flannigan; Sellars (1977) por outro lado, demonstraram uma expressiva produção de β -xilosidase ao estudar os fungos termotolerantes *Aspergillus fumigatus* S1 (23,82 U/mL), *Thermoascus crustaceus* S6 (20,18 U/mL) e *Aspergillus corymbifera* S26 (1,44 U/mL) em fermentação submersa durante 168h.

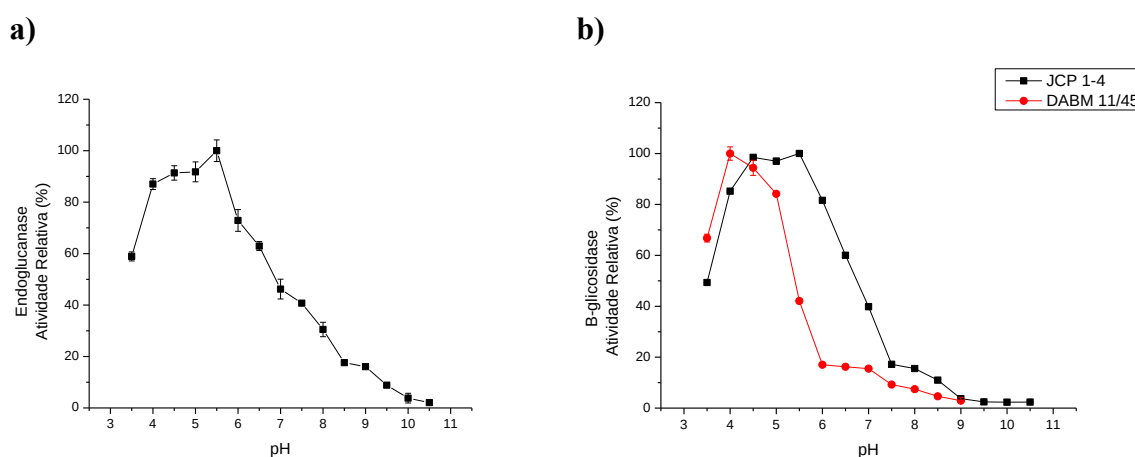
3.7. Caracterização físico-química das enzimas

Os fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 foram cultivados por FES, sob as condições e substratos selecionados (bagaço de cana com farelo de soja para JCP 1-4 e bagaço de cana explodido com farelo de trigo para DABM 11/45), por 192 e 144 horas, respectivamente, e os extratos enzimáticos foram usados para a caracterização das enzimas endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e β -xilosidase. Os tempos de cultivo foram fixados com base na produção satisfatória das enzimas do complexo celulolítico. Para a caracterização da avicelase, ambos foram cultivados por 96h (pico de produção da enzima).

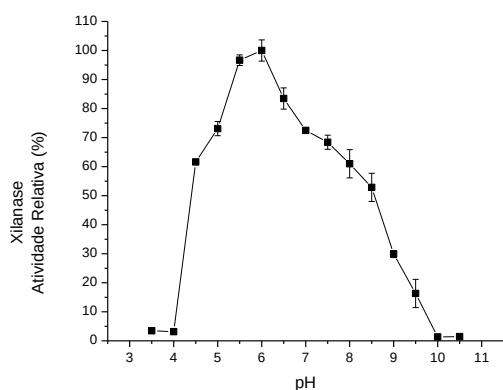
3.7.1. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

De acordo com as melhores produções enzimáticas dos isolados JCP 1-4 (endoglucase, avicelase, β -glicosidase e xilanase) e DABM 11/45 (β -glicosidase), o pH ótimo de atividade para as enzimas endoglucanase e β -glicosidase de JCP 1-4 foi 5,5. A avicelase e a xilanase produzidas por esse isolado foram mais ativas em pH 5,0 e 6,0, respectivamente. Para a β -glicosidase de DABM 11/45, o pH ótimo de atividade foi 4,0 (Figura 12 a-d).

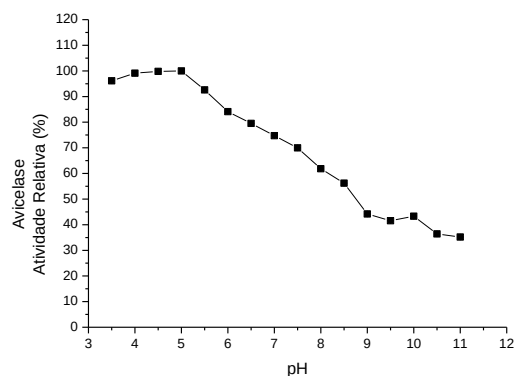
Figura 12. Influência do pH sobre as atividades de endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase do fungo JCP 1-4 (d).



c)



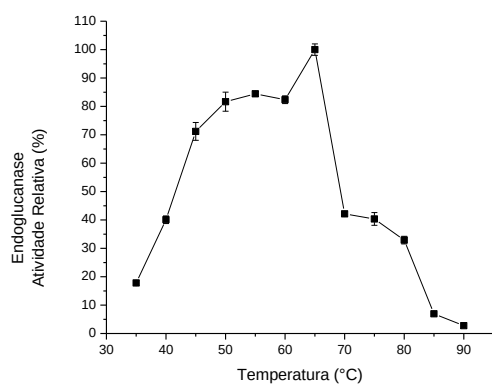
d)



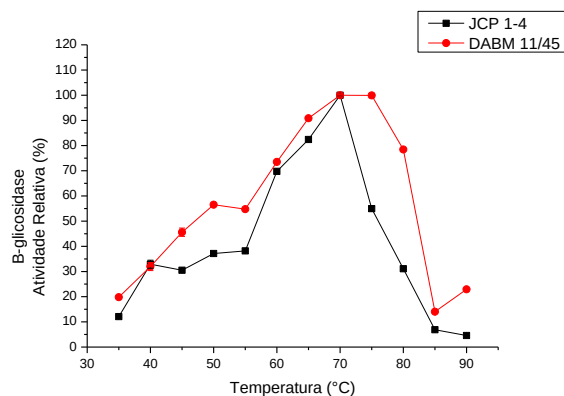
As enzimas endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e avicelase do fungo JCP 1-4 apresentaram temperatura ótimas de atividade de 65°C, 70°C, 55°C e 60°C, respectivamente. A β -glicosidase do fungo DABM 11/45 apresentou uma temperatura ótima de atividade de 70°C (Figuras 13 a-d).

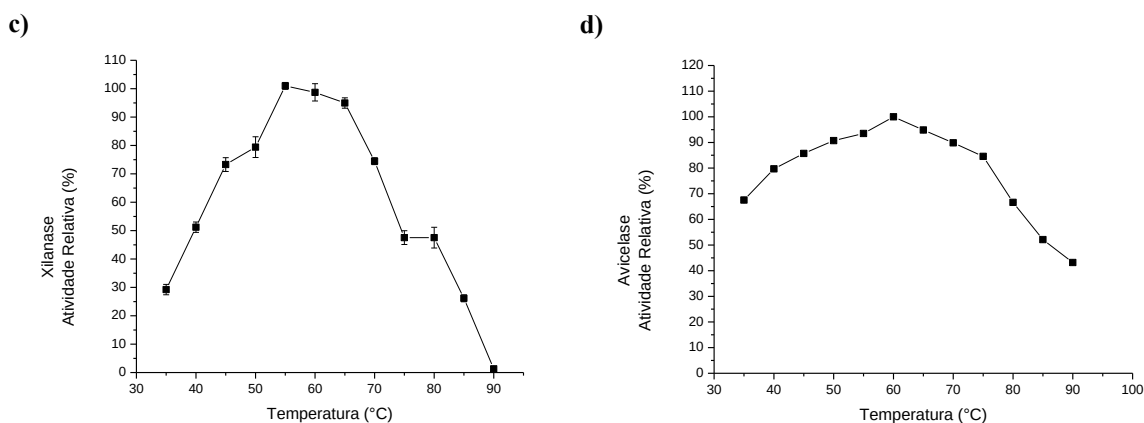
Figura 13. Influência da temperatura sobre as atividades de endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase do fungo JCP 1-4 (d).

a)



b)

