

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

NAIANI TARTARINE

Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar

**Araraquara
2018**

NAIANI TARTARINE

Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini
Co-orientadora: Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

T194c Tartarine, Naiani
Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por
fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha
de cana-de-açúcar / Naiani Tartarine. –
Araraquara : [s.n.], 2018
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Daniela Alonso Bocchini
Coorientador: Kelly Johanna Dussán Medina

1. Celulase. 2. Fungos endofíticos. 3. Fermentação.
4. Lignocelulose. 5. Hidrólise. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar"


AUTORA: NAIANI TARTARINE


ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI

COORDINADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. DANIELA ALONSO BOCCHINI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. RUBENS MONTI
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 30 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES

APRESENTAÇÃO

Naiani Tartarine

Nascimento: 01/12/1993, Santa Cruz das Palmeiras-SP

Endereço de acesso ao currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/6811380493984095>

Nome em citações bibliográficas: TARTARINE, N.; TARTARINE, NAIANI.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharel em Ciências Biológicas (2012/2015)

Universidade Federal de Uberlândia

Faculdade de Ciências Integradas do Pontal

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados:

TARTARINE, NAIANI; PEREIRA, JANSER MOURA; NOMELINI, QUINTILIANO SIQUEIRA SCHRODEN; ÁVILA, VERIDIANA DE MELO RODRIGUES; IZIDORO, LUIZ FERNANDO MOREIRA. Adjust of linear and nonlinear models in the study of neutralization of snake venom *Bothrops pauloensis* by aqueous extracts *Jathropa curcas* and *Hedychium coronarium*. **Espacios**, v.38, n. 4, p. 24, 2017.

Trabalho submetido para publicação em 20/03/18:

TARTARINE, NAIANI; PEREIRA, JANSER MOURA; NOMELINI, QUINTILIANO SIQUEIRA SCHRODEN; IZIDORO, FRARE, BRUNO TUMANG; LUIZ FERNANDO MOREIRA. Evaluation of two different methods of storage and preparation of beef liver samples for qualitative analysis of ivermectin, used by a fridge of the state of Minas Gerais. **Revista de Saúde e Biologia**.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais José Claudinei Tartarine e Tereza Cristina Minelli Tartarine,
meus exemplos de determinação, força e superação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir a conclusão de mais uma etapa, me concedendo força, proteção e guiando meus passos.

Aos meus pais, José Claudinei e Tereza Cristina, por terem me ensinado os valores da vida, por, apesar das dificuldades, nunca terem deixado me faltar amor, e por sempre apoiarem minhas decisões e torcerem pelo meu melhor. Terão minha gratidão e minha admiração eternas.

À minha irmã, Natália, por sempre acreditar no meu potencial, pelo incentivo e pelas palavras de apoio ao longo dessa caminhada.

Ao meu amigo e irmão de coração, Bruno Navarro, por estar sempre disposto a me ouvir, aconselhar e fazer rir quando mais preciso.

Ao meu namorado, Bruno, por alimentar minha força de vontade e determinação com amor, afeto e cuidado a qualquer tempo.

À Prof^a Dra Daniela Alonso Bocchini, por ter me acolhido como orientanda, pela confiança, pelos ensinamentos, pela oportunidade de realizar e concluir este trabalho, e acima de tudo, pelos auxílios, apoio e compreensão sempre que necessário.

À Prof^a Dra Kelly Johana Dussán Medina pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela prontidão e disposição em contribuir sempre que precisei.

Às companheiras de laboratório Natália e Luana pela recepção, pelos ensinamentos, pela amizade e bons momentos compartilhados, e à Josiani pela disposição em ajudar sempre, e pela importante colaboração para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof^a Dra. Ângela Regina Araújo que gentilmente forneceu sua coleção de fungos ao nosso grupo de pesquisa.

Ao Instituto de Química-CAr pela oportunidade e pelos serviços prestados ao longo do curso.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos da seção técnica de pós-graduação pela atenção sempre.

À CAPES, por me conceder a bolsa de pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal no período dessa pesquisa, e que de alguma forma tenham auxiliado na sua realização.

EPÍGRAFE

“O aprendido é aquilo que fica depois que o esquecimento faz o seu trabalho”

- Rubem Alves

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele o oceano seria menor”

- Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Celulases microbianas têm sido empregadas na sacarificação de materiais lignocelulósicos para a obtenção de glicose, visando a produção de etanol celulósico. Entretanto, o custo dessas enzimas encarece o processo, e por isso a produção das mesmas a partir de fungos filamentosos cultivados em materiais lignocelulósicos, substratos de baixo custo, amplamente disponíveis e indutores da síntese enzimática, torna-se uma boa opção. Neste trabalho, com o objetivo de melhorar a produção de celulases através de metodologias de planejamento de experimentos, foram utilizados dois fungos endofíticos, cultivados por fermentação submersa (FSbm), usando como substratos o farelo de soja e a palha de cana de açúcar pré-tratada hidrotérmicamente, cedida pela empresa GranBio, em cultivos isolados e co-cultivos, agitados. As atividades máximas obtidas nos extratos enzimáticos produzidos por planejamento experimental foram de 3,77 U/mL e 3,66 U/mL de endoglucanase, e 18,8 U/mL e 17,5 U/mL de β -glicosidase, no co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, e no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, respectivamente. As condições ótimas de atividade das enzimas endoglucanase e β -glicosidase do melhor extrato foram pH 5,5 e 60 °C. Estas enzimas foram estáveis quando incubadas por 24 horas em pH 5,0 e 5,5, e menos de 20% da atividade de ambas foi perdida entre 35 e 55 °C. Os ensaios de inibição por glicose mostraram que a β -glicosidase tem sua atividade reduzida proporcionalmente ao fornecimento deste açúcar, porém, mesmo com a máxima quantidade de glicose fornecida (12 mmol/L), a atividade relativa mostrou-se mediana (64 %). Em relação à influência do etanol, a presença de 5 e 10% deste álcool aumentou em 4 e 5 %, respectivamente, a atividade enzimática de β -glicosidase, ocorrendo inibição em concentrações superiores. Em relação à sacarificação das palhas de cana, as maiores concentrações de glicose foram obtidas quando utilizaram-se a palha submetida a pré-tratamento hidrotérmico ácido seguido de alcalino (3,29 mg/mL) e a palha pré-tratada hidrotérmicamente cedida pela empresa GranBio (2,66 mg/mL).

PALAVRAS-CHAVE: Celulase. Fungos endofíticos. Pré-tratamento. Sacarificação enzimática. Palha de cana-de-açúcar. Fermentação submersa.

ABSTRACT

Microbial cellulases have been used in the saccharification of lignocellulosic materials to obtain glucose, aiming to produce cellulosic ethanol. However, the cost of these enzymes makes the process expensive, so their production from filamentous fungi grown in lignocellulosic materials, low-cost and widely available substrates and inducers of enzymatic synthesis, is a good option. In order to improve cellulase production through experiment planning methodologies, two endophytic fungi, were cultivated by submerged fermentation (FSbm). Soybean meal and hydrothermally pretreated sugarcane straw, provided by GranBio, were used as substrate, in agitated isolated cultures and co-cultivations. The maximal activities obtained in the enzymatic extracts produced by the experimental design were 3.77 U/mL and 3.66 U/mL endoglucanase and 18.8 U/mL and 17.5 U/mL β -glucosidase in the co-cultivation of the fungi *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04, and in the isolated cultivation of *Botryosphaeria* sp. AM01, respectively.. The optimal activity conditions of the endoglucanase and β -glucosidase enzymes from the best selected extract were pH 5.5 and 60 ° C. These enzymes were stable when incubated for 24 hours at pH 5.0 and 5.5, and less than 20% of the activity of both of them was lost at 35-55 °C. The glucose-inhibition assays showed that β -glucosidase activity was reduced proportionally to the supply of this sugar, but even with the maximum amount of glucose supply (12 mmol/L), the relative activity was shown to be median (64 %). Regarding the influence of ethanol, the presence of 5 and 10% of this alcohol increased in 4 and 5%, respectively, the enzymatic activity of β -glucosidase, occurring inhibition in higher concentrations. Regarding the saccharification of sugarcane straw, the highest glucose concentrations were obtained with the straws that were submitted to the acid hydrothermal treatment followed by the alkaline treatment (3.29 mg/mL) and the hydrothermally pretreated straw provided by the company GranBio (2.66 mg/mL).

KEYWORDS: Cellulase. Endophytic fungi. Pretreatment. Enzymatic hydrolysis. Sugar cane straw. Submerged fermentation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura do material lignocelulósico: da célula vegetal aos seus principais constituintes. A: Unidade de celobiose. B: Estrutura química das cadeias de celulose. C: Heteropolímeros componentes da hemicelulose. D: Pentoses componentes da hemicelulose. E: Hexoses componentes da hemicelulose. F: Estrutura química da cadeia de lignina. Fig. G: Unidades monoméricas fenilpropanóides componentes da estrutura da lignina.....22
- Figura 2** - Representação esquemática da ação do complexo celulolítico microbiano.....24
- Figura 3** - Representação esquemática do efeito do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica.....28
- Figura 4** - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 por fermentação submersa, utilizando-se meios contendo diferentes substratos lignocelulósicos, a 28 °C, sem agitação. Meio 1: palha de cana-de-açúcar GranBio (1% m/v); Meio 2: palha de cana-de-açúcar GranBio (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v); Meio 3: farelo de trigo (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v). (A): Endoglucanase, (B): Exoglucanase, (C): β -glicosidase, (D): FPase.....45
- Figura 5** - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 por fermentação submersa, utilizando-se meios contendo diferentes substratos lignocelulósicos, a 28 °C, sob agitação de 100 rpm. Meio 1 - palha de cana-de-açúcar GranBio (1% m/v); Meio 2: palha de cana-de-açúcar GranBio (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v); Meio 3: farelo de trigo (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v). (A): Endoglucanase, (B): Exoglucanase, (C): β -glicosidase, (D): FPase. *Os experimentos agitados com meios 1 e 2 foram realizados por 240 horas (10 dias).....47
- Figura 6** - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC04 no meio 2, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, variando-se a proporção entre o número de discos de inóculo de cada fungo.....51
- Figura 7** - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC04 no meio 2, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, 3 discos miceliais de cada fungo como inóculo, utilizando-se os substratos lignocelulósicos triturados ou não. EXP 01: melaço diluído 10x + substrato não triturado; EXP 02: melaço diluído 30x + substrato não triturado; EXP 03: solução nutriente + solução de sais + substratos triturados; EXP 04: melaço diluído 10x + substrato triturado; EXP 05: melaço diluído 30x + substrato triturado.....54
- Figura 8** - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....58

Figura 9 - Superfícies de resposta para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 em função das variáveis velocidade de agitação, carga de inóculo e carga de substrato.....60

Figura 10 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de substrato e velocidade de agitação para a máxima atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.....62

Figura 11 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....64

Figura 12 - Superfícies de resposta para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 em função das variáveis velocidade de agitação, carga de inóculo e carga de substrato.....66

Figura 13 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de substrato e velocidade de agitação para a máxima atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01.....68

Figura 14 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo cultivo isolado do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....70

Figura 15 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades relativas de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelos ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^275

Figura 16 - Superfícies de resposta para as atividades relativas de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01.....77

Figura 17 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura para as máximas atividades de β -glicosidase e endoglucanase presentes no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01.....78

Figura 18 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2, a 254rpm, 28°C, por 144h. *100% = 5,52 U/mL para Endoglucanase e 24,51 U/mL para β -glicosidase.....80

Figura 19 - Efeito da glicose (A) e do etanol (B) sobre a atividade da enzima β -glicosidase presente no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2, a 254rpm, 28°C, por 144h. *100% = 24,51 U/mL para β -glicosidase.....82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Relação de estudos empregando fungos filamentosos para a produção de celulases por fermentação submersa, tendo materiais lignocelulósicos como substrato.....26
- Tabela 2** - Componentes do melaço de soja Caramuru.....34
- Tabela 3** - Variáveis (níveis codificados e reais) do delineamento composto central rotacional empregado no co-cultivo e nos cultivos isolados dos fungos por fermentação submersa, em meio 2 contendo palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos, cedida pela GranBio e farelo de soja (1:1 p/p) como substratos, a 28 °C por 144 horas.....35
- Tabela 4** - Valores codificados e reais das variáveis do planejamento fatorial fracionado do tipo face centrada 2² empregado para estudo do efeito do pH e temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β-glicosidase do extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2 contendo palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos, cedida pela GranBio (3% m/v) e farelo de soja (3% m/v), a 28 °C, 254 rpm, por 144 horas, com 6 discos de inóculo.....39
- Tabela 5** - Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana), lignina e outros componentes da palha de cana pré-tratada hidrotérmicamente sem adição de químicos fornecida pela Granbio, e dos farelos de soja e de trigo.....43
- Tabela 6** - Atividades de celulases obtidas entre 96 e 192 horas, pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (farelo de soja + palha de cana de açúcar), sob agitação de 100 rpm e 28 °C. Endo: endoglucanase; Beta: β-glicosidase; Exo: exoglucanase....50
- Tabela 7** - Comparação de valores dos componentes do melaço de soja puro e diluído, e das quantidades utilizadas na solução nutriente padrão.....53
- Tabela 8** - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C.....57
- Tabela 9** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β-glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....59
- Tabela 10** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....59

- Tabela 11** - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C, tendo como resposta as atividades de celulasas.....63
- Tabela 12** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....65
- Tabela 13** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....65
- Tabela 14** - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no cultivo isolado do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C, tendo como resposta as atividades de celulasas.....69
- Tabela 15** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....71
- Tabela 16** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de Endoglucanase obtida pelo cultivo do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).....71
- Tabela 17** - Comparação das atividades enzimáticas obtidas a partir dos cultivos de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2 (farelo de soja 0,5% m/v + palha de cana pré-tratada 0,5% m/v) e em meio contendo celulose 1% m/v, sob as melhores condições de cultivo para a produção de celulasas, selecionadas mediante planejamento experimental.....73
- Tabela 18** - Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado na caracterização enzimática, e atividades relativas de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato do cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM0174
- Tabela 19** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade relativa de β -glicosidase obtida pelos ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 76
- Tabela 20** - Análise da variância (ANOVA) para a atividade relativa de endoglucanase obtida pelo ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 76

Tabela 21 - Sacarificação das palhas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes pré-tratamentos utilizando-se o extrato enzimático obtido pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, em meio 2, sob a melhor condição de cultivo definida para a produção de β -glicosidase (cargas de substrato e inóculo a 6,0 % e 6 discos miceliais, respectivamente, sob agitação de 254 rpm). Os ensaios foram conduzidos com carga de substrato (palha pré-tratada) a 5,0 % (p/v), sob 50 °C e 250 rpm, por 24h.....84

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS..... | 19 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 3.1 Materiais lignocelulósicos e o etanol de segunda geração..... | 20 |
| 3.2 Estrutura do material lignocelulósico..... | 21 |
| 3.3 Celulases..... | 23 |
| 3.4 Produção de Celulases Fúngicas por Fermentação Submersa (FSbm)..... | 25 |
| 3.5 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos..... | 27 |
| 3.6 Sacarificação Enzimática de materiais lignocelulósicos..... | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 Microrganismos e estabelecimento das culturas de trabalho..... | 30 |
| 4.2 Caracterização química dos substratos lignocelulósicos empregados como fonte de carbono para produção de celulases..... | 31 |
| 4.3 Produção de celulases por fermentação submersa na condição de co-cultivo dos fungos..... | 32 |
| 4.3.1 Avaliação da influência do substrato lignocelulósico, da agitação e do tempo de cultivo..... | 32 |
| 4.3.2 Avaliação da influência da proporção do inóculo..... | 33 |
| 4.3.3 Avaliação da influência do melaço de soja e do uso dos substratos lignocelulósicos triturados..... | 33 |
| 4.3.4 Planejamento experimental para seleção das melhores condições de cultivo isolado e de co-cultivo dos fungos..... | 35 |
| 4.3.5 Cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 em meio contendo celulose como substrato..... | 36 |
| 4.3.6 Análise estatística..... | 36 |
| 4.4 Determinação das atividades enzimáticas..... | 37 |
| 4.4.1 Endoglucanase..... | 37 |
| 4.4.2 Exoglucanase..... | 37 |
| 4.4.3 β -glicosidase..... | 37 |
| 4.4.4 FPase..... | 38 |
| 4.5 Caracterização físico-química de endoglucanase e β-glicosidase presentes no extrato do cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01..... | 38 |
| 4.5.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas..... | 38 |
| 4.5.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas..... | 39 |
| 4.5.3 Efeito da glicose e do etanol sobre a atividade de β -glicosidase..... | 40 |
| 4.6 Pré-Tratamentos da palha de cana-de-açúcar..... | 40 |
| 4.6.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino..... | 40 |
| 4.6.2 Pré-tratamento hidrotérmico ácido e hidrotérmico ácido seguido de hidrotérmico alcalino..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7 Sacarificação Enzimática das palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas..... | 41 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 42 |
| 5.1 Caracterização química dos substratos lignocelulósicos empregados na produção de celulases..... | 42 |
| 5.2 Avaliação da influência do substrato lignocelulósico, da agitação e do tempo sobre a produção das enzimas pelo co-cultivo dos fungos..... | 43 |
| 5.3 Avaliação da influência da proporção do inóculo na produção das enzimas..... | 50 |
| 5.4 Avaliação da influência do melaço de soja e do uso dos substratos lignocelulósicos triturados sobre a produção das celulases..... | 52 |
| 5.5 Seleção das melhores condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos..... | 56 |
| 5.5.1 Co-cultivo de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04..... | 56 |
| 5.5.2 Cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01..... | 63 |
| 5.5.3 Cultivo isolado de <i>Saccharicola</i> sp. EJC04..... | 67 |
| 5.5.4 Cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 em meio contendo celulose como substrato..... | 73 |
| 5.6 Caracterização físico-química de endoglucanase e β-glicosidase presentes no extrato selecionado produzido a partir do cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01..... | 74 |
| 5.6.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas..... | 74 |
| 5.6.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas..... | 80 |
| 5.6.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase..... | 82 |
| 5.7 Sacarificação enzimática das palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas..... | 84 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 87 |
| REFERÊNCIAS..... | 88 |

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética nas últimas décadas tem impulsionado o interesse na bioconversão de materiais lignocelulósicos a etanol, uma excelente fonte de energia renovável. Considerando-se a possibilidade de escassez do petróleo e a redução de outras fontes de energia não renováveis como o carvão e o gás mineral, tornam-se necessárias pesquisas que visem um melhor aproveitamento da biomassa lignocelulósica para suprir a necessidade energética no futuro (SANTOS et al., 2016). As celulasas destacam-se neste contexto, atuando sinergicamente na hidrólise da celulose levando à obtenção de glicose como produto final, a qual pode então ser utilizada para a obtenção de etanol celulósico (HOOD et al., 2007; NARRA et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

Celulasas são produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos, onde estes têm se destacado como melhores produtores, sendo os gêneros mais citados na literatura *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Chrysosporium* e *Trametes* (PANDEY et al., 2016; BEHERA e RAY 2016). Essas são enzimas de grande valor comercial, sendo aplicadas, não só na conversão de biomassa a glicose, mas também nas indústrias têxtil, de polpa e papel, de detergentes, de alimentos (incluindo alimentação animal), e farmacêutica (SHARMA et al., 2016).

Produzir celulasas torna-se mais viável quando materiais lignocelulósicos são utilizados como substratos indutores, pois sendo amplamente disponíveis e de baixo custo possibilitam diminuição do custo do processo, especialmente em larga escala. Além disso, o emprego dessa biomassa contribui para a diminuição dos problemas causados pela disposição inadequada das mesmas no ambiente (AGOSTINHO et al., 2015). Sendo a economia do Brasil baseada na agricultura e na agroindústria, cujos produtos principais são cana-de-açúcar, café, soja e outros grãos, mandioca e frutas, o uso de materiais lignocelulósicos como substratos para a produção de celulasas é uma estratégia interessante. Tais cultivos geram milhares de toneladas de subprodutos lignocelulósicos como farelos, bagaços, palhas e sabugos compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, cuja quantidade é estimada em 1.000 t/ano. O percentual destes três componentes na parede celular vegetal varia entre os diferentes tipos de resíduos (GOMES et al, 2012; KUMAR et al., 2012). A palha de cana-de-açúcar, que representa toda a parte aérea da planta,

exceto os colmos industrializáveis, se destaca como fonte energética por apresentar grande potencial para geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico. Sua composição química é estimada em 40-44 % de celulose, 30-32 % de hemicelulose e 22-25 % de lignina. Sua capacidade de geração de energia representa 1/3 da energia potencial da cana-de-açúcar a ser subaproveitada (SANTOS et al., 2012).

Para realizar a hidrólise dos materiais lignocelulósicos a um menor custo, as celulasas podem ser produzidas por microrganismos cultivados pelos processos de fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSbm), empregando-se resíduos lignocelulósicos como substratos. As indústrias utilizam preferencialmente o processo de fermentação submersa tanto para a produção de celulasas quanto de outras enzimas. Esta escolha é atribuída à maior facilidade de desenvolvimento de reatores destinados a este processo, quando comparado com a fermentação em estado sólido. Além disso, esta tecnologia apresenta diversas vantagens em comparação à FES, principalmente em relação à maior facilidade de monitoramento dos parâmetros do processo como temperatura, agitação, aeração, pH, entre outros, os quais podem ser extensivamente controlados, dependendo do tipo de reator empregado. A FSbm também possibilita aos microrganismos uma melhor absorção de nutrientes e facilita a recuperação dos seus metabólitos (CASTRO e PEREIRA JR, 2010). A empresa líder mundial em produção de enzimas, Novozymes, utiliza FSbm para a produção de celulasas. Outro exemplo é a Dyadic, que produz celulasas pelos cultivos de *Myceliophthora thermophila* e *Trichoderma longibrachiatum* por este processo (HANSEN et al., 2015).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é vantajosa quando comparada com a química, pois pode ser conduzida sob condições moderadas de pH e temperatura, não acarreta problemas de corrosão nos equipamentos e não leva à formação de subprodutos (YANG et al., 2011). Porém, esses materiais são recalcitrantes devido à própria cristalinidade de algumas regiões da celulose, bem como ao entrelaçamento deste polímero com a hemicelulose e a lignina. A lignina atua como material incrustante, dando rigidez e resistência à célula e reduzindo o acesso da água e de enzimas à celulose, pela íntima associação com este polissacarídeo e com a hemicelulose, através de ligações covalentes e não covalentes (GOMES et al, 2012; KUMAR et al., 2012). Em relação à associação

entre lignina e celulose, ligações covalentes (principalmente éter) tem sido propostas (ZHANG et al., 2015).