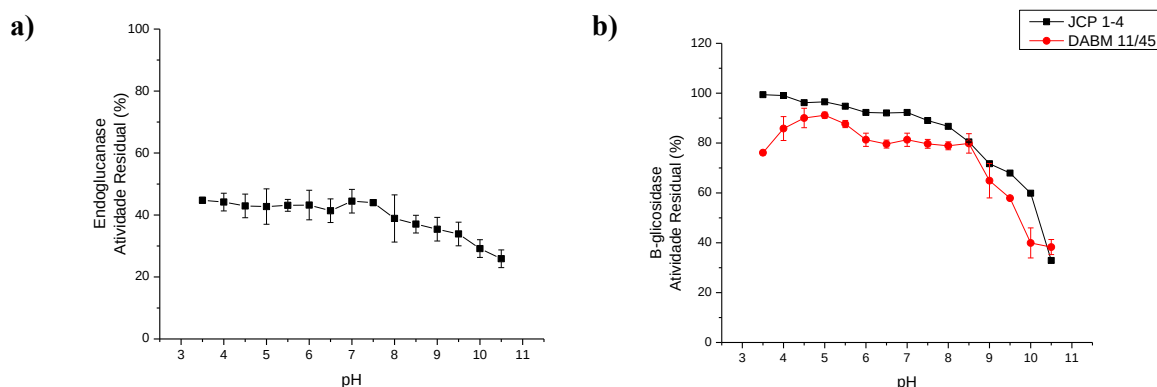


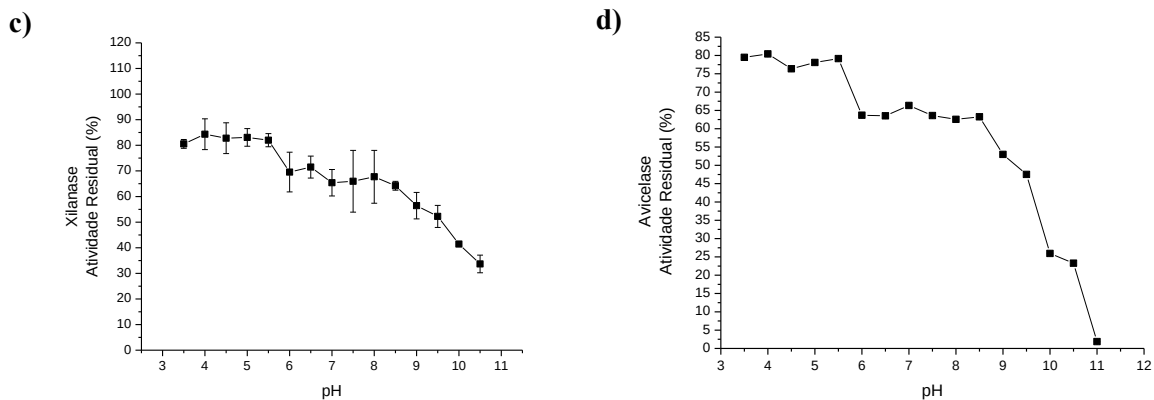


3.7.2. Influência do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas

A endoglucanase de JCP 1-4 foi a enzima menos estável à variações do pH, como pode-se observar pela Figura 14a, mantendo menos de 50% de sua atividade após incubação em valores de pH de até 7,5. A β -glicosidase deste fungo manteve entre 90 e 100% de sua atividade original após incubação em valores de pH entre 3,5 e 7,0. Já a β -glicosidase do isolado DABM 11/45 manteve entre 70 e 90% de sua atividade quando incubada na faixa de pH de 3,5 a 8,5 (Figura 14b). Após a incubação na faixa de pH de 3,5 a 5,5, cerca de 80 a 85% da atividade da xilanase do isolado JCP 1-4 foram mantidos (Figura 14c). Entre pH 3,5 a 8,5 a avicelase do fungo JCP 1-4 manteve cerca de 63% de sua atividade original.

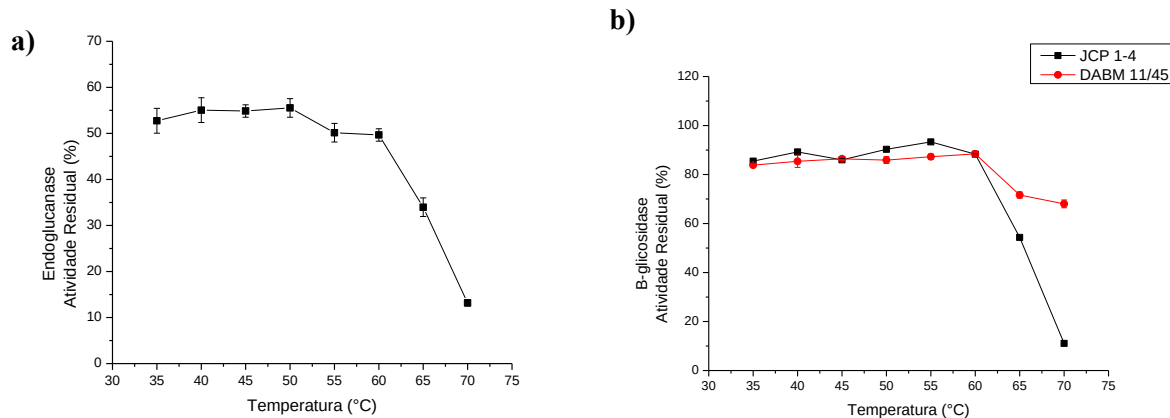
Figura 14. Condições de estabilidade sob pH da endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase (c) e avicelase (d) do fungo JCP 1-4 (c). Todas atividades foram realizadas após 1h de reação.

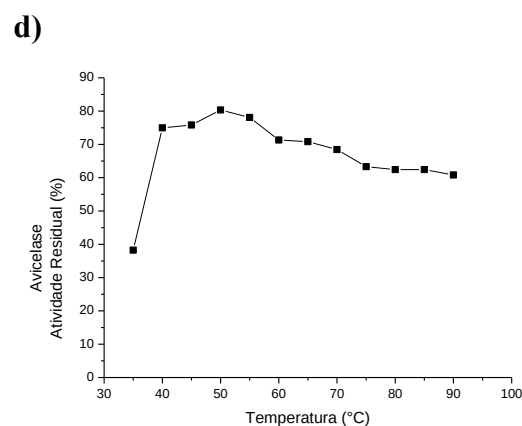
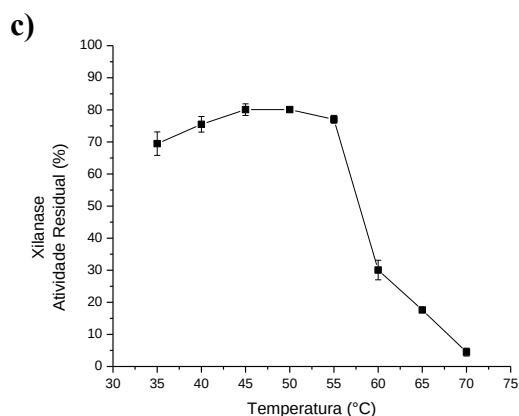




Em relação à termoestabilidade, a endoglucanase de JCP 1-4 manteve entre 50 e 55% de sua atividade até 60°C. As β -glicosidases avaliadas neste trabalho foram mais estáveis frente a variações de temperatura: até 60°C, a enzima de JCP -14 manteve entre 80 e 85% de sua atividade original e, nesta mesma faixa de temperatura, a enzima de DABM 11/45 teve um comportamento semelhante. Em até 60°C, a avicelase de JCP 1-4 manteve 71% de sua atividade original. Já a xilanase de JCP -14 manteve entre 76 e 79% de sua atividade até 55°C (Figura 15 a-d) .

Figura 15. Condições de termoestabilidade da endoglucanase do fungo JCP 1-4 (a), β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45 (b), xilanase do fungo JCP 1-4 (c) e avicelase (d).





A Tabela 4 traz um resumo das características físico-químicas de algumas celulasas e xilanases fúngicas. De modo geral, os dados obtidos no presente trabalho são comparáveis com os relatados na literatura. Em relação à endoglucanase de JCP 1-4, foi observada melhor atividade em pH mais próximo à neutralidade, diferente de grande parte das endoglucanase citadas na literatura. Já a xilanase do fungo JCP 1-4 apresentou temperatura ótima de atividade superior quando comparada a algumas destas enzimas fúngicas citadas na literatura. Algumas enzimas dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45, como xilanase e β -glicosidase, apresentaram maior estabilidade ao pH e à temperatura quando comparadas com dados na literatura.

Como já comentado, são poucos os dados encontrados na literatura na produção de avicelase por fungos filamentosos, principalmente quando se utiliza resíduos agroindustriais como substrato para FES. Contudo, o fungo JCP 1-4 demonstrou ótima atividade em valores de pH e temperatura e estabilidade superior aos dados encontrados na literatura.

Tabela 4. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.

		Condições ótimas		Condições de estabilidade		
Enzima	Micro-organismo	pH	Temperatura	pH	Temperatura	Referência
Endoglucanase	<i>Penicillium sp</i>	5	55			Durand (1984)
	<i>Thielavia terrestris</i>	5	60	3,0-	-	
	<i>Trichoderma reesei</i>	5	60	7,0		
	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>	5	60			
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	3,5-4,0	75	5,0-8,0	42-70	Kalogeris et al. (2003)
	<i>Acremonium sp</i> EA0810	5	70	4,5-6,0	50-70	De Almeida et al. (2011)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	5	50	4,0-8,0	40-60	Liu et al. (2011)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> P40M2	3	65		-	Delabona et al. (2012)

Tabela 4 cont. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.

Enzima	Micro-organismo	Condições ótimas		Condições de estabilidade		Referência
		pH	Temperatura	pH	Temperatura	
Endoglucanase	<i>Aspergillus fumigatus</i> M7.1	4,5				Moretti et al. (2012)
	<i>Myceliophthora thermophila</i> M7.7.	5	70	5,0-10,0	35-65	
	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	3	70	4,5-5,5	30-60	Ang et al. (2013)
	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	4	60	3,0-7,0	40-50	Falkoski et al. (2013)
	JCP 1-4	5,5	65	3,0-7,5	30-60	Presente trabalho
β-glicosidase	<i>Penicillium SP</i>		60			Durand (1984)
	<i>Thielavia terrestris</i>		67			
	<i>Trichoderma reesei</i>	5		3,0-7,0	-	
	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>		65			
			60			

Tabela 4 cont. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.

Enzima	Micro-organismo	Condições ótimas		Condições de estabilidade		Referência
		pH	Temperatura	pH	Temperatura	
B-glicosidase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4,5	80	5,0-8,0	42-70	Kalogeris et al. (2003)
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	75	4,5-10,0	35-75	Leite et al. (2008)
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4,5		4,5-8,0	35-70	
	<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	3,0-5,0	70	1,0-10,0	45-75	Ng et al. (2010)
	<i>Acremonium sp</i> EA0810	4,5	60	4,0-7,0	55-60	De Almeida et al. (2011)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	4	70	4,5-6,5	30-60	Ang et al. (2013)
	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	4	55	3,0-7,0	40-50	Falkoski et al. (2013)
	JCP 1-4	5,5	70	3,0-7,0	30-60	Presente trabalho
	DABM 11/45	4,0	70	3,0-8,5	35-60	
Xilanase	<i>Penicillium SP</i>		60			
	<i>Thielavia terrestris</i>		65			
	<i>Trichoderma reesei</i>	5		3,0-7,0	-	Durand (1984)
	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>		60			
			60			

Tabela 4 cont. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.

Enzima	Micro-organismo	Condições ótimas		Condições de estabilidade		Referência
		pH	Temperatura	pH	Temperatura	
Xilanase	<i>Thermoascus auranticus</i>	5	70	5,0-10,0	35-70	Alam et al. (1994)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6				
	<i>Fusarium oxysporum</i>	8	50	3,0-9,0	40-45	Christakopoulos et al. (1996)
	<i>Aspergillus oryzae</i>		60			
	<i>Gliocladium viride</i>	6	50	5,0-6,0	4,0-7,0	Christov et al. (1999)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6,5	70		-	Singh et al. (2000)
	<i>Acremonium sp</i> EA0810	6,5	50	5,0-7,5	-	De Almeida et al. (2011)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> M7.1	4,5-5,5	60		40-45	
	<i>Myceliophthora thermophila</i> M7.7.	5	70	5,0-10,0		Moretti et al. (2012)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	4	60	4,0-6,0	30-50	Ang et al. (2013)
	JCP 1-4	6,0	55	3,0-5,5	30-55	Presente trabalho

Tabela 4 cont. Influência do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade de celulasas e xilanases fúngicas.

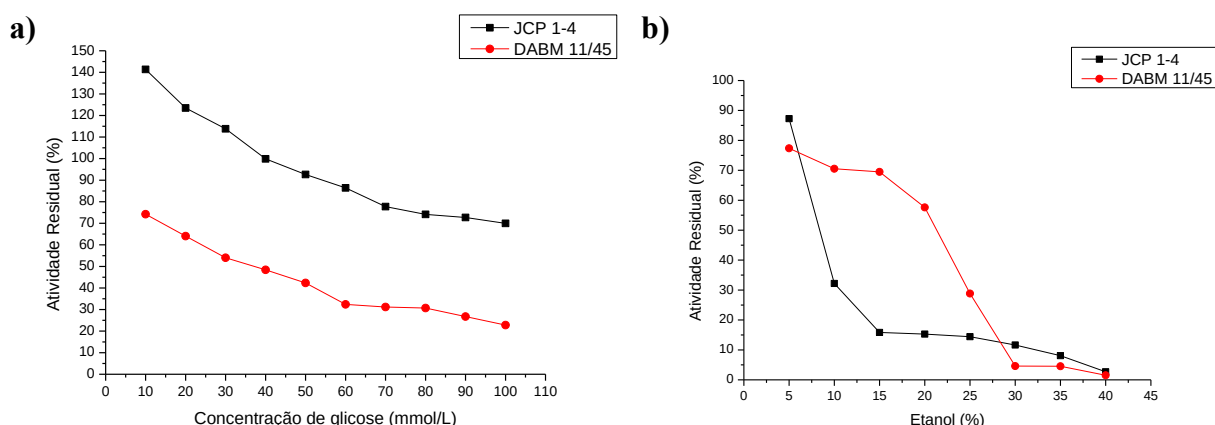
Enzima	Micro-organismo	Condições ótimas		Condições de estabilidade		Referência
		pH	Temperatura	pH	Temperatura	
Avicelase	<i>Trichoderma reesei</i>	6	40	4,5-7,0	35-45	Han; Chen (2010)
	<i>Sporotrichum thermophile</i>	3,5	-		40-80	Fracheboud; Canevascini (1989)
	<i>Thermoascus auranticus</i>	4,0	65	-	70	Khandke et al. (1989)
	JCP 1-4	5,0	60	3,0-5,5	30-55	Presente trabalho

3.7.3. Efeito de glicose e etanol sobre as atividades de β -glicosidase

Em concentrações de 30 mmol/L de glicose, a β -glicosidase do fungo DABM 11/45 apresentou uma queda, mantendo apenas 50% de sua atividade original. Já a β -glicosidase de JCP 1-4 manteve cerca de 90% da atividade original em concentrações de 100 mmol/L de glicose (Figura 16a).

A β -glicosidase do JCP 1-4 apresentou baixa atividade na presença de etanol, mantendo apenas 30% de sua atividade original na presença de 10% de etanol. Já o fungo DABM 11/45 manteve aproximadamente 58% de sua atividade original em 20% de etanol. Ao elevar a concentração de álcool para 40% (v/v) a atividade enzimática de DABM 11/45 sofreu uma queda, apresentando apenas 1,57% da sua atividade original (Figura 16b).

Figura 16. Efeito da glicose (a) e etanol (b) sobre as atividades de β -glicosidase dos fungos JCP 1-4 e DABM 11/45.



Leite et al. (2008) relatam forte inibição por glicose para as enzimas de *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus auranticus*. Em concentrações de 20% de etanol nenhuma atividade enzimática foi observada, para ambos os fungos. A β -glicosidase de *A. pullulans* manteve cerca de 80% da atividade em concentrações de 10% de etanol (v/v). Em até 40 mmol/L, a β -glicosidase de *Humicola insolens* estudada por Souza et al. (2010) se manteve estável. Após esta concentração, a enzima foi fortemente inibida. Já a β -glicosidase de *Periconia sp*, estudada por Harnpicharnchai et al. (2009), apresentou inibição em concentrações a partir de 10 mmol/L de glicose. Dessa forma, podemos ressaltar uma forte estabilidade da β -glicosidase do presente trabalho.

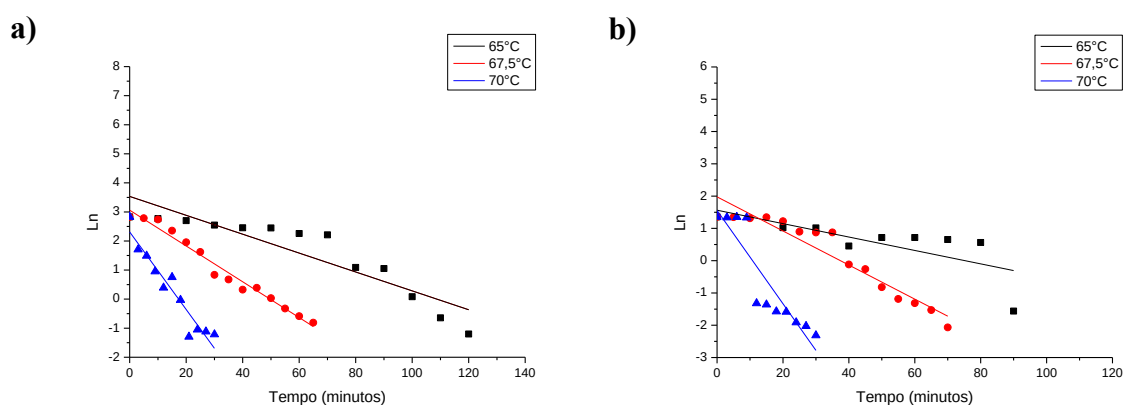
Um dos maiores obstáculos na utilização das β -glicosidases em processos industriais é a forte inibição da enzima por glicose. Atualmente existe uma constante busca por β -glicosidases que apresentem elevada termoestabilidade e não sejam inibidas pelo seu produto de hidrólise, especialmente quando se destinam ao processo de sacarificação enzimática do material celulósico (ZANOELO et al., 2004). Uma alternativa para contornar o problema da inibição por açúcares fermentescíveis está em associar a hidrólise enzimática da celulose a uma fermentação alcoólica, onde a glicose liberada será simultaneamente convertida em etanol (CARDONA; SANCHEZ, 2007; SAHA et al., 1994). Em contrapartida, conforme o microrganismo utiliza a glicose para fermentar, concomitantemente há produção de etanol, aumentando em sua concentração, o que pode gerar perda da estabilidade enzimática.