Assim, para que o acesso das celulasas à celulose seja facilitado, com conseqüente maior liberação de glicose, é necessária uma etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico, podendo esse ser biológico, químico, físico, ou alguma combinação destes. Este processo visa diminuir a recalcitrância da biomassa pela desestruturação da lignocelulose, diminuição do grau de cristalinidade da celulose, solubilização da hemicelulose e remoção da lignina, promovendo maior exposição da celulose (RAMOS, 2003).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o estudo da produção de celulasas pelo cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC 04, por FSbm. Os fungos foram escolhidos por terem se destacado na produção de celulasas por FES (MARQUES, 2013; MARQUES, 2017). A utilização de materiais lignocelulósicos como substrato foi proposta com o intuito de diminuir os custos do processo, e ferramentas de planejamento experimental foram empregadas com a finalidade de avaliar a influência das condições do processo sobre a produção das enzimas, visando melhores resultados. Além disso, o extrato selecionado com base nas maiores atividades enzimáticas foi empregado na sacarificação de palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas, para a obtenção de açúcares fermentescíveis, que podem ser utilizados na produção de etanol de segunda geração.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral o estudo da produção de celulases pelos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC 04, por fermentação submersa, utilizando-se co-cultivos e cultivos isolados, bem como o uso das enzimas na sacarificação da palha de cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterização química dos substratos lignocelulósicos empregados nas fermentações submersas;
- Avaliação da influência de diferentes substratos lignocelulósicos, do tempo de cultivo, da agitação, da proporção de inóculo, do melaço de soja, e do emprego de substratos triturados e peneirados em malha de 1 mm de diâmetro, na produção de endoglucanase, β -glicosidase, exoglucanase e FPase pelo co-cultivo dos fungos por fermentação submersa;
- Avaliação da influência das variáveis carga de substrato, carga de inóculo e velocidade de agitação sobre a produção das enzimas, através de planejamentos experimentais, avaliando como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase, visando a melhoria das condições de co-cultivo e cultivos isolados, e seleção da melhor condição;
- Realização de cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, sob a condição que proporcionou a melhor produção de celulases, utilizando-se celulose (Sigma-Aldrich) como substrato e avaliação da produção das enzimas, para fins comparativos;
- Caracterização físico-química das enzimas endoglucanase e β -glicosidase do extrato selecionado para a sacarificação da palha de cana-de-açúcar;
- Aplicação do extrato enzimático produzido no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, na sacarificação de palhas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tipos de pré-tratamento e quantificação de açúcares fermentescíveis liberados nos hidrolisados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Materiais lignocelulósicos e o etanol de segunda geração

Para suprir a crescente demanda energética mundial, o etanol tem se mostrado uma alternativa promissora, podendo a sua produção ocorrer de duas formas: primeira geração, obtido a partir de matérias primas ricas em sacarídeos, e de segunda geração, obtido a partir de materiais lignocelulósicos - ou biomassa lignocelulósica (PEREIRA JUNIOR, 2010).

Dentre as fontes de energia renováveis, os materiais lignocelulósicos são vistos como os mais interessantes devido a diversas razões: o aproveitamento de resíduos agroindustriais para geração de produtos com alto valor agregado, a não competição com a produção de alimentos, e a contribuição na redução das emissões de gases do efeito estufa, por ser formada a partir de CO₂ e H₂O aproveitando a energia solar. Além disso, a bioenergia produzida pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região que a utiliza, e os recursos frequentemente estão disponíveis no local de produção. Assim, os combustíveis de segunda geração produzidos a partir da biomassa, são uma ótima alternativa, apresentando vantagens ambientais e econômicas (LIMAYEM e RICKE, 2012; PANDEY et al., 2011; PACHECO 2011).

A depender da localidade, a fonte lignocelulósica utilizada para produção do bioetanol varia. Na Índia, há uma destilaria de produção de etanol de segunda geração a partir de sorgo doce. Na Itália e França, os resíduos de uva gerados na produção do vinho são utilizados para a produção do combustível. Em 2007 na China foi construída a primeira usina de etanol de mandioca em grande escala do mundo. No Brasil, dentre as opções de resíduos agroindustriais como fontes lignocelulósicas para produção de etanol de segunda geração existentes, a palha e o bagaço de cana-de-açúcar são os mais estudados e vistos como os mais promissores (BALAT, 2012; LIU, S. H. e LIU, X. F., 2010).

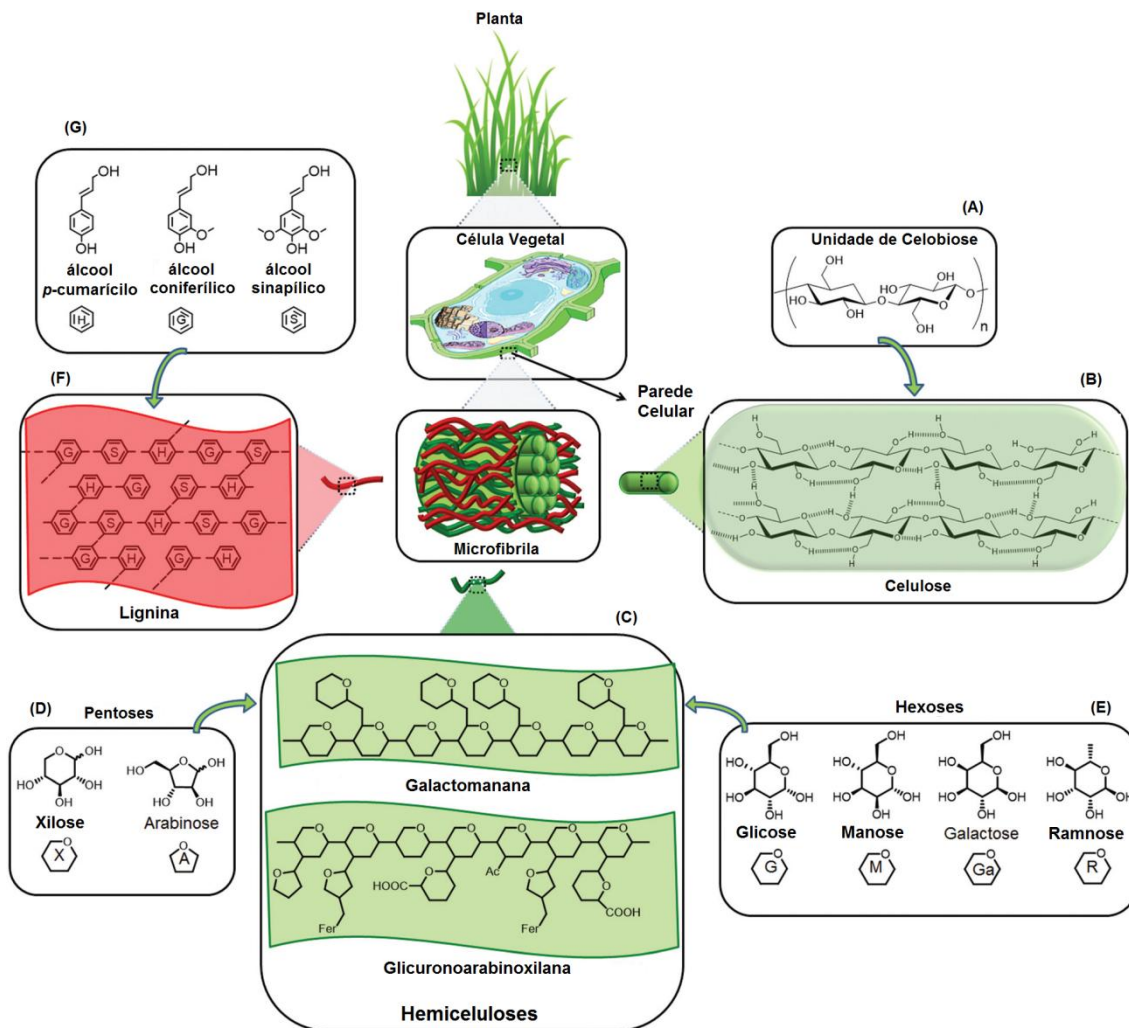
A rota bioquímica de produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço e da palha de cana aproveita parte da tecnologia e da infraestrutura utilizadas para produção do etanol de primeira geração, sendo necessárias duas etapas adicionais ao processo convencional: o pré-tratamento e a hidrólise da biomassa, de modo que a solução de açúcares obtida nessa hidrólise possa ser

misturada ao caldo de cana e seguir para a fermentação (DIAS et al., 2009; CARDONA et al., 2010).

3.2 Estrutura do material lignocelulósico

Materiais lignocelulósicos, também chamados de resíduos lignocelulósicos, ou ainda biomassa lignocelulósica, constituem a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. A lignocelulose é o principal componente estrutural da parede vegetal, composto por celulose, hemicelulose e lignina (Fig. 1). A proporção destes polímeros varia de acordo com as espécies, tecidos e maturidade do vegetal. Além da lignocelulose, estão presentes proteínas, óleos e cinzas. A lignocelulose confere resistência à degradação vegetal e sua robustez ou recalcitrância originam-se das características dos seus polímeros, como a cristalinidade da celulose, a hidrofobicidade de lignina, e o envolvimento da celulose pela matriz lignina-hemicelulose (BARAKAT et al., 2013; AGBOR et al., 2011). Geralmente, materiais lignocelulósicos consistem em 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina (MOOD et al., 2013; SANTOS et al., 2012; SAHA, 2005).

Figura 1 - Estrutura do material lignocelulósico: da célula vegetal aos seus principais constituintes. A: Unidade de celobiose. B: Estrutura química das cadeias de celulose. C: Heteropolímeros componentes da hemicelulose. D: Pentoses componentes da hemicelulose. E: Hexoses componentes da hemicelulose. F: Estrutura química da cadeia de lignina. Fig. G: Unidades monoméricas fenilpropanóides componentes da estrutura da lignina.



Fonte: Adaptada de Isikgor e Becer, 2015.

A celulose é o polímero mais abundante do material lignocelulósico, sendo a estrutura principal da célula vegetal. A unidade de repetição que compõe sua cadeia é o dissacarídeo celobiose (Fig. 1A). Sua estrutura consiste em cadeias extensas de unidades de celobiose unidas por ligações β -1,4. Estas cadeias, com a presença de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (Fig. 1B), formam as microfibrilas de celulose. A organização mais coesa dessas ligações faz com que a microfibrila seja de natureza cristalina, tornando-a mais recalcitrante à degradação;

algumas partes da sua estrutura podem ser de natureza amorfa, sendo mais suscetíveis à hidrólise enzimática. (ZHOU, et al., 2011; ERIKSSON e BERMEK, 2009).

O segundo polímero mais abundante é a hemicelulose e, diferentemente da celulose, tem uma estrutura amorfa e aleatória, composta de vários heteropolímeros como xilanas, galactomananas, glicuronoxilanas, arabinoxilanas, glicomananas e xiloglicanas (Fig. 1C). Os heteropolímeros de hemicelulose diferem entre os resíduos lignocelulósicos, variando na combinação da sua composição com unidades distintas de monossacarídeos de 5 e 6 carbonos: pentoses (xilose, arabinose) (Fig. 1D), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares acetilados (Fig. 1E). As hemiceluloses são incorporadas à parede celular da planta para formar uma complexa rede de ligações que fornecem força estrutural, fazendo ligações cruzadas com a lignina e se ligando às microfibrilas de celulose (Fig. 1) (AGBOR et al., 2011; SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

A lignina é um polímero de unidades fenilpropanóides, de estrutura tridimensional, e funciona como material inscrustante, que fornece resistência à compressão do tecido vegetal e das fibras individuais, rigidez à parede celular e resistência a insetos e patógenos (Fig. 1F). A estrutura da lignina se dá a partir de três subunidades diferentes: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico. As unidades monoméricas fenilpropanóides correspondentes, quando incorporadas no polímero de lignina, são identificadas como unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Fig. 1G) (RUBIN, 2008; ABDEL-HAMID et al. 2013).

3.3 Celulases

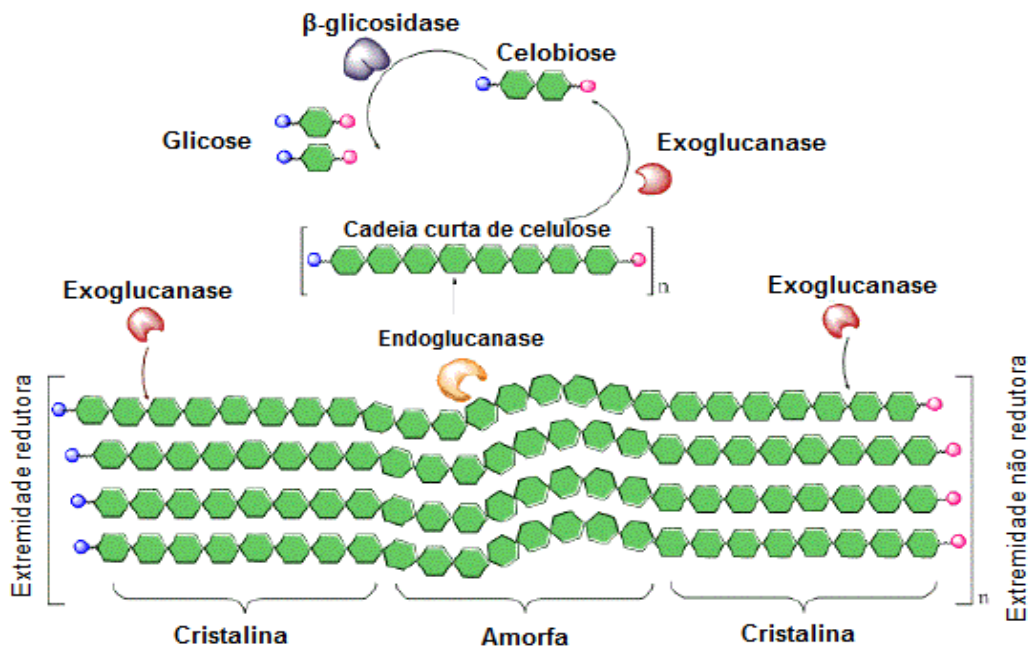
Celulases são enzimas sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante seus crescimentos em materiais celulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos, anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos (SUN e CHENG, 2002).

Tais enzimas são importantes biocatalizadores na conversão de biomassa lignocelulósica, no processo de hidrólise enzimática para produção de etanol, além de outras diversas aplicações como a indústria têxtil, indústrias de papel e celulose, vinícolas e cervejarias, indústrias de alimentos processados e de alimentação

animal, indústrias agrícolas, na extração de óleo de oliva e de carotenóides, em indústrias de gestão de resíduos, entre outras (KUHAD et al., 2011).

As celulases são compostas por pelo menos três enzimas de estrutura e funcionalidade distintas, que formam o complexo celulolítico. As três celulases principais, atuando sinergisticamente, podem conferir a hidrólise completa da celulose. São elas: endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases e β -glicosidases (BGL, EC 3.2.1.21). As endoglucanases clivam a cadeia de celulose de maneira aleatória, preferencialmente nas regiões amorfas, diminuindo o grau de polimerização do substrato e gerando celooligossacarídeos com novas extremidades. As exoglucanases I e II, então, agem sobre as extremidades redutoras (E.C. 3.2.1.176) e não redutoras (E.C. 3.2.1.91), respectivamente, dos celooligossacarídeos liberando celobiose como produto principal. Por fim, as β -glicosidases hidrolisam as celobioses (e, menos freqüentemente, celodextrinas) em glicose (Figura 2) (WOOD, 1980; HAMID et al., 2015).

Figura 2 - Representação esquemática da ação do complexo celulolítico microbiano.



Fonte: adaptado de Sajith et al. (2016)

3.4 Produção de Celulases Fúngicas por Fermentação Submersa (FSbm)

A fermentação submersa, definida como sendo aquela onde a fase aquosa é abundante, apresenta a vantagem de possibilitar um melhor controle dos parâmetros do processo, como temperatura, pH, aeração, agitação, e concentração de nutrientes. Pode ser realizada em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Todos esses fatores são importantes para o rendimento do produto de interesse, e por esse motivo a FSbm tem sido a mais aplicada na indústria. São conhecidos como inconvenientes do processo: a maior probabilidade de contaminação, devido à maior quantidade de água; e o favorecimento à repressão catabólica, quando comparada à fermentação em estado sólido, pelo fato de os açúcares (glicose) estarem dispersos em todo o meio líquido. (VAIDYANATHAN et al., 1999; PANDEY, 2002; LIMA et al., 2003; PAPAGIANNI, 2004; SÁNCHEZ, 2009). Aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por FSbm, geralmente com o emprego de microrganismos geneticamente modificados. Isso porque, os microrganismos selvagens são mais adaptados às condições fornecidas por fermentação em estado sólido, a qual simula melhor seu habitat natural (FARINAS et al., 2014).

Dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos apresentam grande potencial para produção de enzimas industriais, incluindo as celulases (CORRÊA et al. 2014). Os fungos endofíticos são aqueles que vivem na estrutura interna das plantas, especialmente folhas, caules e raízes, sem causar nenhum sintoma evidente a seus hospedeiros, em uma relação definida como endossimbiose (AZEVEDO et al., 2001; HYDE e SOYTONG, 2008). Embora pouco estudados no sentido ecológico, muitos deles são conhecidos por produzir uma variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos com possíveis aplicações em ativos anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatórios e outros produtos com aplicações farmacêuticas (TANASOVA e STURLA 2012; PANT et al. 2014). Estima-se que, dentre as espécies de plantas superiores identificadas, cada uma possui um ou mais endofíticos, e acredita-se que essa colonização contribua para a adaptação da planta hospedeira a fatores de estresse bióticos e abióticos (STROBEL e DAISY, 2003; BANDARA et al., 2006; ZHANG et al. 2006; BAE et al. 2009). Quanto aos fatores bióticos, sabe-se que os metabólitos secundários produzidos pelos fungos servem para o aumento da resistência do hospedeiro contra patógenos e herbívoros

(RODRIGUEZ et al., 2009). Os endófitos produzem hidrolases extracelulares tanto para adentrarem as células vegetais, quanto para obterem nutrição a partir do hospedeiro (HYDE E SOYTONG, 2008). Após adentrarem a planta hospedeira, geralmente assumem um estado latente durante toda a vida do tecido vegetal ou por um longo período de tempo, ou seja, até que as condições ambientais sejam favoráveis ao fungo ou até que ocorram mudanças do estado ontogenético do hospedeiro, sendo vantajoso para o microrganismo tornar-se patogênico (RODRIGUEZ E REDMAN 2008).

Os fungos filamentosos vêm sendo empregados em diversos estudos visando à produção de celulases em cultivo submerso utilizando materiais lignocelulósicos como substratos (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de estudos empregando fungos filamentosos para a produção de celulases por fermentação submersa, tendo materiais lignocelulósicos como substrato.

| Microrganismo | Fonte de Carbono | Atividade Enzimática | | | Referências |
|---------------------------------------|------------------|----------------------|-------|--------|---------------------------|
| | | Endo* | Beta* | FPase* | |
| <i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1 | Bagaço de cana | 1,86 | 0,28 | 1,25 | Camassola e Dillon (2014) |
| <i>Trichoderma reesei</i> Rut-C30 | Bagaço de cana | 1,6 | 0,02 | 0,02 | Florencio et al. (2016) |
| <i>Aspergillus niger</i> A12 | Bagaço de cana | 0,6 | 0,1 | 0,01 | Florencio et al. (2016) |
| <i>T. reesei</i> ZU-02 | Sabugo de milho | n/i* | n/i | 5,25 | Liming e Xueliang (2004) |
| <i>A. niger</i> A12 | Bagaço de cana | 1,72 | n/i | n/i | Cunha et al. (2014) |
| <i>Neurospora crassa</i> cell-1 | Palha de trigo | 19,7 | 0,58 | 1,33 | Romero et al. (1999) |
| <i>P. janthinellum</i> NCIM 1171 | Bagaço de cana | 21,5 | 2,3 | 0,55 | Adsul et al. (2004) |
| <i>T. viride</i> NCIM 1051 | Bagaço de cana | 33,8 | 0,33 | 1 | Adsul et al. (2004) |
| <i>P. chrysosporium</i> NCIM 1106 | Casca de Sorgo | n/i | n/i | 0,12 | Waghmare et al. (2014) |
| <i>P. janthinellum</i> | Palha de Trigo | n/i | n/i | 3,1 | Singhania et al. (2014) |
| <i>P. citrinum</i> | Farelo de Trigo | n/i | n/i | 1,72 | Dutta et al. (2008) |
| <i>T. reesei</i> Rut C-30 | Palha de Arroz | n/i | n/i | 1,07 | Hideno et al. (2011) |

* Endo = Endoglucanase (U/mL); Beta = β -glicosidase (U/mL); FPase (FPU/mL). n/i: Não informado.

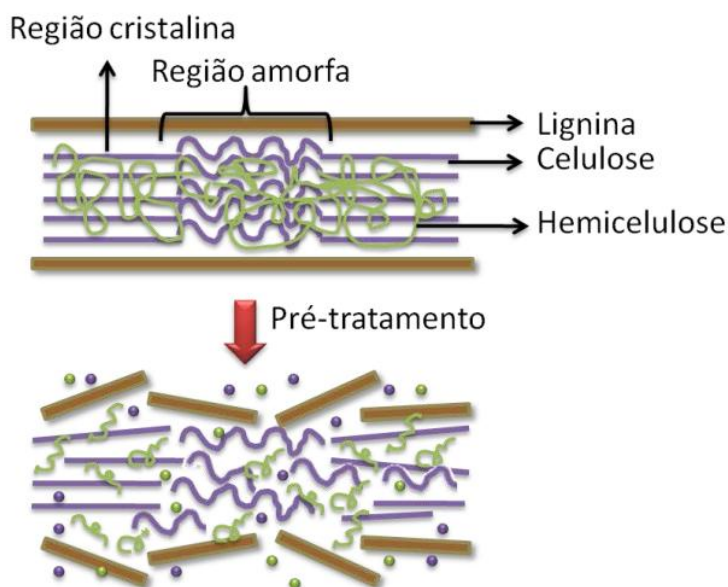
Fonte: Elaborado pelo autor

Além destes, outros estudos empregando fungos endofíticos na produção de enzimas de degradação de material lignocelulósico foram realizados. Silva (2014) avaliou a produção de celulases e xilanases por linhagens de fungos filamentosos endofíticos isolados de plantas da região Amazônica, usando o farelo de trigo como substrato indutor em fermentação submersa. As linhagens de *Aspergillus niger* apresentaram as máximas produções de celulases (CMCase, β -glicosidase e FPase) enquanto as de *Penicillium* spp. foram melhores para produção de xilanase. Albano (2012) obteve melhores produções de celulases e xilanases em fermentação submersa, quando comparada com a fermentação em estado sólido, pelos fungos *Aspergillus fumigatus* M51 e *T. reesei*, tendo bagaço de cana como substrato. Os resultados alcançados nestas e em outras pesquisas confirmam o potencial celulolítico e xilanolítico dos fungos endofíticos, credenciando-os para a produção de produtos biotecnológicos, como o etanol de segunda geração.

3.5 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento é uma etapa essencial no processo da produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica. Nesse processo, que pode ser físico, químico ou biológico, objetiva-se romper a barreira estrutural formada pela lignina, liberando o acesso aos carboidratos componentes da celulose e da hemicelulose, ou reduzir o tamanho da partícula de celulose, para que as celulases realizem a hidrólise enzimática (Figura 3). Cada tipo de pré-tratamento apresenta vantagens e desvantagens, mas sabe-se que uma hidrólise enzimática que apresentaria um rendimento de açúcares menor que 20% pode ter aumento em até mais que 90% se uma etapa de pré-tratamento for empregada (GOSH e GHOSE, 2003; OGEDA e PETRI, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do efeito do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica.



Fonte: Angarita-Martínez (2014), adaptada de Mosier et al., (2005).