3.7.4. Determinação da constante de termoinativação (K_d) e meia-vida ($t_{1/2}$) das celulasas

As enzimas endoglucanase e β -glicosidase foram estáveis até 60°C e a avicelase até 65°C. Até 95°C, a avicelase manteve até 60% da sua atividade original. Estes valores foram utilizados como base para os experimentos de determinação da constante de termoinativação (K_d) e meia-vida ($t_{1/2}$), cujos resultados são mostrados na Tabela 5 e Figura 17.

Os valores de K_d foram obtidos pela inclinação da reta da regressão linear obtida pela representação gráfica do Ln das atividades enzimáticas residuais, em U/mL, em função do tempo de incubação (Figura 17). Em todas as temperaturas analisadas, a regressão linear apresentou coeficiente de correlação (R) maior que 0,97 e a linearidade obtida indica que a termoinativação das enzimas testadas obedeceram uma cinética de primeira ordem. Dessa maneira, a inativação irreversível ocorreu por processo monomolecular (LEITE et al., 2008).

Figura 17. Regressão linear do plote de Ln da U/ml residual pelo tempo de incubação, a 65°C, 67,5°C e 70°C para endoglucanase (a) e β -glicosidase (b) e a 90°C, 92,5°C e 95°C para avicelase (c), para a determinação do K_d .



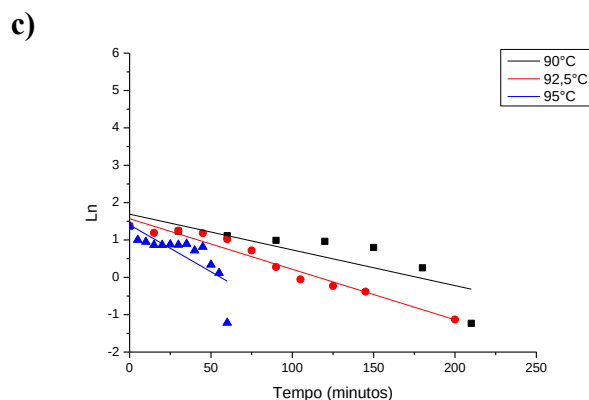
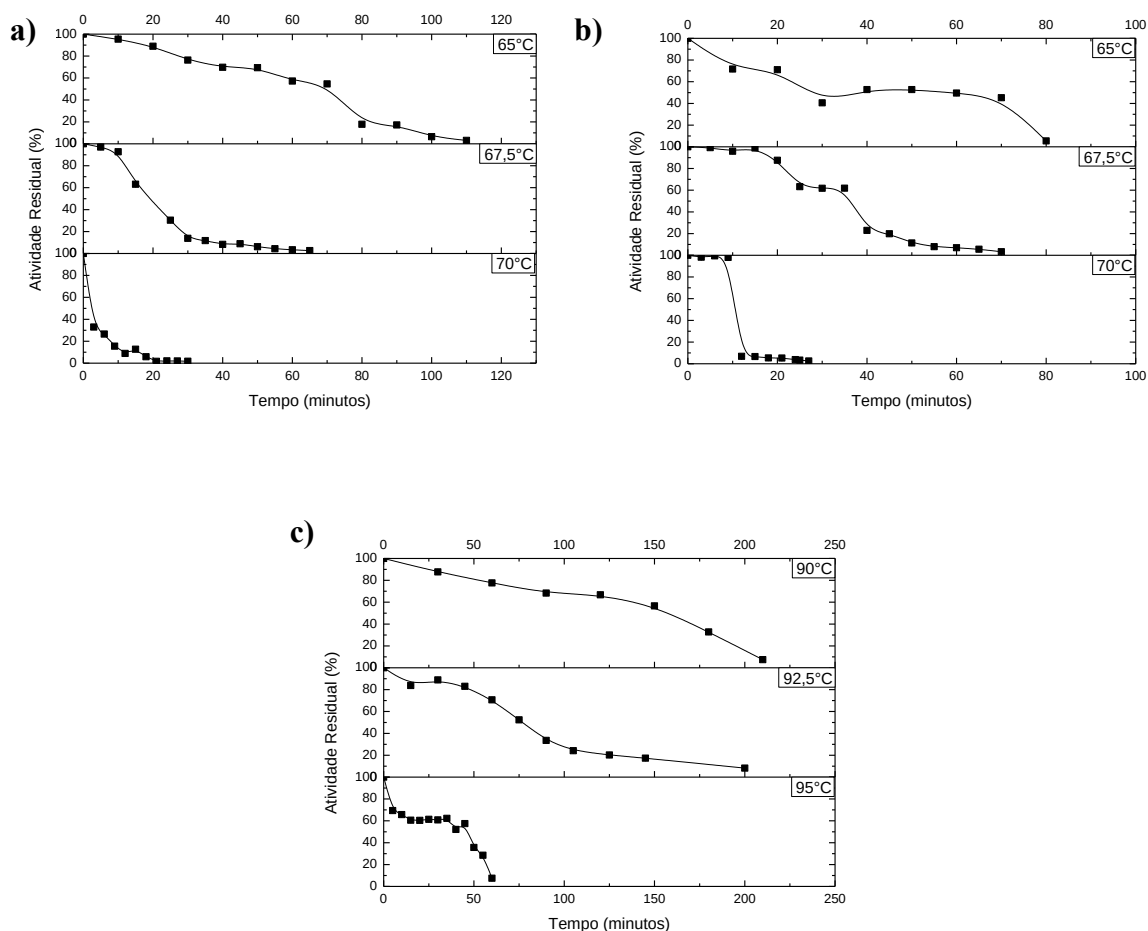


Tabela 5. Constante de termoinativação e tempo de meia vida para endoglucanase, β -glicosidase e avicelase em diferentes temperaturas de incubação.

Enzima	Temperatura	Kd	T1/2
Endoglucanase	65°C	0,0092	75 min
	67,5°C	0,0635	11 min
	70°C	0,1132	6 min
B-glicosidase	65°C	0,038	18 min
	67,5°C	0,0593	12 min
	70°C	0,1337	5 min
Avicelase	90°C	0,0038	182 min
	92,5°C	0,0147	47 min
	95°C	0,0215	32 min

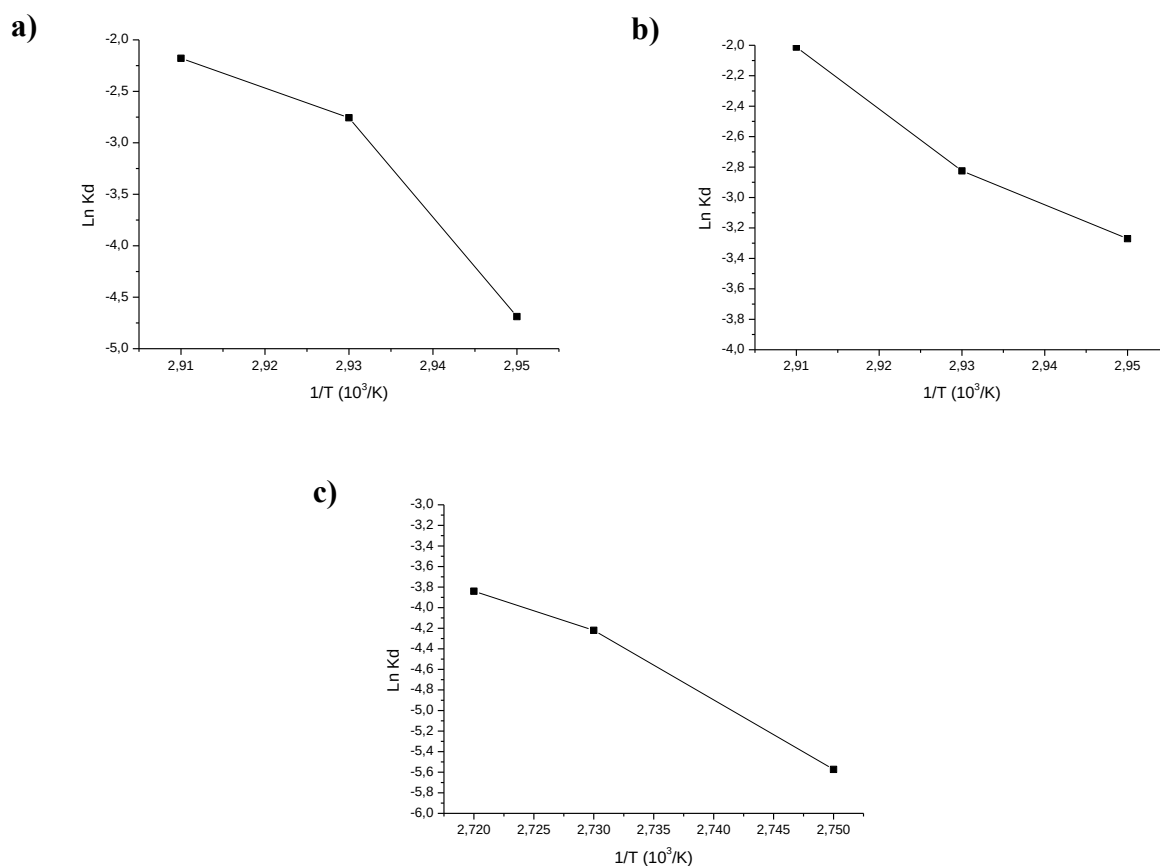
Após o tratamento térmico, a endoglucanase manteve cerca de 70% de sua atividade original a 65°C quando foi retirada em 40 min; 63% em 15 min a 67,5°C e 33% em 3 min a 70°C (Figura 18a). A β -glicosidase apresentou uma menor estabilidade comparada à endoglucanase, mantendo 71% de sua atividade original em 20 min a 65°C; 63% em 25 min a 67,5°C e 97% em 9 min a 70°C (Figura 18b). Já a avicelase apresentou melhor estabilidade frente às temperaturas e tempos estabelecidos. Em até 90 min de incubação, manteve cerca de 70% de sua atividade original à 90°C; 70% em 60 min à 92,5°C e 62% em 35 min à 95°C (Figura 18c). Após os tempos descritos, as atividades enzimáticas sofreram uma queda.

Figura 18. Atividade residual das enzimas endoglucanase (a), β -glicosidase (b) e avicelase (c) em função do tempo de incubação.



A representação gráfica do Kd em função da temperatura absoluta (Figura 19) confirmam a alta termoestabilidade das enzimas testadas. As enzimas, quando submetidas a temperaturas elevadas, sofrem um desdobramento parcial, resultando na alteração de sua conformação original e perda da atividade catalítica. Quando o período de incubação sob altas temperaturas é relativamente curto, a proteína pode se reorganizar, revertendo a atividade catalítica após um determinado tempo. Contudo, quando incubadas por um longo período, somente uma pequena fração da atividade é recuperada, caracterizando um processo de termoinativação irreversível. Como as atividades remanescentes foram calculadas após 24h do tratamento térmico, tempo suficiente para uma possível reorganização estrutural, podemos inferir que o tempo de incubação e as temperaturas utilizadas, foram suficientes para promover uma termoinativação irreversível de ambas as enzimas.

Figura 19. Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das enzimas endoglucanase (a), β -glicosidase (b) e avicelase (c).



4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da prospecção de novas linhagens fúngicas produtoras de celulasas e xilanasas, uma vez que foram obtidas enzimas com características interessantes, especialmente em relação à avicelase, uma enzima não comumente encontrada entre tais micro-organismos.

A metodologia de isolamento e cultivo proporcionou a obtenção de 32 fungos termofílicos, sendo possível selecionar dois deles pelas altas produções enzimáticas observadas durante os cultivos por FES em resíduos lignocelulósicos.

As enzimas dos fungos selecionados *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e DABM 11/45 apresentam condições ótimas de atividade em pH próximos à neutralidade e sob temperaturas elevadas, além de um amplo espectro de estabilidade tanto ao pH quanto à temperatura. Além disso, as β -glicosidasas dos fungos *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e DABM 11/45 apresentam alta

estabilidade frente a elevadas concentrações de glicose e etanol. Tais características são altamente desejáveis quando se visa aplicações industriais.

Dado o exposto, os resultados obtidos até o presente momento estimulam a continuidade do trabalho, especialmente no que se refere a estudos de sacarificação de materiais lignocelulósicos para a obtenção de açúcares fermentescíveis que possam ser convertidos em etanol de segunda geração.

5. Referências bibliográficas

AKINYELE, B.J.; ADETUYI, F.C. Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 4, p. 1390-1395, 2005.

ALAM, M., GOMES, I., MOHIUDDINT, G., HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p. 298-302, 1994.

ALMEIDA, P. M. N. População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens. **Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais**, p. 1-96, 2009.

ANG, S. K., SHAZA, E. M., ADIBAH, Y., SURAINI, A. A., MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process of Biochemistry**, p. 1-10, 2013.

ARX, J. A. The Genera of Fungi Sporulating in pure culture. 2.ed. Vaduz: J. Cramer, 1974.

ATANASOVA-PANCEVSKA, N.; KUNGULOVSKI, D. Comparison of morphological and enzyme characteristics of anaerobic fungi isolated from *Cervus dama*. **Central European Journal of Biology**, v. 3, p. 69-74, 2008.

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

BADHAN, A K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–10, 2007a.

BADHAN, A K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–10, 2007b.

BAJPAI, P. Microbial Xylanolytic Enzyme System: properties and application. **Advances in Applied Microbiology**, v.43, p. 141-185, 1997.

BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 105-108, p. 737-747, 2003.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011. Elsevier Ltd.

- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 7, p. 1341–6, 2012. Elsevier Ltd.
- BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol Advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375–407, 2002.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286-290, 1985.
- BOCCHINI, D.A.; DAMIANO, V.B.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Effect of *Bacillus circulans* D1 Thermostable Xylanase on Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 393-401, 2003.
- BONONI, V. L. CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R.; TRUFEM, S. F. B. Cultivo de cogumelos comestíveis. **São Paulo: Ícone**, 1999.
- BRANA, C. B. E.; BERRY, D. R., **Progress in Biotechnology**, v. 7, p. 523–528, 1992.
- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 120–130, 2008.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P.V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p.1-10, 2010.
- CARDONA C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**,v. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CHRISTAKOPOULOS, P., MAMMA, D., NERINCKX, W., KEKOS, D., MACRIS, B., CLAESSENS, M. Production and partial characterization of xylanase from *fusarium oxysporum*. **Bioresource Technology**, v. 58, p.115-119, 1996.

CHRISTOV, L. .; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. **Process in Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 511–517, 1999.

DE ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; BISCHOFF, K. M.; et al. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 594–610, 2011.

DE BARROS, R. D. R. O.; PAREDES, R. D. S.; ENDO, T.; BON, E. P. D. S.; LEE, S.-H. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 288–94, 2013.

DELABONA, P. D. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6–13, 2012.

DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, 2011.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–71, 2011.

DURAND, H. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi : mesophiles *Trichoderma reseei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporothricum cephalophilum*, v. 6, p. 175–180, 1984.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EKINCI, M. S.; OZKOSE, E.; AKYOL, I. Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 157-162, 2006.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FLANNIGAN, B.; SELLARS, P. N. Amylase, β -glucosidase and β -xylosidase activity of thermotolerant and thermophilic fungi isolated from barley. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 69, n. 2, p. 316–317, 1977.

FRACHEBOUD, D.; CANEVASCINI, G. Isolation , purification , and properties of the exoceilulase from *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*, v. 11, 1989.

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

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

GLAZER, A.; NIKAIDO, H. (1995). Biomass, 327-357. In Glazer, A.; Nikaido, H, Microbial Biotechnol: Fund. Appl. Microbiol., ISBN 0-7167-2608-4, Freeman and Company, USA.

GRIGOREVSKI-LIMA, L.; DA VINHA, F.N.M.; SOUZA, D.T.; BISPO, A.S.R.; BOM, E.S.P.; COELHO, R.R.R.; NASCIMENTO, R.P. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.155, p. 321-329, 2009.

GUERFALI, M.; MAALEJ, I.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* β - xilosidase and its use for xilose and xylooligasaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 57, p. 242-249, 2008.

GUEZ, M. A. U. Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo. **Tese de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. São José do Rio Preto – SP**, p. 1-106, 2009.

GUPTE, A & MADAMWAR, D. Production of cellulolytic enzymes by co-culturing of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus* grown on bagasse under solid state fermentation. **Appl. Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, p. 267-274, 1997.

HAGERMAN, A.; BLAU, D.M.;McCLURE, A.L. Plate Assay for Determining the Time of Production of Protease, Cellulase, and Pectinases by Germinating Fungal Spores. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p.334-342, 1985.

HAN, Y.; CHEN, H. Biochemical characterization of a maize stover beta-exoglucanase and its use in lignocellulose conversion. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6111–7, 2010.

HANLIN, R., Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes I & II. APS Press, 1998.