Um pré-tratamento efetivo visa a preservação das frações hemicelulósicas, a produção de teores máximos de açúcares fermentescíveis, baixa perda de carboidratos da fração de celulose e hemicelulose, e a minimização da formação de inibidores de enzimas hidrolíticas e de microrganismos fermentadores. O melhor método e condições de pré-tratamento dependem muito do tipo de lignocelulose. Por ser uma das etapas que mais encarecem o processo de produção de bioetanol, busca-se também torná-la mais econômica (ASGUER et al., 2014; YANG e WYMAN, 2008).

Os inibidores de fermentação que podem ser formados durante a etapa de pré-tratamento são classificados em três grupos, com base em sua origem: ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico), furanos (furfural e hidroximetil furfural) e compostos fenólicos, sendo a concentração e a composição destes variáveis de acordo com o tipo de pré-tratamento e condições aplicadas (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O pré tratamento hidrotérmico é considerado uma tecnologia limpa, pois utiliza água como reagente principal, evitando problemas de corrosão e necessidade de neutralização de resíduo (SAHA et al., 2013). As principais variáveis que

influenciam a eficiência desse processo são o tempo de retenção e a temperatura do processo. Ocorre de forma que a pressão é aplicada para manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas (160-240 °C) provocando alteração na estrutura do material lignocelulósico. Baseia-se, portanto, na solubilização da hemicelulose através da água quente, tornando a celulose mais acessível e minimizando a formação de inibidores de fermentação (SILVA et al., 2013).

O pré-tratamento hidrotérmico alcalino é empregado para a remoção de lignina do material lignocelulósico, aumentando o grau de digestibilidade da celulose, porém a liberação de açúcares é menor do que a obtida em outros processos, e o volume de efluentes gerados é maior. Pode ser realizado em diferentes combinações de temperatura e tempo, e os reagentes mais frequentemente empregados são o hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio. O NaOH, além de remover a lignina, diminui o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (KUMAR & WYMAN, 2009; TAHERZADEH e KARIMI, 2008)

Já em relação ao pré-tratamento hidrotérmico ácido, o objetivo é a remoção da fração de hemicelulose do resíduo lignocelulósico, tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático. Pode ser realizado através do emprego de ácidos concentrados ou diluídos, como o H₂SO₄ e o HCl. O processo com ácido diluído pode ser empregado a alta temperatura (180 °C) por curto tempo ou a temperaturas mais baixas (120 °C) por maior período (30 a 90 minutos) e, embora possa formar alguns inibidores de fermentação, essa ocorrência é em menor intensidade do que quando são utilizados ácidos concentrados (SAHA et al., 2013; SUN e CHENG, 2002).

3.6 Sacarificação Enzimática de materiais lignocelulósicos

A hidrólise enzimática da celulose pela celulase ocorre em três etapas principais, que são: a adsorção das celulases na superfície da celulose, a quebra da celulose através da ação sinérgica das celulases, e a dessorção da celulase do resíduo de celulose no sobrenadante (OGEDA, 2011). A reação ocorre em meio heterogêneo, no qual as enzimas estão dissolvidas na fase líquida e a celulose constitui a fase sólida (GAN, et al., 2003).

Quando comparada ao processo de hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é realizada sob condições mais brandas de pH e temperatura, devido a alta

especificidade que as celulases tem pela celulose, o que favorece a formação do complexo enzima-substrato. Assim, torna-se possível a degradação das cadeias de celulose a monômeros de glicose, a uma taxa de conversão de quase 100% (DE CASTRO, PEREIRA JUNIOR, 2010).

Fatores relacionados tanto à enzima quanto ao substrato podem influenciar o processo de hidrólise, de forma que a composição do substrato, o tipo de pré-tratamento empregado, e a carga e eficiência das enzimas utilizadas devam ser combinados da melhor forma para que ocorra uma eficiente sacarificação do material lignocelulósico (ALVIRA et al., 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos e estabelecimento das culturas de trabalho

Foram utilizados os fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, pertencentes à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ/UNESP. *Botryosphaeria* sp. AM01 foi isolado de folhas saudáveis de *Alibertia macrophylla*, coletadas no Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica de Mogi Guaçu, antiga Fazenda Campininha, localizada no distrito de Martinho Prado Junior, no município de Mogi Guaçu (SP), nas coordenadas geográficas 22°18'S e 47°11'W. *Saccharicola* sp. EJC04 foi isolado de folhas e caules saudáveis de *Eugenia jambolana*, coletadas na cidade de Araraquara-SP, nas coordenadas geográficas 21°45'51.9"S 48°09'56.8"W, pela Dr. Vanessa Mara Chapla e identificado por taxonomia molecular, pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) em Paulínia-SP.

Os fungos foram cultivados em Ágar Batata Dextrose (BDA) em placas de Petri, por 6 a 7 dias, a 28 °C. Em seguida, as culturas foram estocadas pelo método de Castellani (1939) e também repicadas no mesmo meio de cultivo, em tubos de tampa de rosca contendo mantidos a 28 °C, estabelecendo-se assim as culturas de trabalho, evitando-se repiques sucessivos.

4.2. Caracterização química dos substratos lignocelulósicos empregados como fonte de carbono para produção de celulases

Os substratos lignocelulósicos empregados nos experimentos de produção enzimática foram caracterizados quanto à umidade, lignina total (lignina ácida solúvel e lignina ácida insolúvel), celulose, hemicelulose e outros componentes segundo metodologia proposta pelo *National Renewable Energy Laboratory-EUA* (NREL) (HAMES et al., 2008; SLUITER et al., 2008a, 2008b, 2012). Realiza-se esse procedimento em duas etapas para que se facilite as análises de lignina e carboidrato.

A primeira etapa é realizada apenas com as amostras *in natura*, pois trata-se da determinação dos teores de extrativos, que não são detectados em amostras pré-tratadas. Foram analisadas triplicatas de cada material, de peso e umidade conhecidos. Após pesado e empacotado em papel filtro, o material foi levado ao Soxhlet, passando pela primeira extração com água destilada e pela segunda extração com etanol (ambas com 3 escoamentos). Em seguida, o material foi seco em estufa a 105 °C, até peso constante, para a determinação da umidade.

O material insolúvel em ácido e a lignina solúvel em ácido foram determinados por gravimetria e espectroscopia em UV, respectivamente. Em triplicata, foram preenchidos tubos de ensaio com quantidades conhecidas de material, os tubos foram levados a banho-maria a 30 °C, e acrescentados de 3,0 mL de H₂SO₄ 72 % (p/v). Os tubos foram mantidos nessa condição por 60 minutos, tendo seu conteúdo homogeneizado a cada 10 minutos. O conteúdo do tubo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL e acrescentou-se, a cada um, 84 mL de água destilada (diluindo o ácido para 4 %) e, então, os frascos foram autoclavados por 1 hora a 121 °C. Após autoclavagem, o conteúdo dos frascos foi filtrado em cadinhos filtrantes e seus líquidos recolhidos em balões de 100 mL. Assim, foram obtidas as frações: solubilizada (parte líquida) e sólida (insolúvel em líquido). O sólido foi levado à estufa de secagem, a 105 °C, até peso constante, possibilitando a determinação da lignina insolúvel. Parte do líquido foi filtrado em sep-pack c18 e analisado por Comatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação do teor de celulose, hemicelulose e outros componentes. Outra parte do líquido foi diluída em 50 mL de água destilada e analisada em espectrofotômetro a 205 nm, para determinação de lignina insolúvel, utilizando-se água destilada como

branco. Para determinação de cinzas, amostras dos materiais foram levadas à mufla por 12 min a 105 °C, 30 min a 250 °C, e 3h a 575 °C, em cadinhos de porcelana previamente pesados.

4.3. Produção de celulasas por fermentação submersa na condição de co-cultivo dos fungos

4.3.1. Avaliação da influência do substrato lignocelulósico, da agitação e do tempo de cultivo

Foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de solução nutriente, com carga de 1% (m/v) de substrato lignocelulósico, a 28 °C. A solução nutriente utilizada foi composta por (g/L): KH_2PO_4 (2,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4), ureia (0,3), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3), CaCl_2 (0,1), tween 80 (2,0) e glicose (1,0). Além destes componentes, foi adicionada a solução de sais (0,1% v/v) composta por (mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (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) (modificado de PEREIRA et al., 2015). Em relação ao substrato lignocelulósico utilizado como fonte de carbono, os meios utilizados foram:

- Meio 1: palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos (1% m/v), cedida pela Empresa GranBio, de Campinas – SP;
- Meio 2: palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos, cedida pela GranBio (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v);
- Meio 3: farelo de trigo (0,5% p/v) e farelo de soja (0,5% m/v).

Os valores de pH inicial e final dos meios de cultivo de cada frasco foi medido, e estes foram de aproximadamente 5,1 e 5,3, respectivamente. Cada frasco Erlenmeyer foi inoculado com 3 discos miceliais (8 mm de diâmetro) de cada fungo, tomados a partir de pré-inóculos realizados em placa contendo Agar BDA (como descrito no item 4.1). Os cultivos foram realizados em duplicata e mantidos sob agitação (100 rpm) ou estáticos, por 14 dias (exceto para os experimentos agitados com meios de cultivo 1 e 2, os quais foram mantidos por 10 dias). A cada 48 horas,

os conteúdos dos frascos foram filtrados em tecido de *nylon*, as fases líquidas foram centrifugadas a 10.000 *xg*, por 20 minutos, a 0 °C. Os sobrenadantes foram usados para a determinação das atividades enzimáticas.

4.3.2. Avaliação da influência da variação de proporção do inóculo

Para a avaliação da influência da proporção de inóculo de cada fungo sobre a produção das celulasas, os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de solução nutriente, 200 µL de solução de sais e 1% de carga de substrato lignocelulósico (meio 2), por 6 dias, a 28 °C, sob agitação de 100 rpm (condição selecionada a partir dos experimentos realizados como descrito no item 4.3.1), variando-se a quantidade de discos miceliais (8 mm de diâmetro) de cada fungo, como descrito abaixo:

- Experimento 01: 1 disco de AM01 e 5 discos de EJC04;
- Experimento 02: 1 disco de EJC04 e 5 discos de AM01;
- Experimento 03: 2 discos de AM01 e 4 discos de EJC04;
- Experimento 04: 2 discos de EJC04 e 4 discos de AM01.
- Experimento 05: 3 discos de EJC04 e 3 discos de AM01

Os cultivos foram realizados em duplicata. Após o tempo de cultivo, os conteúdos dos frascos Erlenmeyer foram filtrados em tecido de *nylon*, as fases líquidas foram centrifugadas a 10.000 *xg*, por 20 minutos, a 0 °C e os sobrenadantes foram usados para a determinação das atividades enzimáticas.

4.3.3. Avaliação da influência do melão de soja e do uso dos substratos lignocelulósicos triturados

Nesta etapa, houve uma adaptação da proporção entre quantidade de meio de cultivo e o volume do frasco, a qual passou a ser 1:5. Desta forma, utilizaram-se 25 mL de solução nutriente, e 250 µL de solução de sais (no caso do experimento 3), além de palha de cana-de-açúcar pré-tratada e farelo de soja (0,5 % m/v cada) como substratos lignocelulósicos (componentes do meio 2, descrito no item 4.3.1). Esta proporção foi mantida nos experimentos subsequentes.

Os cultivos foram realizados empregando-se 6 discos de inóculo, sendo 3 de cada fungo, sob agitação de 100 rpm e mantidos a 28 °C, por 6 dias. Foi avaliada a influência do melaço de soja em substituição à solução nutriente e à solução de sais. O melaço, cuja composição é apresentada na Tabela 2 foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Arnaldo Sarti, sendo fornecido pela Empresa Caramuru Alimentos. Os componentes destacados em negrito são os que estão também presentes na solução nutriente e na solução de sais (descritas no item 4.3.1), empregadas no experimento 3.

Tabela 2 - Componentes do melaço de soja Caramuru.

| Componente | Unidade | Limite de quantificação | Resultados |
|-------------------|----------------|--------------------------------|-------------------|
| Glicose | g/L | 5 | 9,4 |
| Frutose | g/L | 5 | 10,1 |
| Galactose | g/L | 5 | 4,93 |
| Sacarose | g/L | 5 | 76,2 |
| Rafinose | g/L | 5 | 26,19 |
| Estaquiose | g/L | 5 | 80,6 |
| Cálcio | mg/100 mL | 0,2 | 24,55 |
| Fósforo | mg/100 mL | 0,03 | 60,16 |
| Magnésio | mg/100 mL | 0,03 | 302,97 |
| Potássio | mg/100 mL | 0,2 | 2211 |
| Enxofre | g/100 mL | 1 | 0,33 |
| Sódio | mg/100 mL | 0,2 | 526,7 |
| Cobre | mg/100 mL | 0,03 | 2,14 |
| Cobalto | mg/100 mL | 0,003 | <LQ |
| Manganês | mg/100 mL | 0,02 | <LQ |
| Zinco | mg/100 mL | 0,02 | 4,98 |
| Selênio | mg/100 mL | 0,003 | <LQ |

<LQ: menor que o limite de quantificação

Fonte: Grupo de pesquisa fornecedor do melaço.

Para o preparo dos meios de cultivo, o melaço foi diluído e autoclavado separadamente, sendo utilizado nas diluições finais de 10 e 30 vezes. Para a avaliação da influência do uso dos substratos lignocelulósicos triturados (palha de cana e farelo de soja), os mesmos foram processados em liquidificador e peneirados usando-se de malha de 1mm. Assim, foram utilizadas as condições de cultivo descritas abaixo:

- Experimento 01: melão diluído 10x + substratos não triturados;
 Experimento 02: melão diluído 30x + substratos não triturados;
 Experimento 03: solução nutriente + solução de sais + substratos triturados;
 Experimento 04: melão diluído 10x + substratos triturados;
 Experimento 05: melão diluído 30x + substratos triturados.

Os cultivos foram realizados em duplicata. Após o tempo de cultivo, os conteúdos dos frascos Erlenmeyer foram filtrados em tecido de *nylon*, as fases líquidas foram centrifugadas a 10.000 xg, por 20 minutos, a 0 °C e os sobrenadantes foram usados para a determinação das atividades enzimáticas.

4.3.4. Planejamento experimental para seleção das melhores condições de cultivo isolado e de co-cultivo dos fungos

A fim de se obter maiores atividades enzimáticas, realizou-se um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), avaliando-se a influência das variáveis carga de substrato, quantidade de discos de inóculo e velocidade de agitação. O efeito destas variáveis foi estudado em dois níveis, totalizando 18 experimentos, incluindo 4 repetições no ponto central. As variáveis e seus níveis são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis (níveis codificados e reais) do delineamento composto central rotacional empregado no co-cultivo e nos cultivos isolados dos fungos por fermentação submersa, em meio 2 contendo palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos cedida pela GranBio, e farelo de soja (1:1 p/p) como substratos, a 28 °C por 144 horas.

| Variável | Níveis | | | | | Unidade |
|-----------------------------|--------|-----|-----|-----|------|----------|
| | -1,68 | -1 | 0 | +1 | 1,68 | |
| x1 - Carga de substrato | 1 | 2 | 3,5 | 5 | 6 | m/v |
| x2 - Discos de inóculo | 3 | 4 | 6 | 8 | 9 | unidades |
| x3 - Velocidade de agitação | 86 | 120 | 170 | 220 | 254 | rpm |

Fonte: Elaborado pelo autor.

A resposta “atividade de β -glicosidade” foi modelada pela equação polinomial de segunda ordem, apresentada abaixo (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \dots \beta_k X_k + \beta_{kk} X_k^2 + \varepsilon$$

(Equação 1)

Onde: Y é a resposta predita; β_0 é o termo de intercepto; β_1 , β_2 são os efeitos lineares; β_{11} , β_{22} são os efeitos quadráticos; β_{12} são os efeitos de interação; x_1 , x_2 são as variáveis independentes; k é o número de variáveis independentes e ' ε ' é o erro experimental.

Os cultivos foram realizados empregando-se o meio 2 (farelo de soja + palha de cana-de-açúcar), a 28 °C, por 144 horas. Após este período, os conteúdos dos frascos Erlenmeyer foram filtrados em tecido de *nylon*, as fases líquidas foram centrifugadas a 10.000 xg, por 20 minutos, a 0 °C e os sobrenadantes foram usados para a determinação das atividades enzimáticas. Nessa etapa verificou-se o pH inicial e final de todos os cultivos.

4.3.5 Cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio contendo celulose como substrato

Foi realizado o cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, em triplicata, sob as condições que levaram à melhor atividade de β -glicosidase, determinada pelos experimentos realizados segundo o item 4.3.4 (254 rpm, 6 discos de inóculo, a 28°C, por 144 horas.), utilizando-se celulose (Sigma-Aldrich) como substrato (1,0% m/v), a título de comparação.

4.3.6 Análise estatística

A avaliação dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada utilizando-se o *software* Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos com o intervalo de confiança de 95 % nos delineamentos para produção das celulases, considerando-se como resposta a atividade de β -glicosidase.

4.4 Determinação das atividades enzimáticas

4.4.1 Endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada como proposto por Moretti et al., (2012), em mistura de reação contendo 25 μL do extrato enzimático e 225 μL de solução de substrato carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0). A reação foi mantida a 50 °C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 250 μL do reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados (MILLER, 1959 - adaptado), a partir da curva analítica de glicose. O controle da reação foi feito adicionando-se 250 μL do reagente DNS a 225 μL de solução de substrato e, em seguida, 25 μL do extrato enzimático. Como branco utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi utilizada a mistura de 250 μL de água destilada e 250 μL de DNS. Reação, controle e branco foram submetidos a banho de ebulição, por 5 minutos, resfriados em banho de gelo, adicionadas de 2,5 mL de água destilada, homogeneizados, e então submetidos a leitura da absorbância a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.4.2 Exoglucanase

A atividade de exoglucanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito no item 4.4.1, porém utilizando-se Avicel Merck K28615431 (10,0 g/L) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.4.3 β -glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidase de acordo com Leite et al., (2008), 50 μL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250 μL de solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0) e 250 μL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo 4 mmol/L - PNPG, Sigma). A reação foi mantida a 50 °C, por 10

minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 (2mol/L). O nitrofenol liberado foi quantificado, a partir da curva analítica de p-nitrofenol (Sigma), por espectrofotometria a 410 nm. O controle da reação foi preparado com as mesmas quantidades de reagentes, porém com a adição da solução de Na_2CO_3 antes do extrato enzimático. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi preparado com 250 μL de solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0), 250 μL de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L) – PNPG, Sigma), 50 μL de água destilada e 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 (2 mol/L). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro, a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto, sob as condições de reação.

4.4.4. FPase

A atividade de celulases totais em papel de filtro (FPase) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Ghose (1987) em mistura de reação composta por 1000 μL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, utilizando-se uma fita de papel de filtro Whatman nº1 (6 cm x 1 cm) como substrato e 500 μL de extrato enzimático. Após incubação a 50 °C, por 1 hora, 3,0 mL de DNS foram adicionados ao tubo de reação, o qual foi levado a fervura por 5 minutos, seguido de banho de gelo. A quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pelo método DNS (MILLER, 1959), a partir da curva analítica de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto de reação, sob as condições de ensaio citadas.

4.5. Caracterização físico-química de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato do cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01

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

O estudo do efeito do pH e da temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase foi realizado através de um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4

pontos centrais. As variáveis e seus níveis codificados e reais são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores codificados e reais das variáveis do planejamento fatorial fracionado do tipo face centrada 2^2 empregado para estudo do efeito do pH e temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase do extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2 contendo palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos cedida pela GranBio (3% m/v), e farelo de soja (3% m/v), a 28 °C, 254 rpm, por 144 horas, com 6 discos de inóculo.

| Variável | Níveis | | | Unidade |
|-------------|--------|-----|-----|---------|
| | -1 | 0 | +1 | |
| pH | 3,5 | 5,5 | 7,5 | - |
| Temperatura | 50 | 60 | 70 | °C |

Fonte: Elaborado pelo autor.

As soluções tampão utilizadas para os valores de pH de 3,5, 5,5 e 7,5 foram, respectivamente, McIlvaine, MES hydrate Sigma-Aldrich M8250 e tampão MOPS Sigma-Aldrich M1254. Após a determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade das enzimas, foi realizada a validação experimental, em triplicata. A média dos resultados obtidos na validação foi definida como 100 % de atividade, para os cálculos de atividade relativa nos experimentos subseqüentes de avaliação da estabilidade à variações de pH e temperatura, bem como do efeito de glicose e etanol sobre a atividade enzimática.

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

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, a solução enzimática foi incubada, por 24 h, a 24 °C, em soluções tampão de pH 3,5 a 10,5 e, após este período, a atividade residual foi determinada sob as condições ótimas, definidas nos experimentos descritos no item 4.5.1. As soluções tampão utilizadas foram: McIlvaine (fosfato de sódio 0,2 mol/L; ácido cítrico 0,1 mol/L) para a faixa de pH 3,5-5,0, MES hydrate (Sigma-Aldrich M8250) para a faixa de pH 5,5-6,5, MOPS (Sigma-Aldrich M1254) para a faixa de pH 7,0-7,5, TAPS (Sigma-Aldrich T5130) para a faixa de pH 8,0-9,0 e CAPS (Sigma-Aldrich C2632) para a faixa de pH 9,5-10,5. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se a solução enzimática por 1h, a

temperaturas entre 30 e 80 °C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas de atividade.

4.5.3. Efeito da glicose e do etanol sobre a atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi quantificada, como descrito no item 4.4.3, sob as condições ótimas (pH 5,5 a 60 °C) na presença de glicose (2 a 12 mmol/L) e etanol (5,0 a 20,0 %) a fim de se avaliar o efeito dos mesmos sobre a atividade (adaptado de LEITE et al. 2008 e PEREIRA et al. 2016).

4.6 Pré-Tratamentos da palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar fornecida pela empresa Granbio foi pré-tratada hidrotêrmicamente pela própria empresa. Já a palha *in natura*, fornecida pela usina Santa Cruz – Grupo São Martinho, localizada no município de Américo Brasiliense – SP, após moagem em moinho de facas e secagem ao sol, foi submetida aos pré-tratamentos hidrotêrmicos citados abaixo.

4.6.1 Pré-tratamento hidrotêrmico alcalino

O pré-tratamento foi realizado em autoclave, segundo metodologia descrita por Zhuang et al., (2009). A palha de cana-de-açúcar previamente seca e moída foi levada a autoclave (5% p/v em solução de NaOH 0,5 mol/L) em frascos Erlenmeyer de 500 mL vedados com papel alumínio, sob temperatura de 120 °C, durante 1 hora, a 1 atm. Após este procedimento, os frascos foram levados a banho em água gelada e, posteriormente, mantidos sob temperatura de 25 °C para a estabilização. A fase sólida foi lavada em água de torneira até que o pH da água de lavagem estivesse próximo a neutralidade e, em seguida, o material foi lavado com água destilada, filtrado retirando-se todo o excesso de água e a fase sólida foi armazenada a 4 °C para posterior utilização nos experimentos de sacarificação.