HARNPICHARNCHAI, P., CHAMPREDA, V., SORNLAKE, W., EURWILAICHITR, L. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, p. 61-69, 2009.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.

JAIN, M. K.; KAPOOR, K. K.; MISHRA, M. M. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 73, n. 1, p. 85–89, 1979.

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

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

JÚNIOR, G. S.; MARA, S.; FRANCHETTI, M.; et al. Mycelial growth and microscopic characteristics of *Thermomyces lanuginosus* in YpSs medium with different carbon sources. **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p. 239–243, 2007.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099–1104, 2003.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. . Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 155–163, 1998.

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

KELLY, C.T.; O'MAHONY, M.R.; FOGARTY, W.M. Extracellular xylanolytic enzymes of *Paecilomyces varioti*. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 885-890, 1989.

KHANDKE, K.M., VITHAYATHIL, P.J., MURTHY, S.K. Purification of Xylanase, β -Glucosidase, Endocellulase, and Exocellulase from a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archieved of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 491-500, 1989.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Cell-associated acid beta-xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, v. 26, n. 1-2, p. 60–7, 2009.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2005.

KUMARI, B.L.; SRI, M.H.; SUDHAKAR, P. Isolation of cellulase producing fungi from soil, optimization and Molecular characterization of the isolate for maximizing the enzyme yield. **World Journal of Science and Technology**, v. 5, p. 01-09, 2011.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e

Aureobasidium pullulans in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011.

MACRIS, B. J., GALIOTOU-PANAYOTOU, M. Enhanced cellobiohydrolase production from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial Technology**, v.8, p. 141–144, 1978.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.

MAHESHWARI, R.; KAMALAM, P.T. Isolation and culture of a thermophilic fungi, *Melanocarpus albomyces* and factor influencing the production and activity of xylanase. **Journal of Genetic and Microbiology**, v. 131, p.3017-3027, 1985.

MATHLOUTHI, N.; JUIN, H.; LARBIER, M. Effect of xylanase and beta-glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barley-based diets on the performance of male turkeys. **British Journal of Poultry Science**, v.44, n. 2, p. 291-298, 2003.

MISHA, R.; MAHESHWARI, R. **Journal of Bioscience**, v.21, p. 653–672, 1996.

MOLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v.20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Use of a Mixture of Thermophilic Enzymes Produced by the Fungus *Thermoascus aurantiacus* to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of the Sugarcane Bagasse Cellulose. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 468–476, 2010.

MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; ISHMAEL, N.; et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 116, n. 4, p. 489–502, 2012.

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

NG, I.-S.; LI, C.-W.; CHAN, S.-P.; et al. High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1310–7, 2010.

ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜ, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7-8, p. 689–695, 2001.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PANNEERSELVAM, A.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; KOLAR, P.; CLARE, D. A.; RANNEY, T. Hydrolysis of ozone pretreated energy grasses for optimal fermentable sugar production. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 97–104, 2013.

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

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–91, 2005.

PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetics Engineering Reviews**, v. 13, p.100–131, 1995.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova** 26, 863-871, 2003.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. **Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo**, p. 1-197, 2010.

SAHA, B.C.; FREER, S.N.; BOTHAST, R.J. Production, purification and properties of thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3774-3780, 1994.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic Fungi : Taxonomy and Biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, p. 77–107, 2007.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M.C.N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Biosynthesis of Xylanolytic and Xylan-Debranching Enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 352-357, 1997.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.

SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 352–357, 1997.

SIMÕES, M.L.G.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; TAPIA, D.M.T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6317-6326, 2009.

SINGH, S.; REDDY, P.; HAARHOFF, J.; et al. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 119–28, 2000.

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

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SINGER, R., The Agaricales in modern taxonomy, 4th Ed. Koeltz Scientific Books, 1986.

SONI, R., NAZIR, A., CHADHA, B.S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, 2009.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1561–9, 2005.

SOUZA, F.H.M., NASCIMENTO, C.V., ROSA, J.C., MASUI, D.C., LEONE, J.A., FURRIEL, R.P.M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose and xylose stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 272–278, 2010.

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

TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Enzyme based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bio-Resources**, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2007.

TANSEY, M. R., AND T. D. BROCK. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, p. 2426–2428. 1972.

TEATHER, R.M. & WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p.777–780, 1982.

TOMAZIC, S.J.; KLIBANOV, A.M. Why Is One *Bacillus* α -Amylase More Resistant against Irreversible Thermoinactivation Than Another? **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n. 7, p. 3092–3096, 1988.

TOPAKAS, E., KATAPODIS, P., KEKOS, D., MACRIS, B.J., CHRISTAKOPOULOS, P. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. **Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 195–198, 2003.

TUOHY, M.G.; BUCKLEY, R.J.; GRIFFIN, T.O.; CONNELLY, I.C.; SHANLEY, N.A.; XIMENES, E. Enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi on lignocellulosic substrates. In: Coughlan MP, editor. **Enzyme systems for lignocellulose degradation. London and New York: Elsevier**, p. 293-312, 1989.

WENG, J.; LI, X.; BONAOWITZ, N.D.; CHAPPLE, C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Current Opinion of Biotechnology**, v.19, p. 166-172, 2008.

WONG, K.K.; TAN, L.U.; SADDLER, J. Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganism: functions and applications. **Microbiology and Molecular Biology Review.**, v. 52, p. 305-317, 1988.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. β -glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilus* stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, p. 137-143, 2004.

CAPÍTULO III

Avaliação da influência do pré-tratamento com glicerol e explosão a vapor na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato enzimático produzido por *Mycelyophthora thermophila*
JCP 1-4

1.Introdução

A biomassa lignocelulósica consiste em três componentes majoritários: celulose, hemicelulose e lignina. Devido à recalcitrância da biomassa vegetal, antes da etapa de hidrólise enzimática, na conversão de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, é necessário que o substrato seja pré-tratado. Para isso, há uma variedade de métodos para pré-tratamentos (físicos, químicos, biológicos, etc). Dentre estes métodos, o uso do glicerol e explosão à vapor como métodos de pré-tratar bagaço de cana vem sendo aplicado por alguns pesquisadores (ZHANG et al., 2013; NOVO et al., 2011; SUN; CHEN, 2008a,b; HARRISON, et al., 2013).

De modo geral, os pré-tratamentos envolvem a degradação/desestruturação da lignina e também hemicelulose, com a finalidade de aumentar o acesso das células à fibra de celulose. O uso do glicerol, um solvente orgânico comumente gerado a partir do petróleo e assim apresentar um baixo custo de obtenção, diferentemente do ozônio que reage com a lignina, age de modo a intumescer a fibra de lignina, ocorrendo o rompimento das ligações entre lignina-carboidratos e a dissolução da lignina no glicerol (DEMIRBAS, 2008; Sun; Chen, 2008a; Sun; Chen, 2008; Zhang et al., 2013; Novo et al., 2011).

Além destes pré-tratamentos que envolvem o emprego de um gás, como o ozônio do capítulo anterior, e o glicerol deste presente trabalho, a utilização de um métodos simples também é capaz de desestruturar fibras lignocelulósicas. Dentre estes métodos, se destaca o pré-tratamento do bagaço de cana por explosão à vapor que além de apresentar baixo custo, gera quantidades extremamente pequenas de compostos tóxicos, como os compostos fenólicos (Martín-Sampedro et al., 2012, Jacquet et al., 2012; Qiu; Chen, 2012; Teng et al., 2010; Sasaki et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Pang et al., 2013). O processo de explosão à vapor consiste submeter o material lignocelulósico à altas pressões de vapor seguida de rápida descompressão, forçando a separação das fibras presentes na biomassa vegetal (Martín-Sampedro et al., 2012).

Dado o exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar o rendimento da enzima do fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com glicerol e explosão à vapor, comparando com os rendimentos obtidos na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ozônio do capítulo anterior.

2. Material e métodos

2.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado bagaço de cana de açúcar cedido pela Usina Virgolino de Oliveira S/A Açúcar e Álcool, Unidade José Bonifácio – SP. O bagaço foi lavado com água corrente e água destilada para remoção dos resíduos de açúcares e material particulado, seco em estufa a 37°C com ventilação e triturado em Triturador de Forragens Trapp modelo TRF-400, com peneira de abertura de 3-5 mm, original do equipamento.

2.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana triturado e retido em peneiras de 3 mm foi submetido a radiação de microondas (2450 MHz) a pressão atmosférica. O forno foi programado em 50% da potência e o tempo reacional foi de 5 minutos. Os ensaios foram feitos em balão de fundo redondo de 250 mL contendo 10g de bagaço de cana, adicionando-se 30 mL de glicerol (100%). Após o tratamento, foram acrescentados 30 mL de água destilada ao balão para a retirada do material pré-tratado, o mesmo foi filtrado a vácuo, onde o filtrado foi utilizado para análises de açúcares redutores e compostos fenólicos e o bagaço foi lavado em água destilada e seco a 40°C.

2.3. Caracterização bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Bagaço pré-tratado foi caracterizado quanto à lignina total (lignina ácida solúvel e lignina ácida insolúvel), celulose e xilana segundo os métodos desenvolvidos pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory – EUA).

2.5. Micro-organismo

O fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 foi isolado de pilhas de silagem de cana-de-açúcar em Potirendaba, São Paulo, Brasil. Foi mantido em tubos com 2 mL de ágar Sabouraud Dextrose, sob fina camada de óleo mineral e em criotubos, em solução de glicerol a 20%, a -80°C.

2.6. Produção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES)

Para a obtenção das enzimas, o fungo foi pré-cultivado em ágar Sabouraud por 72 horas e, então, 5 discos miceliais foram tomados como inóculo para cada erlenmeyer de fermentação de 250 mL, contendo 5g de substrato (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja 1:1 – p/p). O cultivo foi mantido a 45°C, por 96 horas (pico de produção das enzimas). Após este período, os erlenmeyers contendo material fermentado foram tomados e a cada um deles foram adicionados 50 mL de água destilada. A mistura em cada erlenmeyer foi homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm) por 1 hora. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000 xg por 15 min, a 5°C, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a determinação das atividades enzimáticas e para utilização nos experimentos de sacarificação enzimática. Os ensaios foram feitos em duplicata.

2.7. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os experimentos de sacarificação do bagaço pré-tratado foi realizado segundo metodologia previamente estabelecida pelo Grupo de Pesquisa da Universidad de Valladolid – Espanha, em frascos Erlenmeyers hermeticamente fechados com rolhas de látex. Foi utilizado bagaço pré-tratado (a 3% - p/p), extrato enzimático de *M. thermophila* JCP 1-4 e solução tampão citrato, a 0,1 mol/L e pH 5,0 (para um volume final de 50 mL). Os frascos foram incubados em shaker orbital a 300 rpm, a 50°C, por 48 horas. Após este tempo seu conteúdo filtrado utilizando-se filtro de 0,22 µm, e a quantidade de açúcares na solução filtrada foi determinada de acordo com o item 2.8. Os ensaios foram feitos em duplicada.

2.8. Análise açúcares, alcoóis e inibidores por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A quantificação da glicose e xilose foi realizada por meio da cromatografia de troca aniônica, utilizando o *HPAEC-PAD* (*Thermo Scientific* (Dionex) ICS-5000) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1 a 25°C e compartimento a 30°C, com diluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e degaseificada com N₂, o fluxo utilizado foi de 1 mL/min com os solventes, A (água ultra pura) e B (500 mM de NaOH), utilizou-se eluição isocrática de 0 a 12 minutos com 4,8% de B, 95,2% de A, de 12 minutos a 16 minutos. Foi realizado uma rampa saindo de 4,8% de B até 100% de A para a limpeza da coluna, e por fim dos 16 minutos aos 30 minutos 4,8% de B e 95,2% de A.

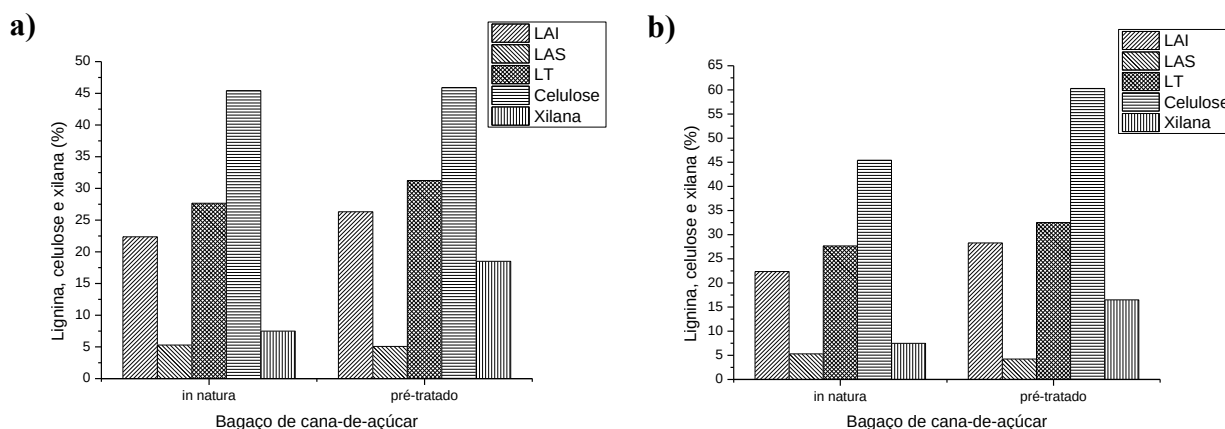
3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do Bagaço de cana *in natura* e tratado com glicerol e explosão à vapor

Como pode ser visto na Figura 1, o pré-tratamento com glicerol obteve 98,95% de recuperação da celulose (45,42% bagaço *in natura* e 45,9% bagaço pré-tratado) e 40,48% da xilana (7,49% bagaço *in natura* e 18,5% bagaço pré-tratado). Já no pré-tratamento sob explosão à vapor, houve uma recuperação de 75,32% da celulose (45,42% bagaço *in natura* e 60,3% bagaço pré-tratado) e 45,39% da xilana (7,49% bagaço *in natura* e 16,5% bagaço pré-tratado).

Quanto ao teor de lignina, tanto o pré-tratamento com glicerol quanto com explosão à vapor não reagem com a lignina. Como mostrado na Figura 1, os teores de lignina ácida solúvel (LAS) não aumenta em razão da diminuição da lignina ácida insolúvel (LAI). Por esse motivo, a quantidade de LAS e LAI permanecem inalterada ou praticamente inalterada.

Figura 1. Conteúdo de lignina, celulose e xilana no bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol (a) e explosão à vapor (b). LAI : Lignina ácida insolúvel. LAS: Lignina ácida solúvel. LT: Ligninas totais.



Dessa maneira, para medir a eficácia do pré-tratamento com glicerol, são necessárias análises quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT) liberados após o pré-tratamento, resultantes da degradação e solubilização da lignina. Como mostrado na Tabela 1, houve liberação de CFT presente no bagaço pré-tratado com glicerol comparado com o *in natura*. No bagaço de cana pré-tratado com explosão à vapor não houve o mesmo perfil, havendo uma formação mínima de CFT comparada ao pré-tratamento com glicerol, devido ao pré-tratamento gerar uma desestruturação da lignina para melhor acesso das enzimas celulolíticas à fibra de celulose.

Tabela 1. Quantidades de compostos fenólicos totais no bagaço de cana in natura e pré-tratado com glicerol.

Bagaço de cana	CFT
<i>in natura</i>	-
glicerol	1,34 mg
explodido	0,042 mg

De acordo com Demirbas (2008), a ocorrência do rompimento das ligações entre lignina-carboidratos e a dissolução da lignina no glicerol pode explicar esta quantidade de CFT na presença deste solvente. Estudos como de Magalhães (2011) e Sun; Chen (2008) ao avaliarem a influência do glicerol no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos, notaram que o teor de CFT aumentava conforme a quantidade de lignina diminuía.

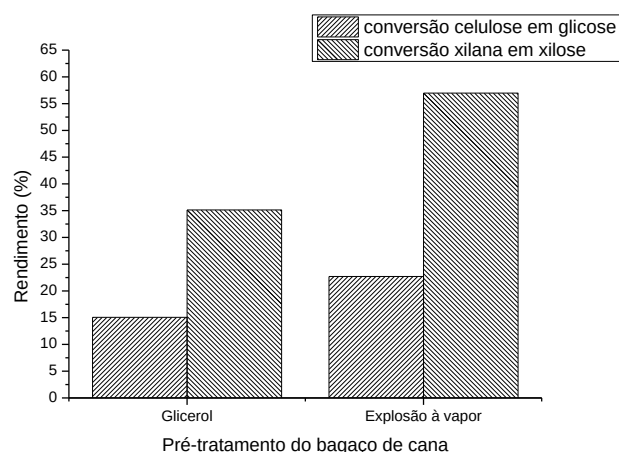
3.2. Sacarificação do bagaço pré-tratado com glicerol e explosão a vapor utilizando extrato enzimático de *Miceliophthora thermophila* JCP 1-4

Os resultados obtidos na sacarificação enzimática estão de acordo com a Tabela 2. Logo, na Figura 2 estão os rendimentos obtidos na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose.

Tabela 2. Liberação de glicose e xilose durante a sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão à vapor. BC = Bagaço de Cana.

Bagaço de cana	Glicose				Xilose			
	g/L	mg/g BC	mg/g celulose	Rendimento (%)	g/L	mg/g BC	mg/g xilana	Rendimento (%)
glicerol	2,2	73,33	156,03	15,60%	1,95	65	351,35	35,13%
explodido	3,2	106,7	226,95	22,70%	2,82	94	569,7	56,96%

Figura 2. Rendimentos (%) na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e com explosão à vapor na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose.