4.6.2 Pré-tratamento hidrotérmico ácido e hidrotérmico ácido seguido de hidrotérmico alcalino

A palha de cana-de-açúcar previamente seca e moída foi levada a autoclave utilizando-se frascos Erlenmeyers com capacidades volumétricas de 1000 mL e 500 mL. A hidrólise foi realizada empregando-se 2 % (p/v) de ácido sulfúrico para uma relação sólido líquido de 1:10, temperatura de 121 °C, por 71 minutos (TÉLLEZ-LUIS et al., 2002). A celulignina, sólido resultante dessa etapa, foi lavada com água de torneira para remoção do ácido residual até que a água de lavagem estivesse com pH próximo à neutralidade. Uma parte deste material foi armazenado a 4°C para posterior utilização nos experimentos de sacarificação. O restante da celulignina foi submetido ao processo de deslignificação (pré-tratamento alcalino). Para isso, o material foi seco ao sol até umidade em torno de 10% e levado a autoclave utilizando-se frascos Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, com uma relação sólido-líquido de 1:20, a uma temperatura de 110 °C (DUSSÁN et al., 2014), nas condições de 2,17 % (p/v) de concentração de NaOH e um tempo de reação de 100 min a uma temperatura de 110 °C (MELLO et.al., 2017). A fração sólida obtida (celulose) foi lavada com água destilada até pH neutro, para remoção da lignina extraída. Após este procedimento, a fração celulósica foi armazenada a 4°C para posterior utilização nos experimentos de hidrólise.

4.7 Sacarificação Enzimática das palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas

As palhas pré-tratadas foram empregadas em experimento de sacarificação enzimática, utilizando-se o extrato selecionado, produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01, em meio de cultivo contendo palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos, cedida pela GranBio (3% m/v) e farelo de soja (3% m/v), a 28 °C, 254 rpm, por 144 horas, com 6 discos de inóculo.

Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL, fechados hermeticamente com rolhas de látex. O volume final dos ensaios foi de 25 mL, sendo 20 mL de extrato e 5 mL de solução tampão citrato de sódio, pH 5,0, na concentração de 0,05 mol/L. A carga de palha empregada foi de 5% p/v. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 250 rpm, sob 50 °C, por 24 horas. Em todos os frascos foi adicionado o antibiótico Cloranfenicol na concentração final de 0,1

mg/mL, a fim de se evitar contaminações. Após o tempo de sacarificação, o material foi resfriado em banho de gelo, filtrado a vácuo, a fase líquida foi filtrada utilizando-se membranas de 0,22 μm e utilizada para a quantificação dos açúcares liberados, por CLAE. O rendimento foi expresso em miligramas de glicose e de xilose por mililitro de líquido resultante da sacarificação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos iniciais cujos resultados são apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de selecionar as variáveis (substrato, tempo e agitação) para a elaboração de um delineamento composto central rotacional (DCCR), visando obter as melhores condições de cultivo para a produção das celulasas, tanto em cultivos isolados quanto em co-cultivo dos fungos de trabalho. Além destes, são apresentados também, os resultados referentes à caracterização físico-química das enzimas endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato selecionado a partir dos planejamentos experimentais como o mais viável a ser produzido e, ainda, os resultados relativos à aplicação deste extrato na sacarificação de palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas.

5.1. Caracterização química dos substratos lignocelulósicos empregados na produção de celulasas

É relatado na literatura que a indução da produção de celulasas pelos microrganismos é diretamente influenciada pelo substrato fornecido a eles, portanto diferentes materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados visando aumentar a produção enzimática.

Os substratos lignocelulósicos empregados na composição dos meios 1 (palha de cana pré-tratada), 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja) e 3 (farelo de trigo + farelo de soja), são resíduos de culturas agrícolas, de natureza lignocelulósica, e, como tais, podem apresentar diferentes composições químicas, dependendo não só da variedade, mas também da localização geográfica, da idade de colheita e das condições em que foram cultivadas e armazenadas após a colheita. De modo geral, a composição química de materiais vegetais pode ser subdividida em substâncias de menor peso molecular orgânicas (extrativos) e

inorgânicas (cinzas), além de substâncias macromoleculares como celulose, hemicelulose e lignina. Realizou-se então a caracterização química dos lotes de materiais lignocelulósicos utilizados como substratos para os cultivos por fermentação submersa no presente trabalho (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana), lignina e outros componentes da palha de cana pré-tratada hidrotermicamente sem adição de químicos fornecida pela Granbio, e dos farelos de soja e de trigo.

| Composição (%) | Palha de cana (PC) | Farelo de Soja (FS) | Farelo de Trigo (FS) |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Lignina Total* | 33,23 | 18,38 | 11,14 |
| Acetil | 0,69 | 2,48 | 0,51 |
| Celulose | 42,22 | 9,04 | 38,29 |
| Hemicelulose | 16,41 | 17,36 | 28,04 |
| Cinzas | 5,49 | 6,50 | 4,20 |
| Extrativos | - | 46,54 | 34,56 |

*Soma das porcentagens de lignina solúvel e lignina insolúvel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode-se observar, a composição dos três materiais lignocelulósicos é variável. Em termos de polissacarídeos, o material empregado para a formulação do meio de cultivo 1 (PC - 1% p/v) apresenta em média maior quantidade (58,63 %), seguido do meio 3 (FS + FT 1:1 p/p) (e do meio 2 (PC + FS 1:1 p/p) (46,36 e 42,51 %, respectivamente). Em termos de lignina, o meio 1 apresenta em média 33,23%, seguido do meio 2 com 20,3%, e do meio 3 com 14,76%. Os farelos de soja e trigo possuem grande parte da sua composição definida como extrativos, que podem incluir proteínas, lipídeos, compostos aromáticos, entre outros. Os três substratos apresentam cinzas em sua composição, que podem conter íons atuantes como cofatores enzimáticos, como Ca, K e Mg (KLOCK e ANDRADE, 2005). Tais informações permitem inferir uma relação entre os componentes dos substratos e a produção das enzimas a partir dos diferentes meios, uma vez que fornecem a composição em termos de polissacarídeos e lignina. Cabe ressaltar que, a lignina, mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, confere uma limitação para a assimilação das fontes de carbono pelo microrganismo (FARINAS et al., 2008).

Um estudo realizado sobre a produção de celulasas por *Streptomyces* sp. avaliou a influência dos farelos de trigo, milho e arroz, como fonte de carbono em

fermentação submersa, sobre a produção das enzimas. As melhores atividades enzimáticas foram apresentadas para os extratos obtidos dos ensaios em farelo de trigo (VILELA, 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido amplamente empregado em estudos de produção de celulases fúngicas, mas a palha da cana também vem sendo pesquisada quanto à sua utilização como substrato destes processos fermentativos. Barros e colaboradores (2014) compararam a produção de celulases por um fungo filamentosos (isolado do solo de descanso de plantio de cana de açúcar, ainda não identificado quanto ao gênero), denominado pelos pesquisadores como *FSDE3*, a partir dos meios de cultivo, sendo um composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, e o outro composto de palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo, ambos *in natura*. O fungo não se desenvolveu no meio contendo bagaço, e se desenvolveu bem no meio contendo palha, produzindo endoglucanases. Oliveira et al. (2016) também empregaram a palha de cana em meio de cultivo composto com milhocina, para produção de endoglucanases pelo fungo *Penicillium* sp. 17-05. O fungo *Trichoderma reesei* foi submetido a crescimento em meio combinado de palha e bagaço de cana, e mostrou-se eficiente na produção de celulases totais e endoglucanases (POMPEU, 2010).

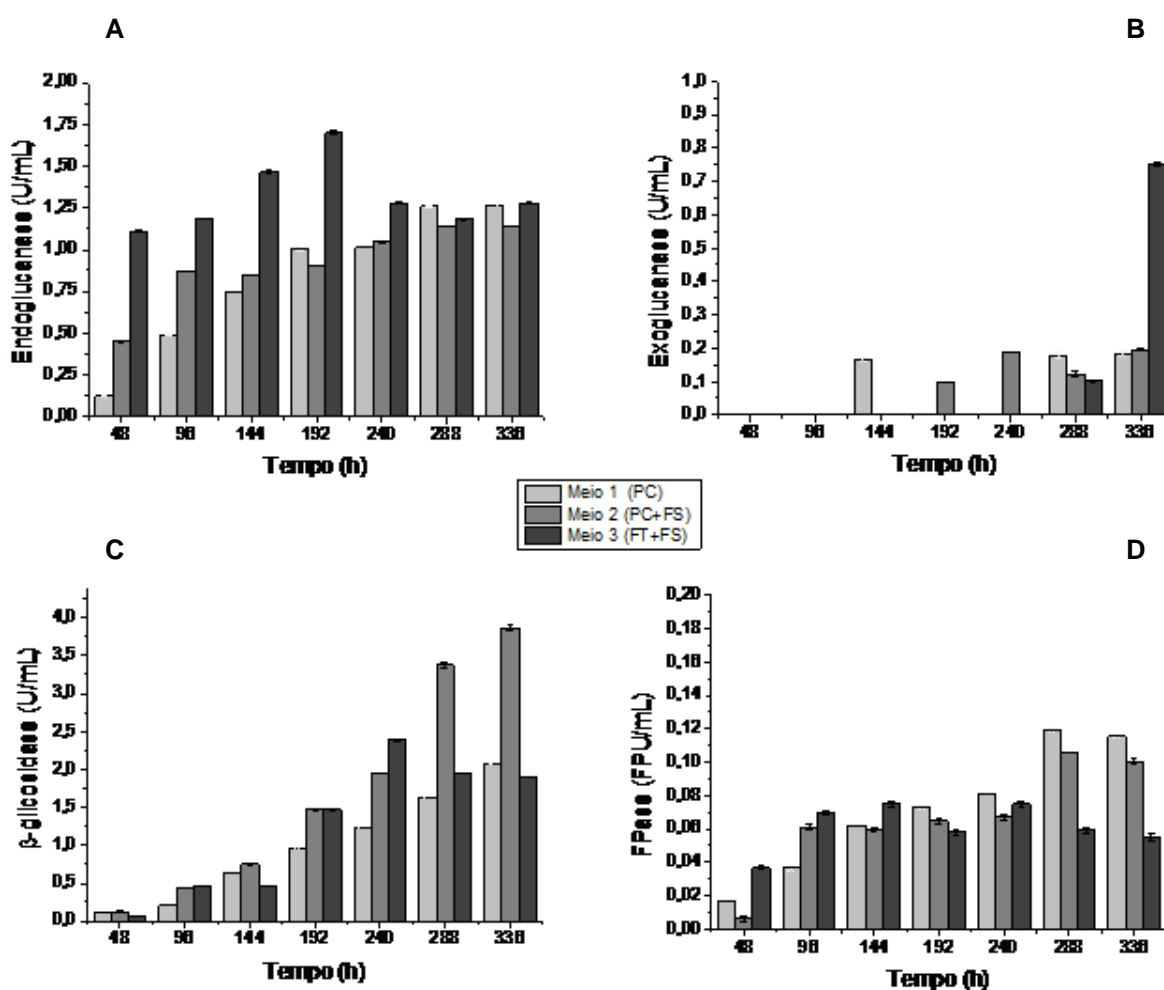
O farelo de soja foi avaliado como uma boa fonte de carbono para produção de β -glicosidases pelo fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium* DR47 (LUCA, 2018). O fungo *Aspergillus niger* foi submetido a crescimento em cinco meios de cultivo cujas fontes de carbono de cada um foram farelo de soja, bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de trigo. Neste estudo, as produções de celulases totais, endoglucanases e β -glicosidases foram destacadas para os meios compostos por farelo de soja e farelo de trigo, respectivamente. (FARINAS et al., 2008).

No presente trabalho, os materiais lignocelulósicos utilizados como substratos nos ensaios iniciais de produção de celulases também apresentaram-se como fontes de carbono adequadas para o cultivo fúngico por fermentação submersa. Este fato representa a possibilidade do reaproveitamento destes materiais, levando à redução de custos na obtenção de celulases, e à redução do problema ambiental causado acúmulo dos mesmos.

5.2. Avaliação da influência do substrato lignocelulósico, da agitação e do tempo sobre a produção das enzimas pelo co-cultivo dos fungos

Inicialmente os fungos foram co-cultivados, por fermentação submersa, em meios contendo diferentes resíduos lignocelulósicos como substratos (item 4.3.1), sem agitação, por até 336 horas (14 dias), a fim de se avaliar a influência destas condições na produção das celulases. Os resultados, em termos de atividades enzimáticas, estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* EJC04 por fermentação submersa, utilizando-se meios contendo diferentes substratos lignocelulósicos, a 28 °C, sem agitação. Meio 1: palha de cana-de-açúcar GranBio (1% m/v); Meio 2: palha de cana-de-açúcar GranBio (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v); Meio 3: farelo de trigo (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v). (A): Endoglucanase, (B): Exoglucanase, (C): β -glicosidase, (D): FPase.

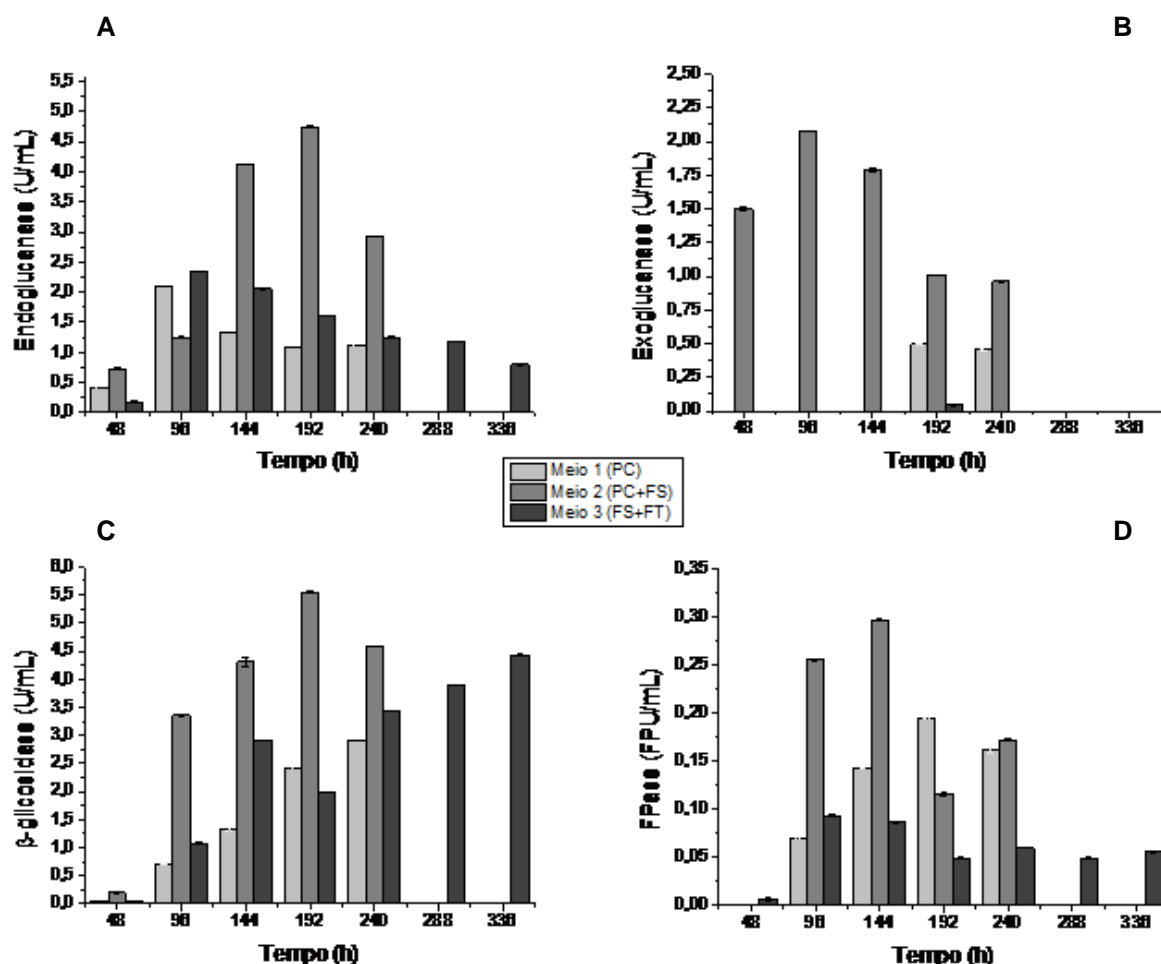


Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode-se observar, na condição não agitada, a maior atividade de endoglucanase (1,70 U/mL) foi obtida pelo co-cultivo dos fungos no meio 3 em 192 horas. Atividades desta enzima obtidas dos ensaios em meio 3 se destacaram até as primeiras 192 horas, mas atividades muito próximas entre os três meios foram obtidas a partir desse período (Figura 4A). Quanto à exoglucanase, não foi detectada atividade nas primeiras 96h de cultivo, em nenhum dos extratos obtidos de ensaios com os três meios testados. De modo geral, a atividade desta enzima foi baixa, sendo o maior valor obtido pelo cultivo no meio 3, em 336 horas (0,75 U/mL) (Figura 4B). Em relação a β -glicosidase, houve um aumento gradual nas atividades ao longo do tempo, para os ensaios com todos os meios de cultivo, sendo as máximas obtidas em 288 e 336 horas de fermentação, nos ensaios com meio 2 (3,37 U/mL e 3,86 U/mL, respectivamente). Apenas no cultivo com o meio 3 houve queda de atividade, após 240 h. (Figura 4C). As atividades de FPase foram próximas entre os três meios testados, porém os valores obtidos foram muito baixos, sendo 0,11 FPU/mL a atividade máxima observada, pelo cultivo em meio 1, em 288 horas.

Uma vez que os fungos utilizados no presente trabalho não haviam sido avaliados quanto à produção de celulases por fermentação submersa, foram realizados co-cultivos como descrito acima, porém sob agitação de 100 rpm, para fins de comparação. As atividades enzimáticas obtidas são apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* EJC04 por fermentação submersa, utilizando-se meios contendo diferentes substratos lignocelulósicos, a 28 °C, sob agitação de 100 rpm. Meio 1 - palha de cana-de-açúcar GranBio (1% m/v); Meio 2: palha de cana-de-açúcar GranBio (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v); Meio 3: farelo de trigo (0,5% m/v) e farelo de soja (0,5% m/v). (A): Endoglucanase, (B): Exoglucanase, (C): β -glicosidase, (D): FPase. *Os experimentos agitados com meios 1 e 2 foram realizados por 240 horas (10 dias).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela análise dos dados apresentados, é possível observar que as atividades de todas as enzimas foram maiores nos cultivos agitados, quando comparadas com os cultivos estáticos. Esse destaque se deu provavelmente devido aos efeitos benéficos conhecidos da agitação, como a homogeneização do substrato durante todo o tempo de fermentação e a promoção do crescimento fúngico em suas partículas individuais, além de propiciar melhor aeração (LOSANE et al., 1985).

A atividade máxima de endoglucanase (4,75 U/mL, cerca de 2,8 vezes superior à máxima obtida nos cultivos estáticos) foi obtida pelo cultivo no meio 2, em 192 horas (Figura 5A). Não foi detectada atividade de exoglucanase em extratos

obtidos de cultivos em meio 1 e 3, até as 144 horas de fermentação. Em contrapartida houve um destaque em relação ao cultivo no meio 2, onde a atividade máxima (2,08 U/mL, aproximadamente 2,7 vezes superior à máxima obtida nos cultivos sem agitação) foi atingida em 96 horas (Figura 5B). O meio 2 mostrou-se mais eficiente também para a produção de β -glicosidase, sendo a atividade máxima (5,55 U/mL) obtida em 192 horas (Figura 5C). De modo geral, as atividades de FPase foram maiores nos cultivos em meio 2, sendo a máxima de 0,30 FPU/mL em 144 horas) (Figura 5D).

De modo geral, pode-se observar que extratos obtidos dos ensaios com os meios 2 e 3, na condição de cultivo agitado, apresentaram maiores atividades de endoglucanases e β -glicosidases (Figura 5A e 5C), e que os extratos obtidos dos ensaios agitados com meio 2 apresentaram maiores atividades de todas as enzimas (Figura 5). Isso indica que as combinações de palha de cana com farelo de soja, e de farelo de soja com farelo de trigo foram as fontes de carbono que melhor induziram a produção destas enzimas pelos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04. O meio de cultivo 1, embora apresente maior porcentagem de polissacarídeos, apresenta também maior porcentagem de lignina entre os três meios, o que pode ter dificultado o desenvolvimento dos fungos e sua produção enzimática. E, em oposição, os meios 2 e 3 que apresentam quantidades pouco menores de polissacarídeos, e menores quantidades de lignina, podem ter induzido o desenvolvimento dos fungos e a produção de enzimas. Ainda, o meio 2 é o que apresenta maior porcentagem de cinzas, que podem conter elementos traços essenciais para o desenvolvimento microbiano, e que, nesse caso podem ter sido fornecidos em quantidades extra àquelas que compõem a solução nutriente dos ensaios. Além disso, segundo Machado (1999), a soja apresenta em sua composição quase todos os aminoácidos essenciais, podendo ter estimulado o desenvolvimento microbiano e a produção de enzimas.

São escassos na literatura, dados sobre produção de celulasas utilizando palha de cana, farelo de soja e farelo de trigo em cultivo submerso, dificultando a comparação de dados com os obtidos no presente trabalho. Kumar e colaboradores (2011) também realizaram triagens iniciais para seleção de melhor fonte de carbono para produção de celulasas pelo fungo *Aspergillus niger* NCIM 548, a 30 °C e 170 rpm, visando posterior otimização do processo. Em teste, utilizaram farelo de trigo, farelo de milho, farelo de arroz e casca de tangerina, empregados individualmente e

em combinação. A máxima produção de endoglucanase foi obtida do uso de farelo de trigo, farelo de milho e casca de tangerina, em combinação na proporção fixa de 2:1:2, respectivamente. Serra et al. (2015), realizaram um estudo de seleção de meio de cultivo para produção de celulasas em fermentação submersa agitada, pelo fungo *Aspergillus niger* 3T5B8 e, dentre os substratos analisados, o bagaço de cana-de-açúcar foi o que proporcionou maiores níveis de atividade. Após 120 h de cultivo, foram obtidas cerca de 0,6 U/mL de endoglucanase e 0,9 U/mL de β -glicosidase. Gomathi et al., (2012) em estudos preliminares para posterior otimização, empregaram os substratos farelo de trigo, sementes de algodão, farelo de arroz, e palha de arroz na produção de enzimas por *Aspergillus flavus*, e o farelo de trigo levou à maior produção de endoglucanase. Quando fornecido 1% deste substrato, obteve-se atividade máxima de endoglucanase de 2,8 U/mL, em 72 horas de fermentação. Castro et al. (2010) observaram a produção das enzimas do complexo celulolítico pelo fungo *Penicillium funiculosum* empregando bagaço de cana de açúcar pré-tratado quimicamente como substrato, e os resultados obtidos foram de 0,3 FPU/mL (em 182 horas) para FPase, 1,83 U/mL (em 126 horas) para endoglucanase, e 1,83 U/mL (em 276 horas) para β -glicosidase. Cunha et al. (2012) utilizaram em seu trabalho o fungo *A. niger* para a produção de endoglucanase por fermentação submersa, a 32 °C, sob agitação de 200 rpm, por 30 horas, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar. Os autores obtiveram atividade de 1,36 U/mL. Fang et al. (2010) analisaram a produção β -glicosidase e FPase pelos fungos *A. niger* e *T. reesei* por fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a palha de milho. O pico de atividade da β -glicosidase produzida pelo fungo *A. niger* (1,4 U/mL) foi observado em 7 dias de cultivo. Já para *T. reesei*, a atividade máxima (0,3 U/mL) foi obtida em 6 dias de cultivo. Em relação à FPase, as maiores atividades foram observadas em 2 (0,25 U/mL) e 5 dias (2,5 U/mL) de cultivo para *A. niger* e *T. reesei*, respectivamente. Estes dados indicam que os fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 apresentaram boas produções de celulasas, e que os meios de cultivo empregados neste trabalho são bons indutores de produção das mesmas.