Dados na literatura utilizando enzimas microbianas na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado tanto com glicerol quanto sob explosão à vapor são escassos. Muitos trabalhos como de Sun; Chen (2008a,b), Pang et al. (2011), Martín-Sampedro et al. (2012) e Zhang et al. (2013) empregam enzimas comerciais na sacarificação de além de bagaço de cana, outros resíduos lignocelulósicos como o farelo de trigo. Os resultados obtidos por esses autores na liberação de glicose na hidrólise enzimática utilizando bagaço por ambos pré-tratamentos ainda superam o presente trabalho. Na maioria das hidrólises enzimáticas utilizando pré-tratamentos com explosão à vapor, muitos autores como Martín-Sampedro et al. (2012), Qiu;Chen (2012) e Taniguchi et al. (2010) empregam o uso de lacase para aumentar os rendimentos na conversão de celulose em glicose. Contudo, os dados obtidos na sacarificação enzimática do fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 na liberação de xilose no pré-tratamento de explosão à vapor são superiores aos resultados obtidos na literatura (Tabela 3).

Tabela 3. Dados na literatura em relação aos rendimentos (%) na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol e com explosão à vapor na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose.

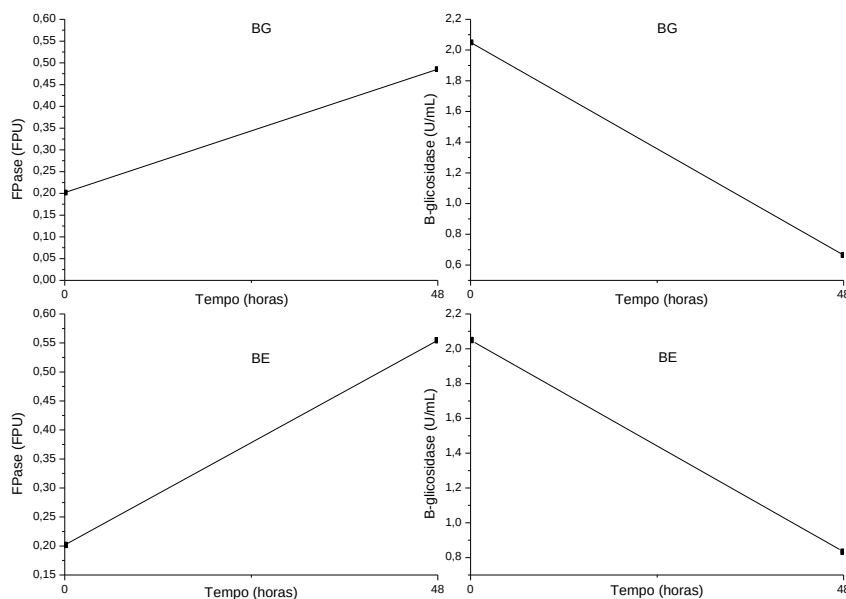
Referência	Material	Pré-tratamento	Pré-tratamento com	Carga	Temperatura e
------------	----------	----------------	--------------------	-------	---------------

		com glicerol		Explosão à vapor		enzimática	Tempo
		Glicose	Xilose	Glicose	Xilose		
Zhang et al. (2013)	Bagaço de cana	9,40%	-	-	-	20 FPU	72h, 50°C
Sun; Chen (2008)	Farelo de Trigo	85%	-	-	-	44 FPU	24h, 50°C
		90%	-	-	-		48h, 50°C
		~85%	~65%	-	-	110 FPU	24h, 50°C
Martín-Sampedro (2012)	Madeira de <i>Eucalyptus globulus</i>	-	-	24,10%	-	20 EGU	72h, 50°C
Pang et al. (2013)	Resíduos de milho	-	-	57%	17,80%	60FPU	72h, 50°C
Teng et al. (2010)				-	28,6%	7,5 U/mL xilanase	4h, 70°C

3.3. Análise das atividades enzimáticas de Fpase e β -glicosidase depois das hidrólises enzimáticas utilizando bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão a vapor

De acordo com este experimento, a enzima Fpase apresentou um aumento nas atividades após as hidrólises enquanto que a β -glicosidase apresentou uma diminuição. Nas hidrólises com bagaço de cana tratado com glicerol e explosão a vapor obtiveram um aumento de 241% e 274,5%, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Atividades enzimáticas de Fpase e β -glicosidase após hidrólise com bagaço de cana pré-tratado com glicerol e explosão à vapor. BG = Bagaço com glicerol, BE = Bagaço explodido.



Muitos são os fatores que podem influenciar no aumento da atividade enzimática (íons, açúcares, moléculas e proteínas acessórias, tais como as chaperonas e chaperoninas, etc). Considerando estes resultados quanto ao aumento das atividades enzimáticas, tanto da Fpase quanto da β -glicosidase, nos estimulam na busca do emprego de outros bioprocessos para sacarificação enzimática, como sacarificação e fermentação simultânea (SSF), já que as enzimas não perdem suas atividades. Dessa maneira, à medida que as celulases e xilanases hidrolisam o substrato e liberam os açúcares resultantes, estes são concomitantemente metabolizados por micro-organismos fermentadores como leveduras ou bactérias na fermentação alcoólica.

4. Conclusões

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto pode observa-se que as enzimas do micro-organismo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 apresentaram um bom potencial hidrolítico na conversão de celulose em glicose e xilana em xilose nos dois pré-tratamentos testados (glicerol e explosão à vapor).

As enzimas como Fpase e β -glicosidase tiveram suas atividades potencializadas durante a sacarificação ao utilizar tanto bagaço pré-tratado com glicerol quanto sob explosão à vapor. Para uma melhor compreensão destes resultados são necessários novos experimentos que envolvam a avaliação de diversos fatores potencialmente influenciáveis na ativação enzimática, os quais pretende-se realizar em projetos futuros.

De modo geral, os resultados são estimulantes e promissores, especialmente pela escassez de trabalhos utilizando enzimas microbianas na sacarificação de materiais lignocelulósicos submetidos a pré-tratamentos.

5. Referências Bibliográficas

DEMIRBAS, A. Liquefaction of Biomass Using Glycerol. *Energy Sources*, v. 30, pt A, p.1120–1126, 2008.

HARRISON, M.D., ZHANG, Z., SHAND, K., O'HARA, I.M., DOHERTY, W.O.S., DALE, J.L. Effect of pretreatment on saccharification of sugar cane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresour. Technol.*, v. 148, p. 105-113, 2013.

JACQUET, N., VANDERGHEN, C., DANTHINE, S., QUÉVY, N., BLECKER, C., DEVAUX, J., PAQUOT, M. Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers. *Bioresour. Technol.*, v. 121, p. 221-227, 2012.

MARTÍN-SAMPEDRO, R.; EUGENIO, M.E.; GARCÍA, J.C.; LOPEZ, F.; VILLAR, J.C.; DIAZ, M.J. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass and Bioenergy*, v. 42, p. 97-106, 2012.

NOVO, L.P.; GURGEL, L.V.A.; MARABEZI, K.; CURVELO, A.A.S. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol-water mixtures to produce pulps for saccharification. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 10040-10046, 2011.

OLIVEIRA, F.M.V., PINHEIRO, I.O., SOUTO-MAIOR, A.M., MARTIN, C., GONÇALVES, A. R., ROCHA, G.J.M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresour. Technol.*, v. 130, p. 168-173, 2013.

PANG, F., XUE, S., YU, S., ZHANG, C., LI, B., KANG, Y. Effects of combination of steam explosion and microwave irradiation (SE–MI) pretreatment on enzymatic hydrolysis, sugar yields and structural properties of corn stover. *Ind. Crops and Prod.*, v. 42, p. 402-408, 2013.

QIU, W., CHEN, H. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. *Bioresour. Technol.*, v. 118, p. 8-12, 2012.

SASAKI, C., SUMIMOTO, K., ASADA, C., NAKAMURA, Y. Direct hydrolysis of cellulose to glucose using ultra-high temperature and pressure steam explosion. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 298-301, 2012.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 5474-5479, 2008a.

SUN, F.; CHEN, H. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 6156-6161, 2008b.

TANIGUSHI, M., TAKAHASHI, D., WATANABE, D., SAKAI, K., HOSHINO, K., KOUYA, T., TANAKA, T. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. *J. of Biosc. and Bioeng.*, v. 110, p. 449-452, 2010.

TENG, C., YAN, Q., JIANG, Z., FAN, G., SHI, B. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 7679-7682, 2010.

ZHANG, Z.; WONG, H.H.; ALBERTSON, P.L.; DOHERTY, W.O.S.; O'HARA, I.M. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. *Bioresour. Technol.*, v. 138, p.14-21, 2013.