Tanyildizi e colaboradores (2005) afirmam que a otimização de vários parâmetros e a manipulação do meio são as técnicas mais importantes usadas para a produção de enzimas em grandes quantidades para atender a demanda das indústrias, e foi justamente o conhecimento de alguns dos parâmetros essenciais

que se buscou nessa triagem. Pela análise dos dados obtidos, foi possível selecionar a condição de cultivo sob agitação, utilizando-se o meio 2 como o mais favorável para a produção das enzimas. Em relação ao tempo de cultivo, a fim de se definir o mais adequado para os experimentos subsequentes, as atividades obtidas entre 86 e 192 horas foram comparadas (Tabela 6), optando-se pela seleção de 144 horas como o melhor tempo. Tal escolha se deu especialmente pelo aumento de cerca de 3,3 vezes na atividade de endoglucanase, quando comparado ao valor obtido em 96 horas. Além disso, a atividade de β -glicosidase também aumentou nesse período e a atividade de exoglucanase, embora tenha diminuído, manteve-se próxima da obtida em 96 horas. Embora as atividades de endoglucanase e β -glicosidase tenham aumentado em 192 horas, considerou-se que este aumento, biologicamente, não apresenta grande significância. Além disso, observou-se uma diminuição da atividade de exoglucanase em 192 horas. Desta forma, este foi o tempo fixado para a produção das enzimas pelo co-cultivo dos fungos, nos experimentos subsequentes, onde foram empregados delineamentos experimentais como alternativa para obtenção de maiores atividades, sem a avaliação da variável tempo de cultivo.

Tabela 6 - Atividades de celulases obtidas entre 96 e 192 horas, pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (farelo de soja + palha de cana de açúcar), sob agitação de 100 rpm e 28 °C. Endo: endoglucanase; Beta: β -glicosidase; Exo: exoglucanase.

| Tempo (h) | Enzimas | | | |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Endo* | Beta* | Exo* | FPase* |
| 96 | 1,25 ± 0,04 | 3,35 ± 0,14 | 2,08 ± 0,12 | 0,25 ± 0,02 |
| 144 | 4,13 ± 0,06 | 4,31 ± 0,08 | 1,79 ± 0,08 | 0,30 ± 0,01 |
| 192 | 4,75 ± 0,05 | 5,55 ± 0,13 | 1,01 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 |

*Endo: Endoglucanase (U/mL); Beta: β -glicosidase (U/mL); Exo: Exoglucanase (U/mL); FPase (FPU/mL).

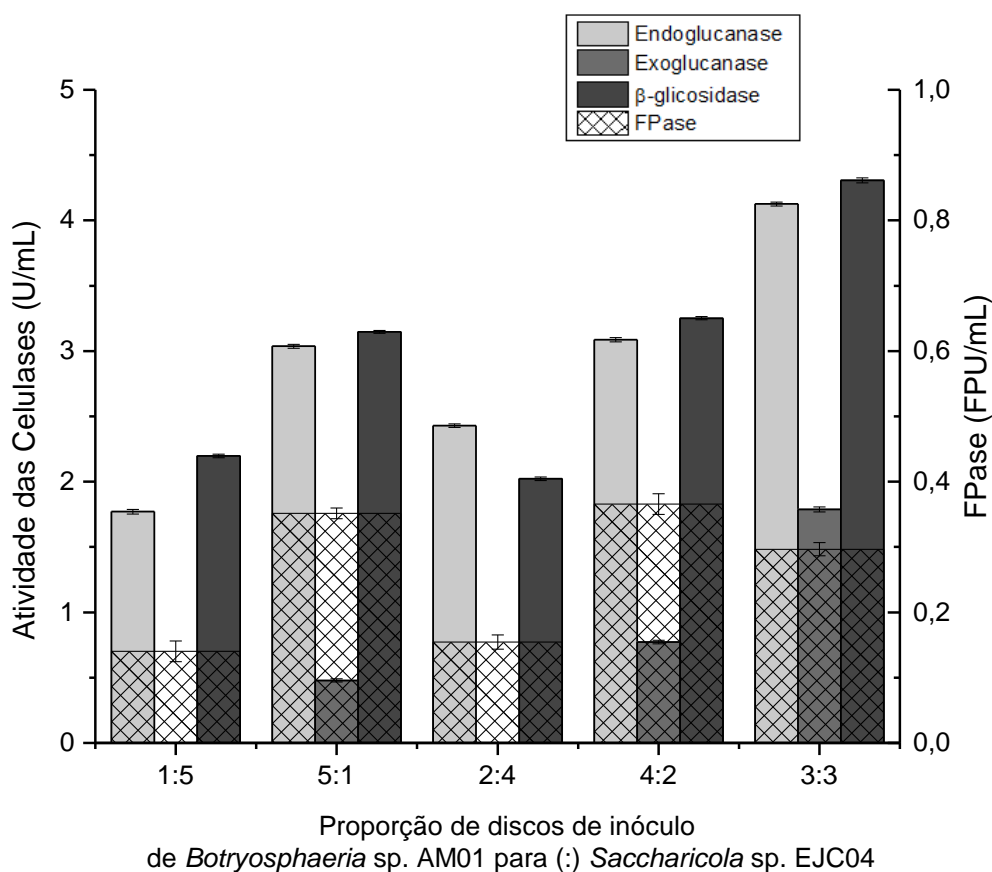
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3. Avaliação da influência da proporção do inóculo na produção das enzimas

Botryosphaeria sp AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC 04 foram co-cultivados utilizando-se o meio 2, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, variando-se

a proporção entre o número de discos de inóculo de cada fungo, e as atividades de celulases foram determinadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC 04 no meio 2, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, variando-se a proporção entre o número de discos de inóculo de cada fungo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando-se os dados obtidos em EXP 01 (1:5) e EXP 02 (5:1), observa-se que o aumento na quantidade de inóculo de *Botryosphaeria* sp. AM 01 favoreceu as atividades de endoglucanase, β-glicosidase, exoglucanase e FPase. Observa-se o mesmo quando se compara as atividades obtidas em EXP 03 (2:4) e EXP 04 (4:2). Porém, tais atividades não são superiores às obtidas em EXP 05 (3:3). Desta forma, a proporção de inóculo de 3 discos de cada fungo foi selecionada para os co-cultivos subsequentes.

5.4 Avaliação da influência do melaço de soja e do uso dos substratos lignocelulósicos triturados sobre a produção das celulases

A busca pelo material lignocelulósico mais adequado para utilização como substrato para crescimento fúngico e como indutor da produção de enzimas, incluindo celulases se baseia no baixo custo, na disponibilidade em abundância, em boas propriedades reológicas (baixa viscosidade), na não-toxicidade ou no elevado teor de nutrientes disponíveis para o microrganismo (ELLILA et al., 2017). Ainda que a proposta inicial do presente trabalho já encaixe-se em tais requisitos, optou-se por testar também a substituição da solução nutriente e da solução de sais por um resíduo agroindustrial, o melaço de soja, visando minimizar ainda mais os custos da produção das celulases, uma vez que este resíduo contém, além de açúcares, outros nutrientes importantes para o metabolismo microbiano.

Os co-cultivos foram realizados utilizando-se o meio 2 (com substratos lignocelulósicos triturados ou não triturados), 3 discos miceliais de cada fungo como inóculo, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, substituindo-se a solução nutriente e a solução de sais por melaço diluído 10 ou 30 vezes. A Tabela 7 apresenta as concentrações dos componentes do melaço sem diluir e nas diluições utilizadas, bem como as concentrações dos componentes da solução nutriente e da solução de sais (solução nutriente padrão) utilizadas neste trabalho. Os componentes destacados em negrito são os que estão presentes tanto na solução nutriente padrão, quanto no melaço de soja.

Tabela 7 - Comparação de valores dos componentes do melaço de soja puro e diluído, e das quantidades utilizadas na solução nutriente padrão.

| Componentes | Quantidade de componentes (g/L) | | | |
|-----------------|---------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|
| | Solução Nutriente padrão | Melaço puro | Melaço diluído 10x | Melaço diluído 30x |
| Glicose | 1,0 | 9,4 | 0,9 | 0,31 |
| Frutose | n/c* | 10,1 | 1,0 | 0,34 |
| Galactose | n/c | 4,93 | 0,5 | 0,16 |
| Sacarose | n/c | 76,2 | 7,6 | 2,54 |
| Rafinose | n/c | 26,19 | 2,6 | 0,87 |
| Estaquiose | n/c | 80,6 | 8,1 | 2,69 |
| Açúcar total | 1,0 | 207,42 | 20,7 | 6,91 |
| Potássio | 2 | 22,11 | 2,21 | 0,73 |
| Fósforo | 2 | 0,6 | 0,06 | 0,02 |
| Magnésio | 0,3 | 3,02 | 0,30 | 0,1 |
| Cálcio | 0,1 | 0,24 | 0,0245 | 0,0082 |
| Manganês | 0,0016 | n/c | n/c | n/c |
| Zinco | 0,0014 | 0,049 | 0,0049 | 0,0016 |
| Cobalto | 0,002 | n/c | n/c | n/c |
| Ferro | 0,005 | n/c | n/c | n/c |

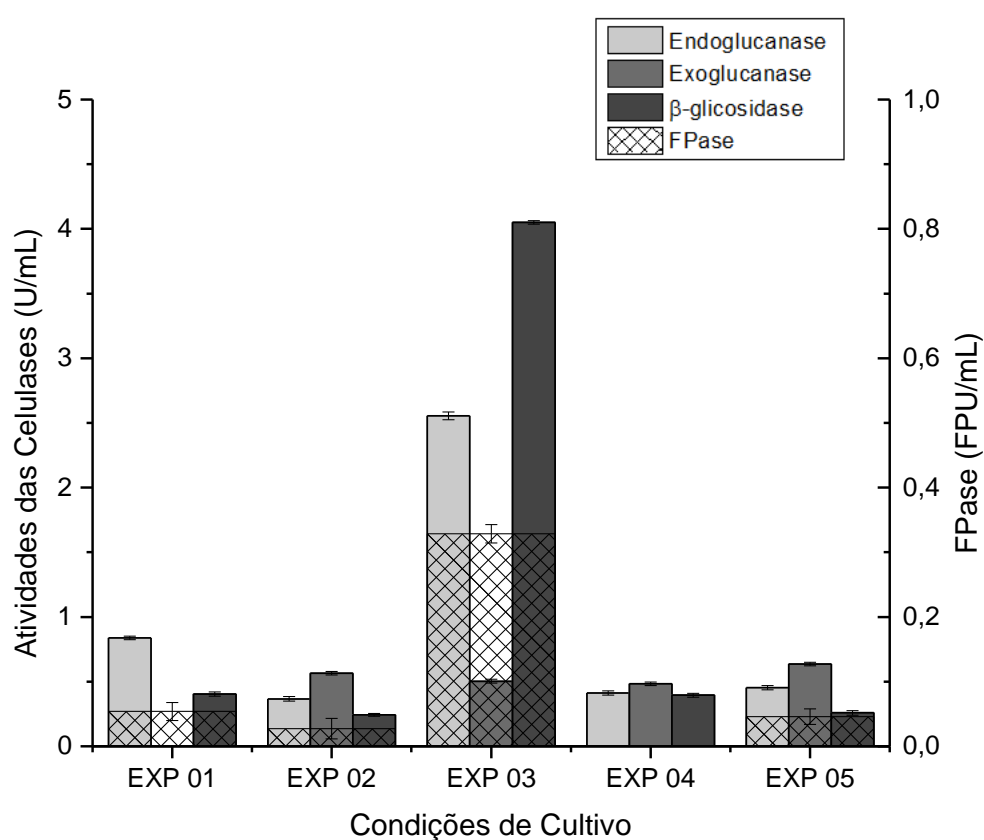
n/p*: Não contém.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A diluição de melaço 10x foi selecionada porque, embora a quantidade da soma de todos os açúcares seja muito maior (20,7 g/L) do que a utilizada na solução nutriente padrão (em termos de glicose), e as chances de inibição da produção enzimática sejam prevaletentes, nesta condição apenas fósforo e cálcio ficam em concentrações abaixo daqueles presentes na solução nutriente padrão, mas com zinco acima e magnésio, e potássio praticamente em iguais concentrações. A diluição do melaço em 30x, foi escolhida devido à diminuição na concentração de açúcares (6,91 g/L), embora ainda esteja acima da quantidade de glicose presente na solução nutriente padrão, mesmo que nessa condição estejam presentes quantidades bem menores dos sais, onde apenas o zinco apresenta maior quantidade. Assim, testou-se uma condição com maior quantidade de açúcares que manteve a disponibilidade de alguns sais em quantidades parecidas com a empregada normalmente; e uma condição onde o nível de açúcares é menor, mas ainda que baixa, manteve a disponibilidade de alguns sais.

A influência da trituração e peneiragem em malha de 1 mm dos substratos lignocelulósicos também foi avaliada. Os resultados destes experimentos são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM 01 e *Saccharicola* sp. EJC 04 no meio 2, por 144 horas, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, 3 discos miceliais de cada fungo como inóculo, utilizando-se os substratos lignocelulósicos triturados ou não. EXP 01: melão diluído 10x + substrato não triturado; EXP 02: melão diluído 30x + substrato não triturado; EXP 03: solução nutriente + solução de sais + substratos triturados; EXP 04: melão diluído 10x + substrato triturado; EXP 05: melão diluído 30x + substrato triturado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em primeira instância, nota-se que as atividades máximas de endoglucanase (2,56 U/mL), β-glicosidase (4,05 U/mL) e FPase (0,33 FPU/mL) foram obtidas pelo cultivo nas condições do experimento 3. Para exoglucanase, a variação da atividade foi pequena entre os cultivos realizados sob as condições dos experimentos 2 e 5. A atividade máxima desta enzima (0,64U/mL) foi obtida no experimento 5, enquanto o

extrato obtido pelo cultivo sob as condições do experimento 1 não apresentou atividade desta celulase (Figura 7).

Tendo em vista que no experimento 3 utiliza-se a solução nutriente padrão, conclui-se que o melão, nas diluições empregadas, não foi um bom substituinte para esta solução. A produção de celulases pode ter sido reprimida pelas maiores concentrações de glicose ou dissacarídeos componentes do melão. Este fenômeno é chamado de repressão catabólica e ocorre devido à formação de uma cascata de sinais no interior da célula, iniciada pela presença da molécula sinal (glicose), causando a ativação da molécula repressora. Esta molécula se liga à região promotora dos genes de celulase, bloqueando a transcrição e expressão destes genes (SANCHEZ, 2009). A repressão catabólica, então pode ter impedido os fungos de sintetizarem uma quantidade maior de celulases, devido às circunstâncias de abundância de fonte de carbono facilmente assimilável.

Ellilä e colaboradores (2017) também realizaram um estudo visando diminuir os custos da produção de celulases fúngicas, em processo de batelada alimentada. Porém, utilizaram uma linhagem mutante do fungo *Trichoderma reesei*, e, além disso, empregaram casca de soja e sulfato de amônio como fontes iniciais de carbono e nitrogênio, respectivamente, utilizando o melão de cana-de-açúcar para alimentar o processo. Para proporcionar melhor resultado adicionaram ácido clorídrico, que realiza a função das invertases que não são sintetizadas pelo *T. reesei*, para inverter a sacarose do melão antes do seu uso. Compararam as atividades enzimáticas obtidas deste processo, com as atividades enzimáticas obtidas em cultivo da linhagem original em cultivo com apenas em palha de cana. Após 120 horas de fermentação, observaram que a atividade de β -glicosidases produzidas foi 400 vezes maior quando produzidas pela linhagem mutante em processo alimentado com o melão. Porém, cabe ressaltar que a linhagem original não produziu nenhuma enzima a partir do melão. A maioria dos estudos empregando melão na produção de celulases, o utiliza como fonte de carbono, e não como fonte de outros nutrientes como no presente estudo, dificultando a comparação dos resultados aqui obtidos com outros da literatura (SILVA, 2014; GORI e MALANA, 2010; BAE e SHODA, 2004).

Em relação ao cultivo sob as condições do experimento 3 (solução nutriente + solução de sais, com substratos triturados), o resultado foi comparado com aquele obtido pelo cultivo em mesmas condições de agitação, carga de inóculo e de

substrato, quando este não foi triturado (item 5.2, figura 5). Quando utilizaram-se substratos não triturados, as atividades enzimáticas máximas foram 4,13 U/mL para endoglucanase, 1,79 U/mL para exoglucanase, 0,30 FPU/mL para FPase e 4,31 U/mL para β -glicosidase. A atividade máxima de exoglucanase obtida pelo cultivo sob as condições do experimento 3 (0,50 U/mL) foi menor quando comparada com a máxima obtida pelo cultivo utilizando-se substratos não triturados. Já as atividades de FPase e β -glicosidase foram praticamente iguais, e a atividade endoglucanase foi significativamente maior utilizando-se substratos não triturados. Desta forma, optou-se por não utilizar a palha de cana e o farelo de soja triturados nos próximos experimentos, o que também representa economia no processo.

Pereira (2014), com o objetivo de analisar a produção de celulases pelos isolados MD 01, MD 03, MD 04 e MD 08 de *Aspergillus niger*, cultivou-os por fermentação submersa em meio contendo 1% farelo de trigo triturado e peneirado em malha de 0,84 mm como indutor da produção de enzimas celulolíticas. As culturas foram mantidas por 7 dias a 40°C em agitação a 170 rpm. As atividades de exoglucanase, β -glicosidase e FPase também foram inferiores a 1 U/mL, comparáveis às obtidas no presente trabalho. Zimbardi (2014), afirma que o tamanho e a porosidade de farelos lignocelulósicos são interessantes para a fixação dos microrganismos e excreção de enzimas, podendo justificar os menores resultados obtidos quando utilizou-se os substratos triturados.

5.5 Seleção das melhores condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos

Buscando-se a otimização das condições de cultivo e consequente obtenção de maiores atividades enzimáticas, os fungos foram cultivados isoladamente e em co-cultivo no meio 2, por 144 horas, a 28 °C, variando-se a carga de substrato, a carga de inóculo e a velocidade de agitação. Os experimentos foram realizados empregando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), como descrito no item 4.3.4.

5.5.1 Co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04

A primeira execução do planejamento experimental foi realizada na condição de co-cultivo das espécies de trabalho, já que todas as triagens foram realizadas

nessa condição. Além disso, nos experimentos onde se avaliou a influência da proporção de inóculo, as maiores atividades enzimáticas foram observadas no extrato obtido a partir do ensaio que empregou carga de inóculo equivalente dos dois fungos (item 5.3), sugerindo que o co-cultivo poderia ser melhor que os cultivos isolados. A Tabela 8 apresenta as variáveis estudadas, bem como seus níveis codificados e reais, além das respostas obtidas, em termos de atividades de endoglucanase e β -glicosidase.

Tabela 8 - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C.

| Ensaio | Variáveis | | | Respostas | |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------------|-----------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Endoglucanase (U/mL) | β -glicosidase (U/mL) |
| 1 | -1 (2) | 1 (4) | -1 (120) | 4,18 | 8,19 |
| 2 | 1 (5) | -1 (4) | -1 (120) | 3,34 | 3,6 |
| 3 | -1 (2) | 1 (8) | -1 (120) | 4,05 | 8,76 |
| 4 | 1 (5) | -1 (8) | -1 (120) | 2,71 | 4,04 |
| 5 | -1 (2) | 1 (4) | 1 (220) | 3,19 | 8,64 |
| 6 | 1 (5) | -1 (4) | 1 (220) | 3,97 | 16,28 |
| 7 | -1 (2) | 1 (8) | 1 (220) | 3,12 | 9,13 |
| 8 | 1 (5) | -1 (8) | 1 (220) | 2,97 | 15,47 |
| 9 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,46 | 12,29 |
| 10 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,66 | 12,97 |
| 11 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,33 | 12,3 |
| 12 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,68 | 11,97 |
| 13 | -1,68 (1) | 0 (6) | 0 (170) | 3,86 | 3,86 |
| 14 | 1,68 (6) | 0 (6) | 0 (170) | 4,92 | 9,39 |
| 15 | 0 (3,5) | -1,68 (3) | 0 (170) | 3,61 | 13,59 |
| 16 | 0 (3,5) | 1,68 (9) | 0 (170) | 4,86 | 12,01 |
| 17 | 0 (3,5) | 0 (6) | -1,68 (86) | 0,94 | 0,6 |
| 18 | 0 (3,5) | 0 (6) | 1,68 (254) | 3,6 | 13,12 |

X₁ - substrato (% m/v); X₂ - inóculo (discos); X₃ - agitação (rpm)

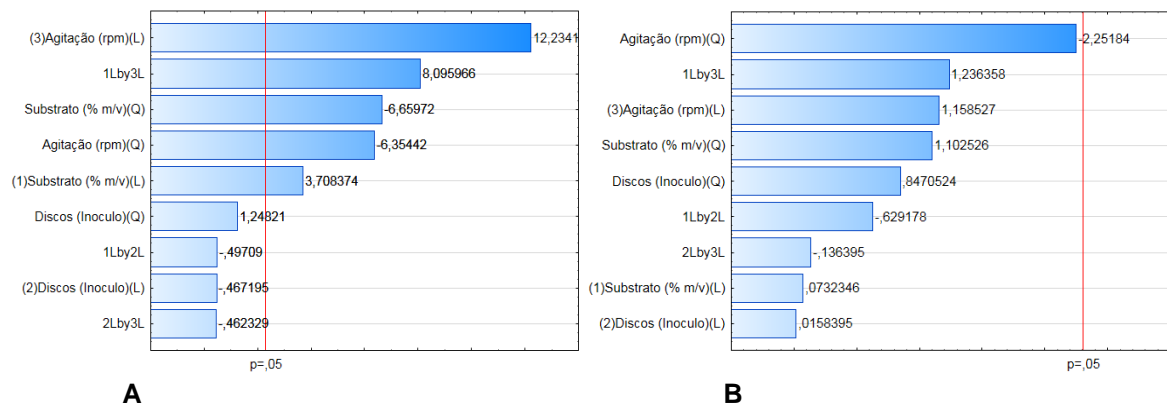
Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode-se observar, as atividades de endoglucanase e β -glicosidase variaram de 0,94 a 4,92 U/mL e de 0,60 a 16,28 U/mL, respectivamente. A condição

de cultivo que proporcionou a maior atividade de endoglucanase (ensaio 14) não foi a mesma que proporcionou a maior atividade de β -glicosidase (ensaio 6).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre as atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 8) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada nas Tabelas 9 e 10.

Figura 8 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela análise da variância (ANOVA) pode-se observar que o valor do coeficiente de determinação (R^2) para a atividade de β -glicosidase foi de 0,97, indicando que os experimentos se ajustam em 97 % ao modelo proposto. Para esta enzima, os efeitos lineares e quadráticos das variáveis carga de substrato e agitação foram significativos ($p < 0,05$), bem como a interação entre elas (Tabela 8). Já para a atividade de endoglucanase, o valor de R^2 foi 0,60, indicando falta de ajuste aos dados experimentais, ou seja, os erros experimentais foram maiores que os tolerados, tornando o modelo não confiável. Ainda em relação à endoglucanase, nenhuma variável nem suas interações apresentaram efeito significativo (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| β-glicosidase | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 14,2259 | 1 | 14,2259 | 13,7520 | 0,005970 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 45,8800 | 1 | 45,8800 | 44,3519 | 0,000159 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,2258 | 1 | 0,2258 | 0,2183 | 0,652821 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 1,6117 | 1 | 1,6117 | 1,5580 | 0,247247 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 154,8321 | 1 | 154,8321 | 149,6750 | 0,000002 |
| Agitação (rpm)(Q) | 41,7699 | 1 | 41,7699 | 40,3786 | 0,000220 |
| 1L by 2L | 0,2556 | 1 | 0,2556 | 0,2471 | 0,632497 |
| 1L by 3L | 67,8030 | 1 | 67,8030 | 65,5447 | 0,000040 |
| 2L by 3L | 0,2211 | 1 | 0,2211 | 0,2137 | 0,656160 |
| Erro | 8,2756 | 8 | 1,0345 | | |
| Total | 328,7933 | 17 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| Endoglucanase | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|----------|
| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 0,00346 | 1 | 0,003463 | 0,005363 | 0,943417 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 0,78490 | 1 | 0,784897 | 1,215565 | 0,302292 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,00016 | 1 | 0,000162 | 0,000251 | 0,987750 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 0,46329 | 1 | 0,463292 | 0,717498 | 0,421581 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 0,86666 | 1 | 0,866656 | 1,342184 | 0,280061 |
| Agitação (rpm)(Q) | 3,27423 | 1 | 3,274230 | 5,070779 | 0,054411 |
| 1L by 2L | 0,25561 | 1 | 0,255613 | 0,395865 | 0,546774 |
| 1L by 3L | 0,98701 | 1 | 0,987012 | 1,528580 | 0,251391 |
| 2L by 3L | 0,01201 | 1 | 0,012013 | 0,018604 | 0,894879 |
| Erro | 5,16564 | 8 | 0,645705 | | |
| Total | 12,80545 | 17 | | | |

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da resposta atividade de β -glicosidase (Y) foi possível modelar uma equação polinomial de segunda ordem em função das variáveis independentes X_1 - substrato (% m/v); X_2 - inóculo (discos); X_3 - agitação (rpm) (Equação 2):

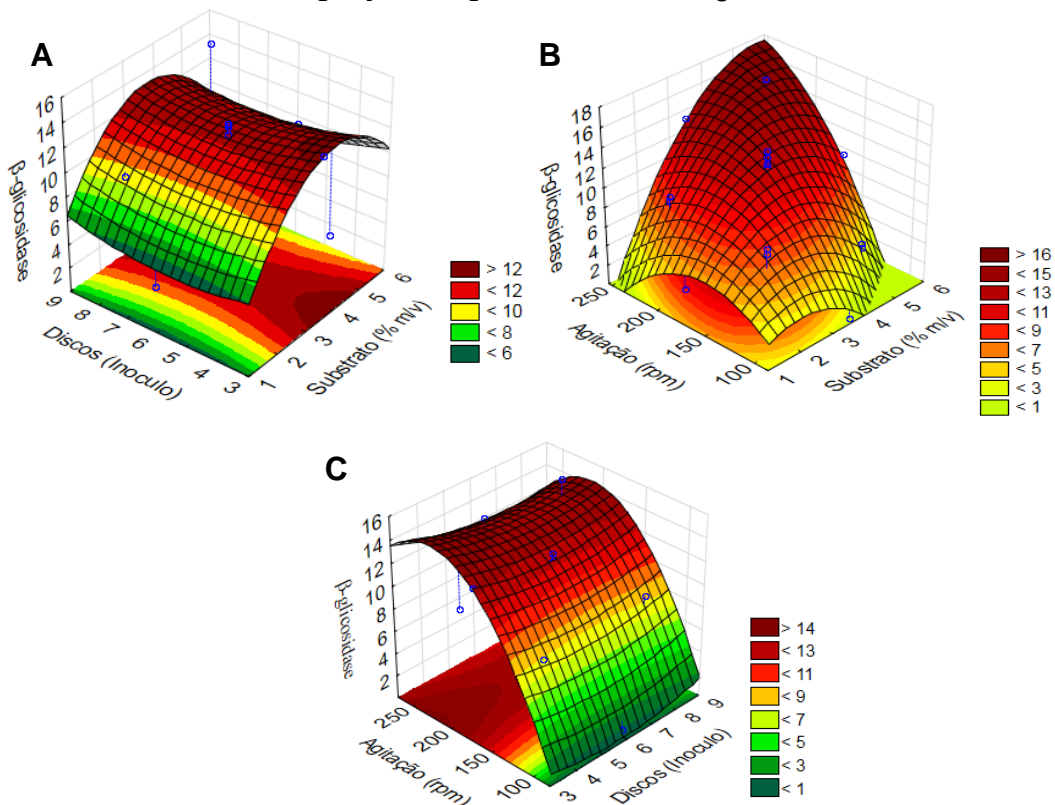
$$Y_2 = -8,42556226 + 0,186411411 \cdot x_1 - 0,000720362191 \cdot x_1^2 - 0,840693197 \cdot x_2 + 0,105388322 \cdot x_2^2 + 0,391176277 \cdot x_3 - 0,84993697 \cdot x_3^2 - 0,0016625 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,0388166667 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,0595833333 \cdot x_2 \cdot x_3$$

(Equação 2)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As superfícies de resposta geradas pelo modelo para a atividade de β -glicosidase são apresentadas na Figura 9, a fim de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma, buscando-se obter as melhores condições de cultivo para a obtenção de atividades máximas da enzima.

Figura 9 - Superfícies de resposta para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 em função das variáveis velocidade de agitação, carga de inóculo e carga de substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) vem sendo utilizada em programas de pesquisa em Biotecnologia e processos industriais, por ser um dos métodos de otimização mais práticos. Ela possibilita a identificação dos efeitos das variáveis individuais e a busca das condições ótimas para um sistema multivariado. Com isso, o efeito da interação de vários parâmetros pode ser entendido, geralmente resultando em maiores rendimentos de produção e na redução do número de experimentos (KUMAR et al., 2011).

Pela análise da Figura 9A observa-se que a faixa de carga de substrato que proporcionou maior atividade da enzima é a mesma (> 3 e < 5), independentemente de a carga de inóculo aplicada ser a mínima (3) ou a máxima (9) testada.

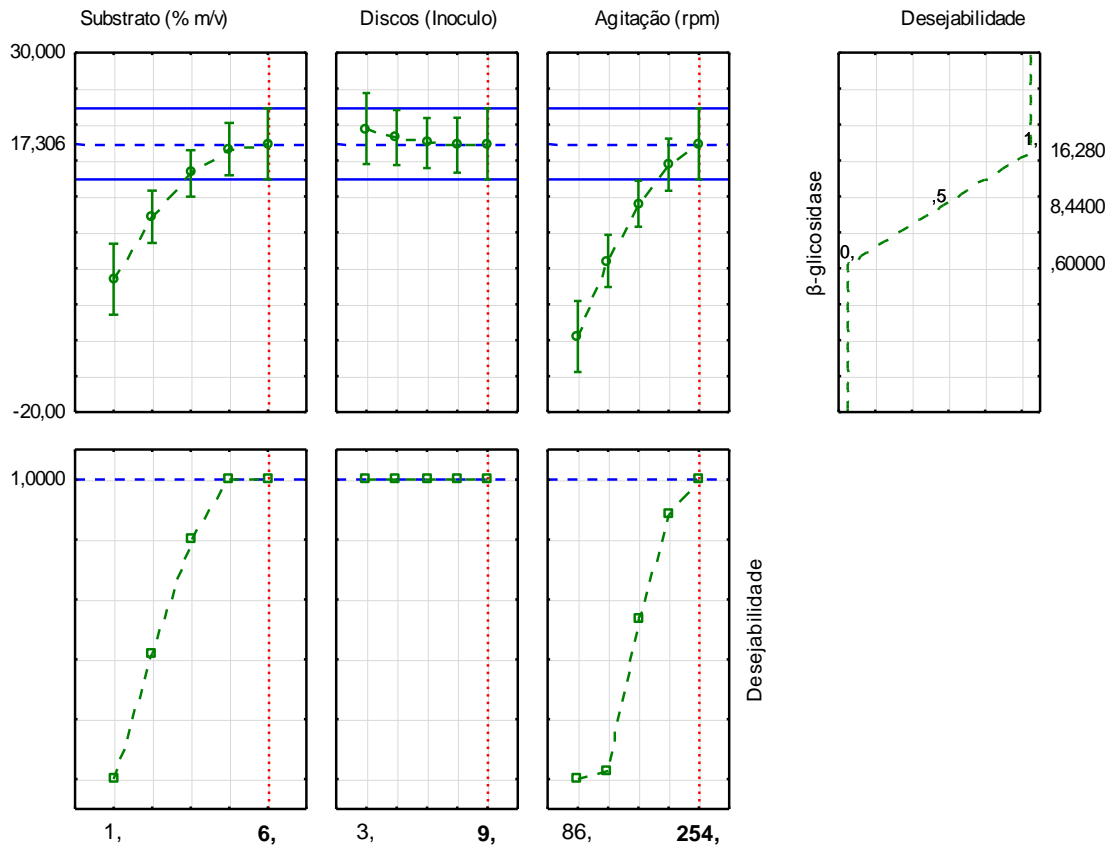
Observa-se que a carga de inóculo não é determinante na faixa de agitação que proporcionou as melhores produções de β -glicosidase (Figura 9C). Ou seja, 170 e 254 rpm, tanto a carga máxima quando a mínima de inóculo apresentaram os melhores resultados, além de as cargas intermediárias terem apresentado boa produção também. A representação de tais interações confirma que a variável carga de inóculo realmente não foi significativa.

Além disso, pode-se observar (Figura 9B), que as maiores atividades de β -glicosidase são obtidas quando as variáveis velocidade de agitação e carga de substrato são empregadas em seus níveis máximos (254 rpm e 6%, respectivamente). O comportamento da superfície sugere que o aumento nos níveis dessas variáveis proporciona aumento na atividade enzimática e que, possivelmente, sob estas condições se alcance a otimização das condições de cultivo. Porém, alguns autores afirmam que a velocidade de agitação excessiva do meio de cultivo tem uma variedade de efeitos sobre os microrganismos, incluindo a ruptura da parede celular, mudança na morfologia dos microrganismos filamentosos, variação na eficiência e taxa de crescimento e também variação na taxa de formação do produto desejado (PORCEL et al. 2005; DARAH e IBRAHIM, 1996; PAPAGIANNI et al., 2001). Desta forma, optou-se por não realizar experimentos com velocidade de agitação acima de 254 rpm.

Utilizando-se o modelo de regressão obtido pode-se otimizar a atividade de β -glicosidase, através da função de desejabilidade do *software* Statistica 10. Utilizando-se esta função, é possível estimar o nível de cada variável que maximizaria a atividade enzimática. Assim, a atividade máxima prevista para esta

enzima (17,30 U/mL) seria obtida empregando-se as variáveis de carga de substrato a 6 %, 9 discos de inóculo (4,5 de cada fungo), sob agitação de 254 rpm (Figura 10).

Figura 10 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de substrato e velocidade de agitação para a máxima atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A validação experimental dos resultados foi realizada pelo co-cultivo dos fungos sob a condição citada acima, em triplicata, e a média de atividade de β -glicosidase obtida foi $18,8 \pm 0,11$ U/mL confirmando que o modelo proposto permitiu representar os experimentos (uma vez que o valor se encontra dentro dos 10% de margem de erro permitidos sobre a atividade enzimática prevista pela função de desejabilidade). Sob estas condições, a atividade de endoglucanase foi 3,77 U/mL.

5.5.2 Cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01

Após avaliação da influência das variáveis empregadas no planejamento experimental para a produção do extrato por co-cultivo dos fungos de trabalho,

optou-se por realizar os cultivos isolados dos mesmos, a título de comparação dos extratos resultantes da melhor condição de cultivo indicada pelo software. A Tabela 11 apresenta as variáveis estudadas, em seus níveis codificados e reais, além das respostas em termos de atividades de endoglucanase e β -glicosidase obtidas no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01.

Tabela 11 - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C, tendo como resposta as atividades de celulasas.

| Ensaio | Variáveis | | | Respostas | |
|--------|-----------|-----------|------------|----------------------|-----------------------------|
| | x1 | x2 | x3 | Endoglucanase (U/mL) | β -glicosidase (U/mL) |
| 1 | -1 (2) | 1 (4) | -1 (120) | 2,42 | 1,00 |
| 2 | 1 (5) | -1 (4) | -1 (120) | 2,05 | 0,64 |
| 3 | -1 (2) | 1 (8) | -1 (120) | 2,49 | 1,19 |
| 4 | 1 (5) | -1 (8) | -1 (120) | 2,43 | 1,27 |
| 5 | -1 (2) | 1 (4) | 1 (220) | 4,05 | 8,94 |
| 6 | 1 (5) | -1 (4) | 1 (220) | 4,84 | 18,71 |
| 7 | -1 (2) | 1 (8) | 1 (220) | 3,92 | 6,28 |
| 8 | 1 (5) | -1 (8) | 1 (220) | 3,09 | 17,34 |
| 9 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 4,04 | 12,19 |
| 10 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 4,28 | 14,01 |
| 11 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,96 | 9,39 |
| 12 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 3,97 | 10,37 |
| 13 | -1,68 (1) | 0 (6) | 0 (170) | 2,99 | 5,34 |
| 14 | 1,68 (6) | 0 (6) | 0 (170) | 4,45 | 6,71 |
| 15 | 0 (3,5) | -1,68 (3) | 0 (170) | 4,35 | 12,73 |
| 16 | 0 (3,5) | 1,68 (9) | 0 (170) | 3,97 | 13,92 |
| 17 | 0 (3,5) | 0 (6) | -1,68 (86) | 1,64 | 0,79 |
| 18 | 0 (3,5) | 0 (6) | 1,68 (254) | 3,71 | 14,78 |

x1 - substrato (% m/v); x2 - inóculo (discos); x3 - agitação (rpm)

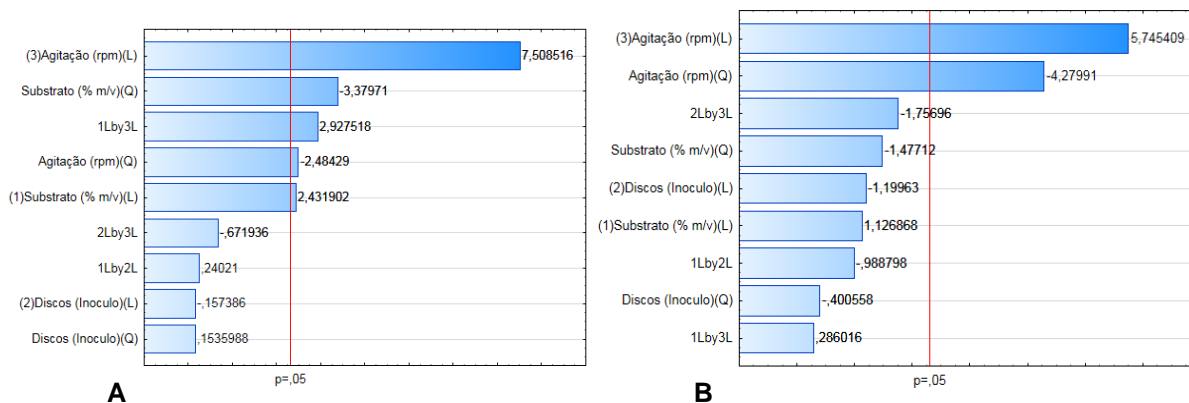
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que as atividades de endoglucanase e β -glicosidase variaram de 1,64 a 4,84 U/mL e de 0,64 a 18,71 U/mL, respectivamente. A condição de cultivo que proporcionou a maior atividade de endoglucanase foi a mesma que proporcionou a maior atividade de β -glicosidase (ensaio 6) e os valores máximos obtidos para as duas enzimas não foram próximos, sendo mais uma vez notável o

destaque na atividade de β -glicosidase. É possível visualizar ainda que o ensaio 14 também se destacou para a atividade de endoglucanase, seguido dos ensaios 15 e 5, em decréscimo de atividade, respectivamente. Para β -glicosidase, o ensaio 8 também apresentou destaque, com atividade enzimática muito próxima à máxima obtida.

Como realizado anteriormente o Diagrama de Pareto foi gerado (Figura 11) e seus dados podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada nas Tabelas 12 e 13.

Figura 11 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da análise de variância observa-se que o valor do coeficiente de determinação (R^2) para a atividade de β -glicosidase foi de 0,91 indicando que os experimentos se ajustam em 91 % ao modelo proposto. Para esta enzima, os efeitos lineares e quadráticos das variáveis carga de substrato e agitação foram significativos ($p < 0,05$), bem como a interação entre elas. Para a atividade de endoglucanase, o valor de R^2 foi 0,88, indicando que o modelo não se ajusta bem aos dados experimentais. Para esta enzima, apenas a variável agitação apresentou efeitos lineares e quadráticos significativos.

Tabela 12 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| β-glicosidase | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 38,4329 | 1 | 38,4329 | 5,91415 | 0,041080 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 74,2286 | 1 | 74,2286 | 11,42247 | 0,009646 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,1610 | 1 | 0,1610 | 0,02477 | 0,878840 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 0,1533 | 1 | 0,1533 | 0,02359 | 0,881730 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 366,3696 | 1 | 366,3696 | 56,37781 | 0,000069 |
| Agitação (rpm)(Q) | 40,1065 | 1 | 40,1065 | 6,17168 | 0,037858 |
| 1L by 2L | 0,3750 | 1 | 0,3750 | 0,05770 | 0,816208 |
| 1L by 3L | 55,6943 | 1 | 55,6943 | 8,57036 | 0,019070 |
| 2L by 3L | 2,9340 | 1 | 2,9340 | 0,45150 | 0,520553 |
| Erro | 51,9878 | 8 | 6,4985 | | |
| Total | 618,7057 | 17 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| Endoglucanase | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 0,28144 | 1 | 0,281437 | 1,26983 | 0,292461 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 0,48358 | 1 | 0,483578 | 2,18189 | 0,177892 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,31896 | 1 | 0,318956 | 1,43912 | 0,264602 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 0,03556 | 1 | 0,035560 | 0,16045 | 0,699230 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 7,31605 | 1 | 7,316045 | 33,00972 | 0,000431 |
| Agitação (rpm)(Q) | 4,05978 | 1 | 4,059783 | 18,31759 | 0,002688 |
| 1L by 2L | 0,21670 | 1 | 0,216695 | 0,97772 | 0,351721 |
| 1L by 3L | 0,01813 | 1 | 0,018131 | 0,08181 | 0,782132 |
| 2L by 3L | 0,68416 | 1 | 0,684157 | 3,08689 | 0,116988 |
| Erro | 51,9878 | 8 | 6,4985 | | |
| Total | 618,7057 | 17 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma equação polinomial de segunda ordem foi modelada a partir da resposta atividade de β -glicosidase (Y), em função das variáveis independentes X_1 - substrato (% m/v); X_2 - inóculo (discos); X_3 - agitação (rpm) (Equação 3):

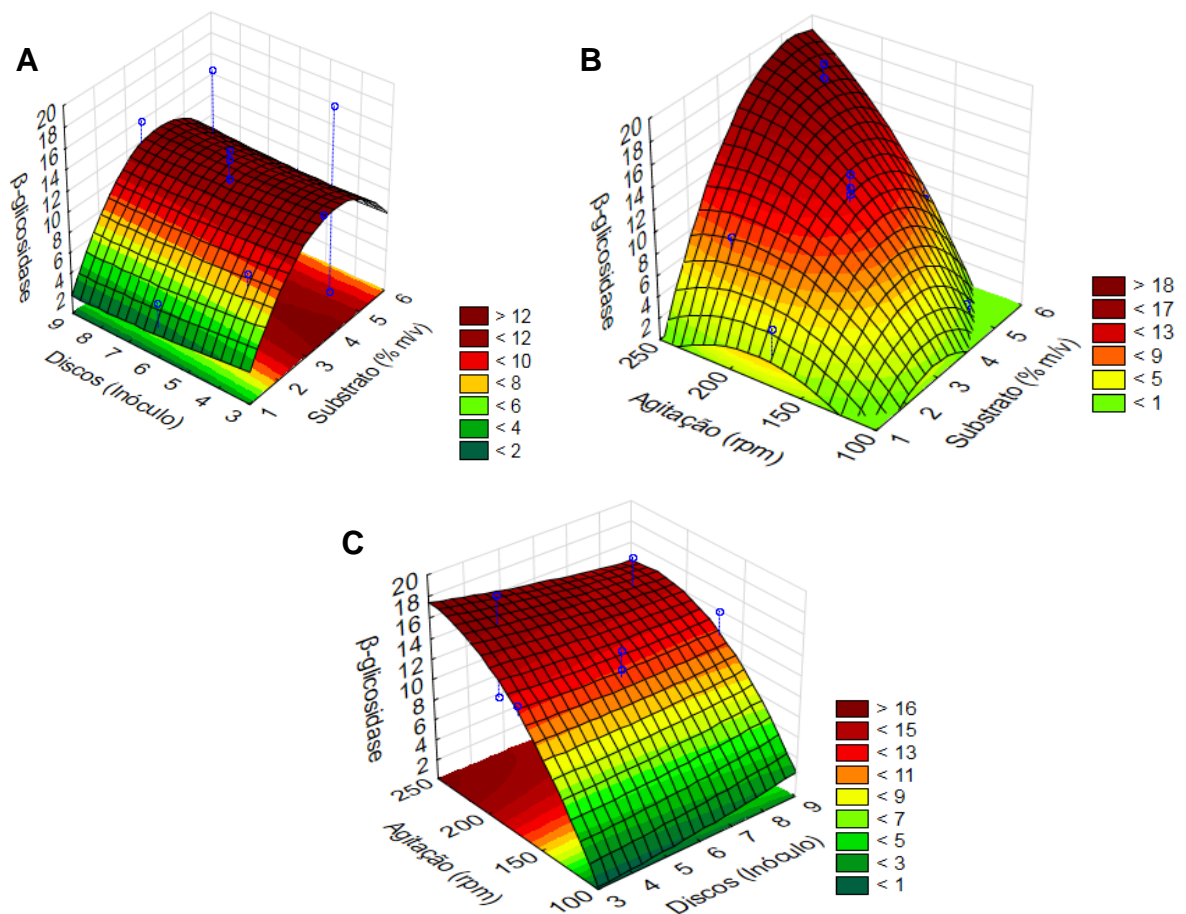
$$Y_2 = -25,6861 + 2,2765 \cdot x_1 - 1,0811 \cdot x_1^2 + 0,3302 \cdot x_2 + 0,0325 \cdot x_2^2 + 0,2568 \cdot x_3 - 0,0007 \cdot x_3^2 + 0,0722 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,0352 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,0061 \cdot x_2 \cdot x_3$$

(Equação 3)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 12 apresenta as superfícies de resposta geradas pelo modelo para a atividade de β -glicosidase, demonstrando os efeitos da interação das variáveis e os níveis ideais de cada uma.

Figura 12 - Superfícies de resposta para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 em função das variáveis velocidade de agitação, carga de inóculo e carga de substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

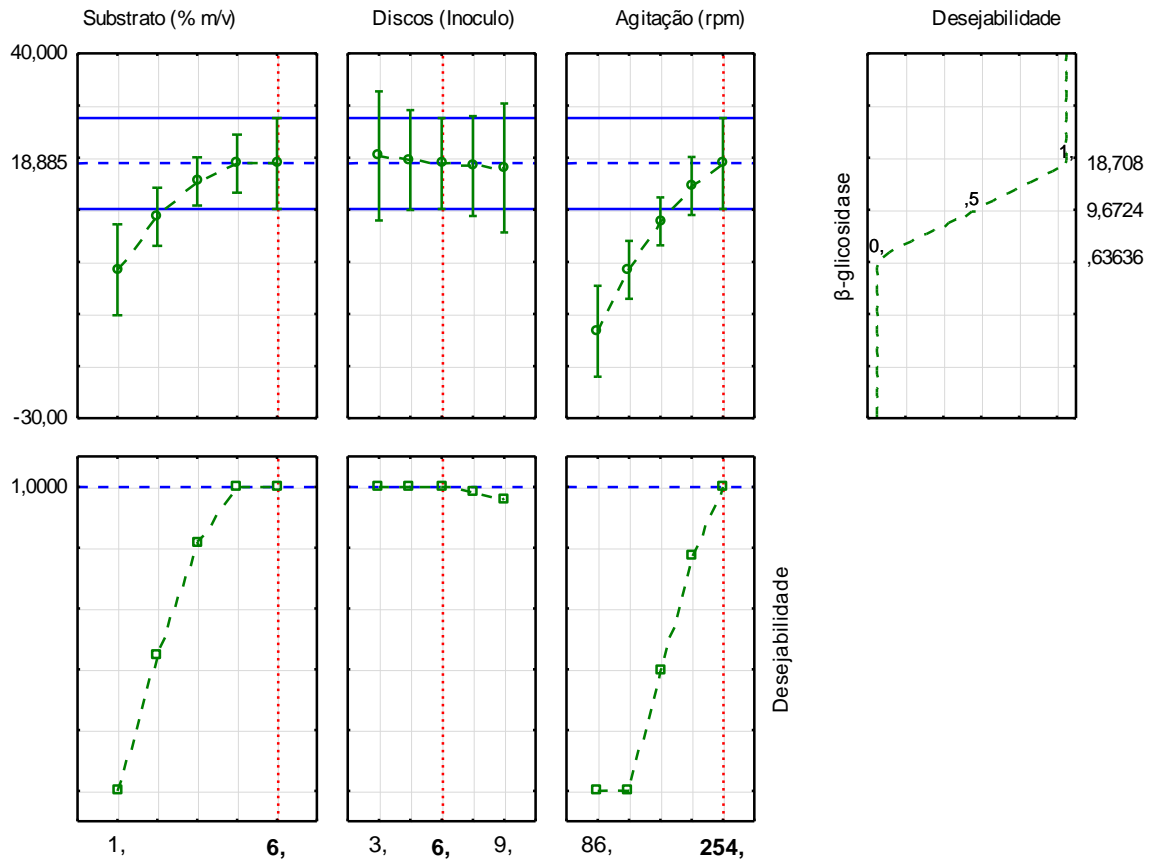
Observa-se que a faixa de carga de substrato que proporcionou maior produção da enzima é a mesma (> 3 e < 5), independentemente de a carga de inóculo aplicada ser a mínima (3) ou a máxima (9) testada (Figura 12A).

Pode-se visualizar que entre 170 e 254 rpm, em todas as cargas de inóculo testadas, os resultados foram semelhantes confirmando que a variável carga de inóculo realmente não foi significativa (Figura 12C).

Pelos dados apresentados, nota-se também que as maiores atividades de β -glicosidase são obtidas quando as variáveis velocidade de agitação e carga de substrato são empregadas em seus níveis máximos (254 rpm e 6%, respectivamente) (Figura 12B). O comportamento quadrático da superfície sugere que o aumento nos níveis dessas variáveis proporciona aumento na atividade enzimática e que, possivelmente, sob estas condições se alcance a otimização das condições de cultivo. Porém, assim como no planejamento anterior, optou-se por não realizar experimentos com velocidade de agitação acima de 254 rpm devido à fatores biológicos citados na literatura.

Utilizando-se o modelo de regressão obtido pode-se encontrar as melhores condições para alcançar a melhor atividade de β -glicosidase, através da função de desejabilidade do *software* Statistica 10. Utilizando-se esta função, a atividade máxima prevista para esta enzima (18,88 U/mL) seria obtida empregando-se as variáveis de carga de substrato a 6 %, 6 discos de inóculo, sob agitação de 254 rpm (Figura 13).

Figura 13 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de substrato e velocidade de agitação para a máxima atividade de β -glicosidade obtida pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A validação experimental dos resultados foi realizada pelo cultivo do fungo sob a condição citada acima, em triplicata, e a média de atividade de β -glicosidase obtida foi $17,5 \pm 0,11$ U/mL confirmando que o modelo proposto permitiu representar os experimentos (uma vez que o valor se encontra dentro dos 10% de margem de erro permitidos sobre a atividade enzimática prevista pela função de desejabilidade). Sob estas condições, a atividade de endoglucanase foi 3,66 U/mL.

5.5.3. Cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04

Após avaliação da influência das variáveis empregadas nos planejamentos experimentais anteriores (itens 5.5.1 e 5.5.2) realizou-se o cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04, a título de comparação dos extratos resultantes da melhor condição de cultivo indicada pelo software. A Tabela 14 apresenta as variáveis

estudadas, em seus níveis codificados e reais, além das respostas obtidas em termos de atividades de endoglucanase e β -glicosidase.

Tabela 14 - Delineamento composto central rotacional, níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado no cultivo isolado do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, em meio 2 (palha de cana pré-tratada + farelo de soja), por 144 horas, a 28 °C, tendo como resposta as atividades de celulasas.

| Ensaio | Variáveis | | | Resposta | |
|--------|-----------|-----------|------------|----------------------|-----------------------------|
| | x1 | x2 | x3 | Endoglucanase (U/mL) | β -glicosidase (U/mL) |
| 1 | -1 (2) | 1 (4) | -1 (120) | 0,93 | 3,62 |
| 2 | 1 (5) | -1 (4) | -1 (120) | 1,01 | 1,97 |
| 3 | -1 (2) | 1 (8) | -1 (120) | 0,77 | 2,65 |
| 4 | 1 (5) | -1 (8) | -1 (120) | 0,97 | 1,96 |
| 5 | -1 (2) | 1 (4) | 1 (220) | 0,65 | 5,48 |
| 6 | 1 (5) | -1 (4) | 1 (220) | 0,29 | 4,35 |
| 7 | -1 (2) | 1 (8) | 1 (220) | 0,24 | 4,10 |
| 8 | 1 (5) | -1 (8) | 1 (220) | 0,55 | 7,10 |
| 9 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 0,41 | 9,66 |
| 10 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 0,39 | 11,37 |
| 11 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 0,39 | 8,01 |
| 12 | 0 (3,5) | 0 (6) | 0 (170) | 0,36 | 8,56 |
| 13 | -1,68 (1) | 0 (6) | 0 (170) | 0,48 | 5,09 |
| 14 | 1,68 (6) | 0 (6) | 0 (170) | 0,63 | 10,68 |
| 15 | 0 (3,5) | -1,68 (3) | 0 (170) | 0,33 | 10,06 |
| 16 | 0 (3,5) | 1,68 (9) | 0 (170) | 0,51 | 8,59 |
| 17 | 0 (3,5) | 0 (6) | -1,68 (86) | 0,49 | 1,60 |
| 18 | 0 (3,5) | 0 (6) | 1,68 (254) | 0,28 | 5,89 |

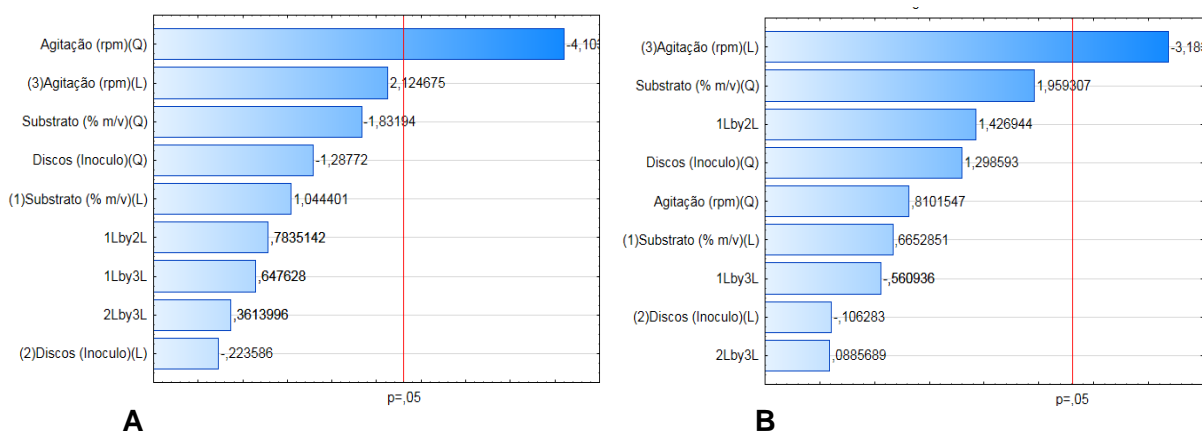
x1 - substrato (% m/v); x2 - inóculo (discos); x3 - agitação (rpm)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que as atividades de endoglucanase e β -glicosidase variaram de 0,24 a 1,01 U/mL e de 1,60 a 11,37 U/mL, respectivamente (Tabela 14). A condição de cultivo que proporcionou a maior atividade de endoglucanase (ensaio 2) não foi a mesma que proporcionou a maior atividade de β -glicosidase (ensaio 10) e os valores máximos obtidos para as duas enzimas apresentaram grande diferença, sendo notável o destaque na atividade de β -glicosidase.

As variáveis testadas e suas interações exerceram efeitos sobre as atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase, que estão representados pelo Diagrama de Pareto na Figura 14. Estes efeitos podem ser confirmados pela análise de variância apresentada nas Tabelas 15 e 16.

Figura 14 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelo cultivo isolado do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o coeficiente de determinação (R^2) dado pela análise de variância para β -glicosidase (0,75) afirma-se que os experimentos realizados se ajustam em apenas 75% ao modelo proposto. Para a atividade desta enzima, apenas o efeito quadrático da variável agitação foi significativo ($p < 0,05$). Para a atividade de endoglucanase, o valor de R^2 foi 0,69, indicando que o modelo também não ajusta bem aos dados experimentais, e apenas o efeito linear da variável agitação apresentou significância.

Tabela 15 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| β-glicosidase | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 5,7705 | 1 | 5,77046 | 1,09077 | 0,326829 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 17,7540 | 1 | 17,75400 | 3,35599 | 0,104327 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,2645 | 1 | 0,26446 | 0,04999 | 0,828683 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 8,7723 | 1 | 8,77234 | 1,65821 | 0,233844 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 23,8815 | 1 | 23,88148 | 4,51425 | 0,066341 |
| Agitação (rpm)(Q) | 89,0880 | 1 | 89,08800 | 16,84004 | 0,003420 |
| 1L by 2L | 3,2477 | 1 | 3,24765 | 0,61389 | 0,455893 |
| 1L by 3L | 2,2188 | 1 | 2,21885 | 0,41942 | 0,535365 |
| 2L by 3L | 0,6910 | 1 | 0,69096 | 0,13061 | 0,727159 |
| Erro | 42,3220 | 8 | 5,29025 | | |
| Total | 175,0592 | 17 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 16 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade de Endoglucanase obtida pelo cultivo do fungo *Saccharicola* sp. EJC04, por fermentação submersa, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

| Endoglucanase | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1)Substrato (% m/v)(L) | 0,016911 | 1 | 0,016911 | 0,44260 | 0,524581 |
| Substrato (% m/v)(Q) | 0,146672 | 1 | 0,146672 | 3,83888 | 0,085750 |
| (2)Discos (Inoculo)(L) | 0,000432 | 1 | 0,000432 | 0,01130 | 0,917975 |
| Discos (Inoculo)(Q) | 0,064430 | 1 | 0,064430 | 1,68634 | 0,230263 |
| (3)Agitação (rpm)(L) | 0,387290 | 1 | 0,387290 | 10,13666 | 0,012923 |
| Agitação (rpm)(Q) | 0,025077 | 1 | 0,025077 | 0,65635 | 0,441282 |
| 1L by 2L | 0,077796 | 1 | 0,077796 | 2,03617 | 0,191438 |
| 1L by 3L | 0,012022 | 1 | 0,012022 | 0,31465 | 0,590202 |
| 2L by 3L | 0,000300 | 1 | 0,000300 | 0,00784 | 0,931602 |
| Erro | 0,305655 | 8 | 0,038207 | | |
| Total | 0,990100 | 17 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido aos baixos valores dos coeficientes de determinação (R^2) para a produção das enzimas pelo cultivo isolado de EJC04, optou-se por não realizar a validação experimental deste cultivo. Levou-se em consideração também, que as atividades enzimáticas obtidas nesse planejamento foram inferiores às obtidas nos ensaios de co-cultivo dos fungos e no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01.

Matkar et al. (2013) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a composição do meio de cultivo para a produção de celulases pelo fungo *Aspergillus sydowii*, variando as fontes de carbono e nitrogênio. O modelo foi validado, a lactose foi a fonte de carbono que proporcionou melhor indução e foram obtidas atividades de 1,32 U/mL de endoglucanase, e 9,24 U/mL de β -glicosidase, ambos no 6º dia de fermentação submersa, a 40 °C e 120 rpm. Oliveira et al. (2016) estudaram a otimização das condições de cultivo para a produção de endoglucanases pelo fungo *Penicillium* sp. I7-05, utilizando palha de cana e milhocina como substratos indutores, adotando também o DCCR como ferramenta estatística, variando a carga dos dois substratos. A validação mostrou que a condição otimizada para a atividade de endoglucanase foi 1,5% de palha de cana e 0,15% de milhocina, no 5º dia de fermentação, apresentando um máximo de 2,56 U/mL.

Após análise dos resultados dos três planejamentos experimentais e visando a obtenção das melhores condições de cultivo para produção de um extrato com melhores atividades de β -glicosidase, definiu-se como mais viável a produção de celulases por cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, com carga de substrato de 6 %, 6 discos de inóculo e a 254 rpm. Para tal definição levou-se em conta que as atividades enzimáticas obtidas desse cultivo, quando comparadas às obtidas no co-cultivo dos fungos de trabalho, apresentaram uma variação muito pequena (1,3 U/mL). Tendo em vista que para o co-cultivo a carga de inóculo empregada é maior (9 discos) e que é mais viável trabalhar com a produção de pré-inóculo de apenas um fungo, confirmou-se a seleção do extrato enzimático produzido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 para a continuidade do trabalho.

5.5.4 Cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio contendo celulose como substrato

Realizou-se este cultivo tendo como substrato celulose (Sigma-Aldrich) (1% m/v), a título de comparação. O cultivo foi realizado em triplicata, nas condições de agitação e carga de inóculo que levaram às melhores atividades enzimáticas no planejamento experimental (254 rpm e 6 discos, respectivamente). Os resultados são apresentados na Tabela 17, em comparação àqueles obtidos quando utilizou-se o meio 2 como substrato.

Tabela 17 - Comparação das atividades enzimáticas obtidas a partir dos cultivos de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2 (farelo de soja 0,5% m/v + palha de cana pré-tratada 0,5% m/v) e em meio contendo celulose 1% m/v, sob as melhores condições de cultivo para a produção de celulases, selecionadas mediante planejamento experimental.

| Enzimas | Meio 2 (PC 0,5% + FS 0,5%) | Celulose (1%) |
|----------------------|-------------------------------|------------------|
| Endoglucanase | 3,66 | 1,43 |
| Exoglucanase | 1,09 | 0,60 |
| FPase | 0,33 | 0,05 |
| β -glicosidase | 17,5 | 0,27 |

*Atividades enzimáticas das celulases expressas em U/mL;

*Atividade enzimática de FPase expressa em FPU/mL.

*PC: Palha de cana de açúcar; FS: Farelo de Soja.

Fonte: Elaborado pelo autor

Pode-se visualizar que, nas mesmas condições de cultivo, com alteração do substrato, o fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 produziu um extrato cujas atividades das celulases foram notavelmente maiores quando a fonte de carboidratos empregada foi os materiais lignocelulósicos. Pode-se destacar a atividade de β -glicosidase, que foi 57 vezes superior quando o fungo foi cultivado em meio 2, o que é interessante em relação aos custos do processo.

Ramanathan et al. (2010) otimizaram as condições para a produção de celulases por *Fusarium oxysporum*. O fungo, quando cultivado em meio contendo 1% de carboximetilcelulose como substrato, a 50 °C, por 12 dias, produziu um extrato cujas atividades enzimáticas obtidas foram 1,92, 1,34 e 1,78 U/mL para endoglucanase, FPase, e β -glicosidase, respectivamente.

5.6 Caracterização físico-química de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato selecionado produzido a partir do cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01

Os testes do efeito de pH e temperatura sobre a atividade das enzimas foram realizados com o objetivo de se descobrir o ótimo dessas duas variáveis para a ação enzimática.

5.6.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

A Tabela 18 apresenta as variáveis estudadas, em seus níveis codificados e reais, além das respostas em termos de atividades relativas de endoglucanase e β -glicosidase obtidas na análise do efeito da temperatura e pH sobre estas atividades. Foi considerada como 100% a maior atividade enzimática encontrada nestes experimentos.

Tabela 18 - Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , níveis codificados e reais (entre parêntesis), empregado na caracterização enzimática, e atividades relativas de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato do cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01.

| Ensaio | Variáveis | | Resposta | |
|--------|-----------|------------------|-----------------------------|----------------------|
| | pH | Temperatura (°C) | β -glicosidase (U/mL) | Endoglucanase (U/mL) |
| 1 | -1 (3,5) | -1 (50) | 23,5 | 33,5 |
| 2 | +1 (7,5) | -1 (50) | 26,9 | 45,3 |
| 3 | -1 (3,5) | +1 (70) | 14,0 | 16,8 |
| 4 | +1 (7,5) | +1 (70) | 49,1 | 36,5 |
| 5 | -1 (3,5) | 0 (60) | 31,7 | 35,0 |
| 6 | +1 (7,5) | 0 (60) | 50,9 | 58,1 |
| 7 | 0 (5,5) | -1 (50) | 61,6 | 62,7 |
| 8 | 0 (5,5) | +1 (70) | 64,2 | 63,6 |
| 9 | 0 (5,5) | 0 (60) | 98,7 | 99,6 |
| 10 | 0 (5,5) | 0 (60) | 99,0 | 100,0 |
| 11 | 0 (5,5) | 0 (60) | 100,0 | 97,8 |
| 12 | 0 (5,5) | 0 (60) | 98,5 | 98,1 |

*100% = 5,52 U/mL para Endoglucanase e 24,51 U/mL para β -glicosidase.

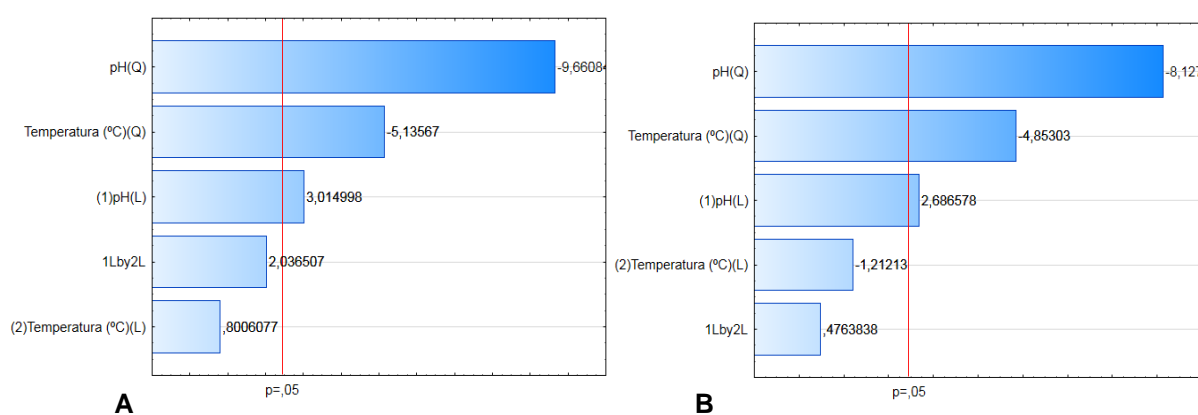
Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades relativas variaram de 14% a 100% para endoglucanase e de 16,8% a 100% para β -glicosidase, demonstrando a grande influência que as variáveis estudadas apresentam sobre a atividade destas enzimas.

Observa-se que as atividades de β -glicosidase e endoglucanase foram menores em pH 3,5 nas 3 temperaturas testadas, o que indica que quanto mais ácido o pH, menor a ação enzimática. Em pH 7,5, as atividades enzimáticas foram um pouco maiores, tendo sido a mais alta, dentre elas, a do ensaio 6, sugerindo que 60°C e pH mais próximo à neutralidade auxilia a ação enzimática. Pode-se ressaltar que para ambas as enzimas, a combinação de pH ácido com alta temperatura resultaram na menor atividade enzimática (ensaio 3). Por fim, é notável que as melhores atividades se deram nos ensaios de 9 a 12 que representam as quatro repetições do ponto central do planejamento experimental (Tabela 18).

Pelo diagrama de pareto são apresentados os efeitos das variáveis pH e temperatura, e o efeito da interação entre elas sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase (Figura 15), que podem ser confirmados pela análise de variância apresentada nas Tabelas 19 e 20.

Figura 15 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis sobre as atividades relativas de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) obtidas pelos ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2².



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se através da análise de variância que, para ambas as enzimas, os efeitos quadráticos de pH e temperatura e o efeito linear de pH foram significativos ($p < 0,05$). O valor do coeficiente de determinação (R^2) para a atividade de β -

glicosidase foi de 0,97 indicando que os experimentos se ajustam em 97% ao modelo proposto. Já para a atividade de endoglucanase, o valor do R^2 foi de 0,96 indicando que os experimentos se ajustam em 96% ao modelo proposto.

Tabela 19 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade relativa de β -glicosidase obtida pelos ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2

| β-glicosidase | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1) pH (L) | 33,2249 | 1 | 33,2249 | 9,09021 | 0,023548 |
| pH (Q) | 341,1304 | 1 | 341,1304 | 93,33192 | 0,000070 |
| (2) Temperatura (°C) (L) | 2,3428 | 1 | 2,3428 | 0,64097 | 0,453884 |
| Temperatura (°C) (Q) | 96,4017 | 1 | 96,4017 | 26,37511 | 0,002145 |
| 1L by 2L | 15,1587 | 1 | 15,1587 | 4,14736 | 0,087868 |
| Erro | 21,9301 | 6 | 3,6550 | | |
| Total | 700,8879 | 11 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade relativa de endoglucanase obtida pelos ensaios de caracterização enzimática do extrato de cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2

| Endoglucanase | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|--------------------|------------------|----------|-----------------|
| Variáveis | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | P |
| (1) pH (L) | 1,50913 | 1 | 1,50913 | 7,21770 | 0,036217 |
| pH (Q) | 13,81181 | 1 | 13,81181 | 66,05748 | 0,000186 |
| (2) Temperatura (°C) (L) | 0,30720 | 1 | 0,30720 | 1,46925 | 0,271025 |
| Temperatura (°C) (Q) | 4,92441 | 1 | 4,92441 | 23,55187 | 0,002843 |
| 1L by 2L | 0,04745 | 1 | 0,04745 | 0,22694 | 0,650653 |
| Erro | 1,25453 | 6 | 0,20909 | | |
| Total | 30,38189 | 11 | | | |

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o tratamento dos dados por análise de regressão múltipla, a equação polinomial de segunda ordem foi derivada para representar a atividade prevista de β -glicosidase (Equação 4), e de endoglucanase (Equação 5) em função das variáveis independentes avaliadas. As equações são apresentadas abaixo, em níveis reais:

$$Y_2 = -256,754 + 26,440 \cdot x_1 - 2,828 \cdot x_1^2 + 6,742 \cdot x_2 - 0,060 \cdot x_2^2 + 0,097 \cdot x_1 \cdot x_2$$

(Equação 4)

Fonte: Elaborado pelo autor.

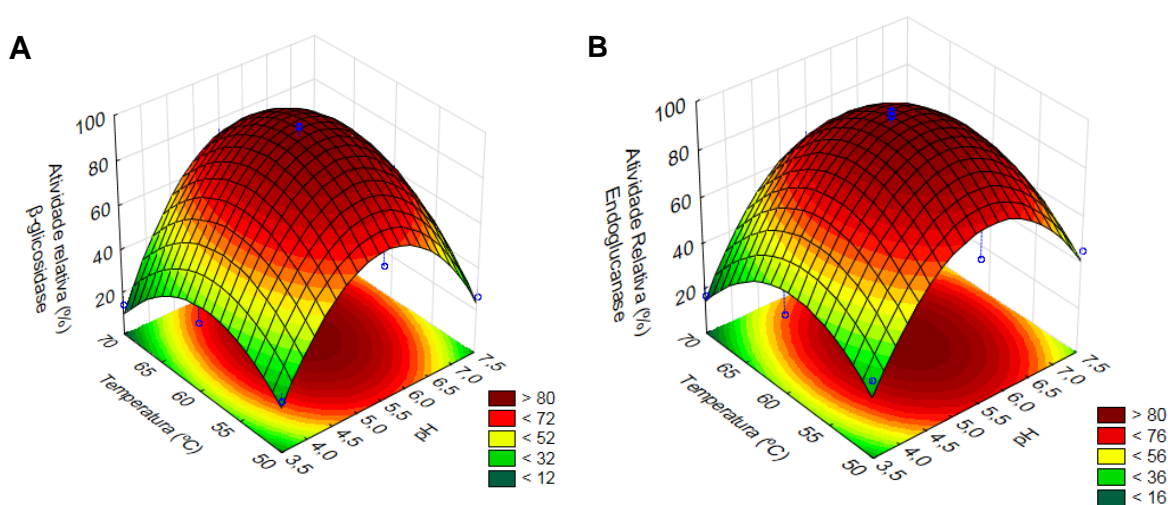
$$Y_2 = -59,1023 + 6,1826 \cdot x_1 - 0,5690 \cdot x_1^2 + 1,5781 \cdot x_2 - 0,0136 \cdot x_2^2 + 0,0054 \cdot x_1 \cdot x_2$$

(Equação 5)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As superfícies de resposta geradas pelo modelo para as atividades de β -glicosidase e endoglucanase são apresentadas na Figura 16, a fim de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma, buscando-se obter as melhores condições para a atividade das enzimas.

Figura 16 - Superfícies de resposta para as atividades relativas de β -glicosidase (A) e endoglucanase (B) presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01.

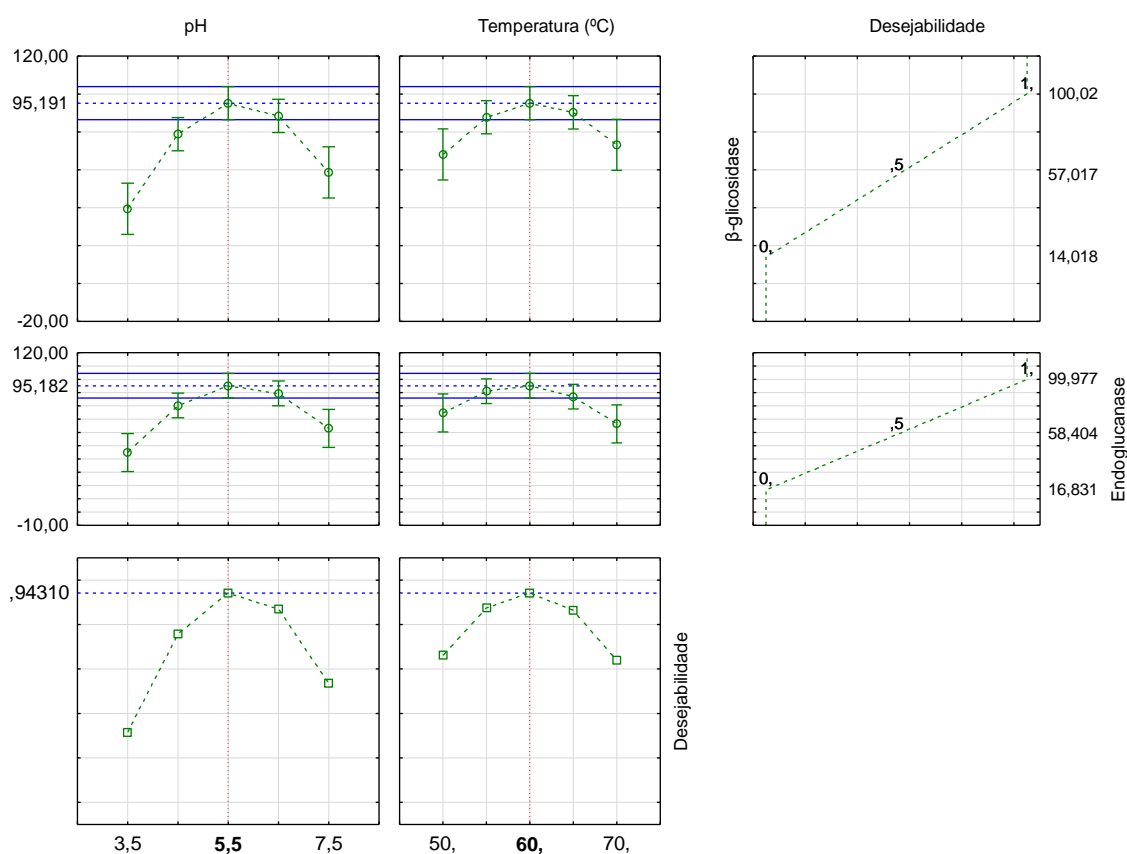


Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela análise das figuras 16A e 16B, observa-se que as máximas atividades de β -glicosidase e endoglucanase foram obtidas na condição de 60 °C e pH 5,5.

De acordo com a figura 17, o pH 5,5 e a temperatura de 60 °C são apontados pela função de desejabilidade como os valores ótimos que levariam a uma máxima atividade de endoglucanase e β -glicosidase. A validação experimental dos resultados foi realizada com ensaios de reação enzimática em triplicata, sob estas condições. Os resultados obtidos foram 99,68% \pm 0,01 para atividade residual de endoglucanase e 100% \pm 0,08 para β -glicosidase, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

Figura 17 - Perfis dos valores previstos/otimizizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura para as máximas atividades de β -glicosidase e endoglucanase presentes no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01



Fonte: Elaborado pelo autor.

A maioria das enzimas tem um pH ótimo no qual sua atividade é máxima, e acima ou abaixo desse valor a atividade enzimática diminui. Isso ocorre porque os íons H^+ e o OH^- , liberados por ácidos e bases respectivamente, podem alterar a estrutura tridimensional da enzima, alterando sua estabilidade, sua afinidade como substrato e seu poder de catálise uma vez que competem com suas as ligações

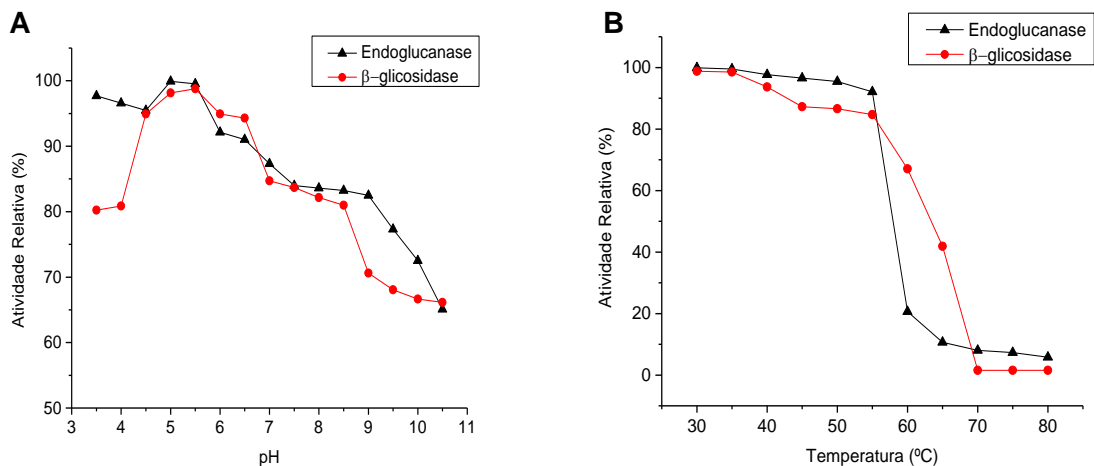
iônicas, principalmente no sítio ativo. Níveis ótimos de temperatura também são importantes para que enzimas expressem atividades elevadas. Acima da temperatura ótima, ocorre a desnaturação da enzima, onde há perda da sua estrutura tridimensional, causada por quebra de ligações de hidrogênio e de outras ligações não covalentes. Com isso ocorre um desarranjo dos aminoácidos no sítio ativo, alterando sua forma e provocando perda de atividade. Alterações extremas de pH também podem resultar em desnaturação enzimática. (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012; BORZANI et al., 2001). Portanto é importante que se conheça as faixas de temperatura e pH onde ocorra melhor atuação, e onde não ocorra perda da atividade das enzimas, principalmente quando estas são de potencial biotecnológico industrial.

Segundo a literatura, geralmente, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0). Castro e Pereira Jr. (2010), em seu artigo de revisão, citaram que o fungo *Ceriporiopsis subvermispota* produz endoglucanases cuja melhor atividade é alcançada em pH 3,5, a 60 °C, e β -glicosidases que atuam melhor nesta mesma temperatura, mas em pH 4,5; *Thricoderma viride*, produz endoglucanases que atuam melhor em 60 °C e pH 4,8; e *Humicola isolens* produz endoglucanases e β -glicosidases que atuam melhor em 50 °C e pH 5,0. Endoglucanases produzidas por *Trichoderma reesei* Rut C30 por fermentação submersa de bagaço de cana de açúcar apresentaram maior estabilidade em pH 4,5 e 55 °C (FLORENCIO et al., 2013). β -glicosidases produzidas por *Monascus purpureus* em fermentação submersa utilizando resíduos de uva e peptona como substrato, apresentaram atividade ótima em 50 °C e pH 5,5 (DAROIT, 2007). Endoglucanases e β -glicosidases produzidas por *Streptomyces* sp. em cultivo submerso empregando farelo de trigo e extrato de levedura como substrato apresentaram atividades ótimas em pH 4,5 e 50 °C e pH 4,5 e 65 °C, respectivamente (VILELA, 2013). Estes dados são comparáveis com os obtidos na caracterização de endoglucanase e β -glicosidase de *Botryosphaeria* sp. AM01, que também mostram maiores atividades em pH moderadamente ácido e temperaturas acima de 50 °C, preferencialmente a 60 °C.

5.6.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas

Após a otimização das variáveis pH e temperatura para a atividade das enzimas endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato obtido a partir do cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, avaliou-se o efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas. Para avaliação do efeito do pH, o extrato enzimático foi incubado, por 24h, a temperatura de 24 °C, em soluções tampão na faixa de pH de 3,5 - 10,5 e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação de cada enzima (pH 5,5, a 60 °C). Para avaliação do efeito da temperatura, o extrato enzimático foi incubado por 1h, a temperaturas entre 30 e 80 °C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas de atividade. Foi considerado como 100% a atividade da enzima quantificada no seu pH e temperatura ótima de atividade, antes do período de incubação. Os resultados obtidos foram plotados em forma de atividade relativa e podem ser visualizados na Figura 18.

Figura 18 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2, a 254rpm, 28°C, por 144h. *100% = 5,52 U/mL para Endoglucanase e 24,51 U/mL para β -glicosidase.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que em pH 5,0 e 5,5 ambas as enzimas mantiveram atividade próxima a 100%. Em pH mais ácido, entre 3,5 e 4,5, a enzima endoglucanase manteve de 97 a 95% de atividade e a partir dessa faixa, quanto mais alcalino o pH, menor a atividade dessa enzima. A enzima β -glicosidase teve sua atividade reduzida a 80 % entre os pH 3,5 e 4, e, em pH neutro e alcalino seu comportamento é

semelhante ao da endoglucanase. Em geral, entre pH 4,5 e e 5,5, ambas as enzimas apresentaram acima de 95% de atividade, o que é interessante em uso industrial, pois em biorreatores de alta capacidade, é mais difícil a manutenção de homogeneidade em todo o meio. Assim, quanto maior a faixa de pH ótimo, menor a perda de eficiência. No pH mais básico testado, ambas atingiram um mínimo de 65/66 % de atividade. A avaliação da termoestabilidade foi realizada em pH 5,5, no qual ambas as enzimas mantiveram boa estabilidade.

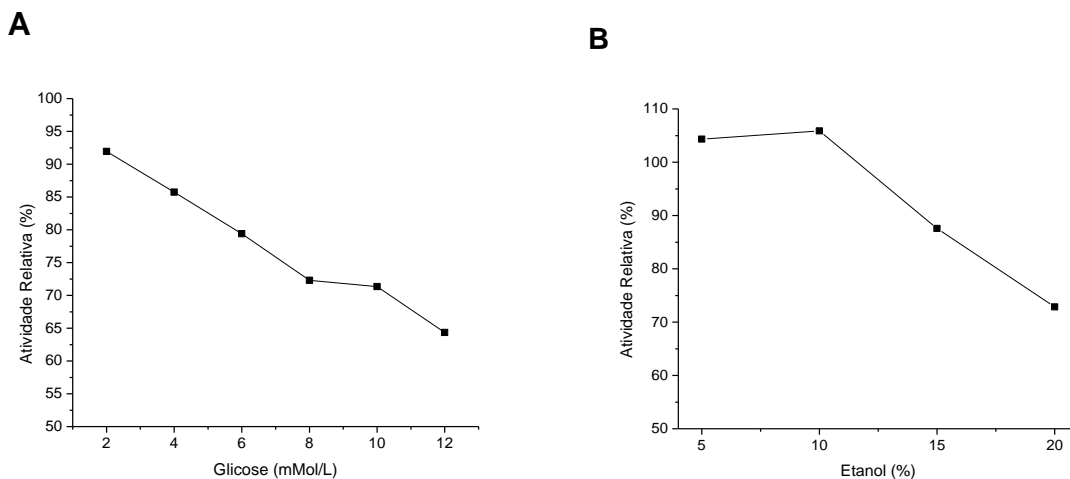
A temperatura demonstrou maior influência na estabilidade das enzimas, sendo capaz de reduzir a atividade de endoglucanase a 5% e de β -glicosidase a 1%, quando testada em seus níveis máximos. Entre 30 e 35 °C, ambas as enzimas mantiveram suas atividades praticamente inalteradas e, entre 35 e 55 °C, menos de 20% da atividade de ambas foi perdida. A partir de 70 °C ambas apresentaram atividades muito baixas, indicando a desnaturação quase total destas enzimas do extrato selecionado.

β -glicosidases produzidas por *Monascus purpureus* apresentaram atividade residual de 78 % após incubação a 60 °C por 120 minutos (DAROIT, 2007). As atividades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* sp. mantiveram-se inalteradas após incubação a 60 °C por 120 minutos, e β -glicosidases produzidas por este mesmo fungo mantiveram mais de 75% de sua atividade inicial após incubação 60 °C por 150 minutos (VILELA, 2013). A maior estabilidade térmica residual obtida para a enzima endoglucanase produzida pelo fungo *Penicillium simplicissimum* foi de 69,4 %, após incubação em temperatura de 50 °C por 30 minutos. Quanto à avaliação de estabilidade frente ao pH, estas endoglucanases, apresentaram 95,2 e 52,3 % de atividade residual após 1 hora de incubação em pH 5,0 e 3,0, respectivamente (KAPP et al., 2016) Estes resultados mostram que, ainda que a um menor tempo de incubação, a β -glicosidase produzida por *Botryosphaeria* sp AM01 apresenta maior termotolerância se comparada com as citadas. Portanto, suas características não deixam de ser interessantes para aplicação biotecnológica. A endoglucanase produzida por *Botryosphaeria* sp. AM01 apresenta menor termotolerância se comparada àquela produzida por *Monascus purpureus*, e maior termotolerância se comparada à produzida por *Penicillium simplicissimum*. Em pH 5, as enzimas de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Penicillium simplicissimum* apresentaram comportamentos semelhantes, em um mesmo período de incubação.

5.6.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase

Realizaram-se dois testes, visando obter conhecimento sobre o efeito da glicose e do etanol sobre a atividade de β -glicosidase presente no extrato selecionado, uma vez que a seleção do mesmo foi baseada na maior quantidade desta enzima. Os resultados obtidos foram plotados em forma de atividade relativa, onde 100% corresponde à atividade da enzima sob as condições ótimas, definidas no tópico 3.5.1, e podem ser visualizados na Figura 19.

Figura 19 - Efeito da glicose (A) e do etanol (B) sobre a atividade da enzima β -glicosidase presente no extrato obtido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 em meio 2, a 254rpm, 28°C, por 144h. *100% = 24,51 U/mL para β -glicosidase.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que a presença de glicose inibe a atividade enzimática de β -glicosidase proporcionalmente à medida que seu fornecimento é aumentado. Porém, mesmo com a máxima quantidade de glicose fornecida, a atividade relativa mostrou-se mediana (64 %) (Figura 19A).

Em relação à influência do etanol (Figura 19B), nota-se que, na presença de 5 e 10% deste álcool ocorrem aumentos para 104 e 105 %, respectivamente, na atividade enzimática. Com o aumento na porcentagem de etanol, a atividade enzimática diminui. Porém, com 20% de etanol no meio, a atividade de β -glicosidase mantém-se em 73%.

A glicose, sendo produto final da ação das β -glicosidases, pode inibir a atividade dessas enzimas pelo processo bioquímico definido como inibição. Isso

pode justificar a redução na atividade em concentrações crescentes deste açúcar (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

O aumento da atividade observado em baixas concentrações de etanol (5 e 10 %) pode ser atribuído à atuação da β -glicosidase como uma β -glicosiltransferase. O etanol pode aumentar as taxas de reação atuando como acceptor preferencial dos resíduos glicosil durante a ação enzimática, substituindo a água na reação e dando origem a outro glicosídeo, com o etil-glicosídeo. A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, sendo diferentes apenas pelo tipo de acceptor final, que pode ser, respectivamente, água ou outra molécula, tendo em vista que alcoóis (etanol ou metanol) parecem apresentar melhor associação ao sítio ativo dessas enzimas do que a água (LUCAS et al., 2000; BHATIA et al 2002; KURASHIMA et al. 2003). Em contrapartida, a redução da atividade enzimática conforme o aumento da taxa de etanol está relacionado, provavelmente, à desnaturação ou a modificações conformacionais da enzima, como consequência da alteração da polaridade do meio (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

β -glicosidases produzidas por *Monascus purpureus* tiveram sua atividade reduzida em 58% na presença de 10 mm de glicose (DAROIT, 2007). Belancic e colaboradores (2003) observaram a atividade de β -glicosidases produzidas por *Debaryomyces varinjitae* na presença de 5 e 10 mm de glicose, e tiveram como resposta o mantimento de 98% e 86% da atividade enzimática. Comparando com o observado no presente trabalho, onde a presença de 4 mm e 10 mm de glicose resultaram em 86% e 71% de atividade, temos que β -glicosidases produzidas por *Botryosphaeria* sp AM01 em condições ótimas são inibidas em maior porcentagem.

O estudo da inibição de β -glicosidases por alcoóis é interessante, pois estas enzimas podem ser expostas a quantidades consideráveis dessas substâncias durante aplicações biotecnológicas (SUN e CHENG, 2002). Daroit (2007) observou que concentrações de etanol entre 5 e 10 mmol/L estimularam a atividade enzimática, tendo alcançado atividade relativa de 105 % na presença de 10 mmol/L de etanol (100% = atividade máxima observada sem adição de alcoóis). Estes dados são semelhantes aos observados para a atividade de β -glicosidase de *Botryosphaeria* sp. AM01, a qual também aumentou na presença de etanol.

5.7 Sacarificação enzimática das palhas de cana-de-açúcar pré-tratadas.

A solução enzimática obtida pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 sob a melhor condição para a produção de β -glicosidase (item 5.5.2) foi utilizada nos experimentos de sacarificação das palhas de cana pré-tratadas e as quantidades de glicose e xilose foram determinadas nos hidrolisados (Tabela 21). As condições de sacarificação foram: carga de palha de 5 % (p/v), sob 50 °C, a 250 rpm, por 24 horas. As cargas enzimáticas empregadas nos ensaios foram 88, 324, 21,8 e 4,02 U totais para endoglucanase, β -glicosidase, exoglucanase e FPase, respectivamente.

Tabela 21 - Sacarificação das palhas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes pré-tratamentos utilizando-se o extrato enzimático obtido pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01, por fermentação submersa, em meio 2, sob a melhor condição de cultivo definida para a produção de β -glicosidase (cargas de substrato e inóculo a 6,0 % e 6 discos miceliais, respectivamente, sob agitação de 254 rpm). Os ensaios foram conduzidos com carga de substrato (palha pré-tratada) a 5,0 % (p/v), sob 50 °C e 250 rpm, por 24h.

| Pré-tratamento | Açúcares (mg/mL) | | |
|-----------------------|------------------|--------|------|
| | Glicose | Xilose | Soma |
| Hidrotérmico | 2,66 | 2,5 | 5,16 |
| Ácido-Alcalino | 3,29 | 0,27 | 3,56 |
| Alcalino | 1,17 | 0,61 | 1,78 |
| Ácido | 0,13 | 0,18 | 0,31 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior liberação de glicose foi observada quando utilizou-se a palha submetida a pré-tratamento ácido seguido de alcalino. Porém, a sacarificação da palha submetida a pré-tratamento hidrotérmico sem adição de químicos, proporcionou maior liberação dos açúcares glicose e xilose, se somados. Cabe aqui ressaltar que, quando é realizado o pré-tratamento ácido, ocorre a extração das pentoses, restando a fração sólida correspondente a lignina e celulose, podendo justificar o resultado obtido.

Marques (2017) empregou o extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM01 obtido por fermentação em estado sólido, em condições otimizadas para a produção de endoglucanase, na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino. Sob condições de sacarificação não otimizadas (5% p/v de carga de bagaço, 200 rpm, a 50 °C, por 24 horas, 142,1 U totais de

endoglucanase e 346,8 U totais de β -glicosidase), a concentração de glicose obtida no hidrolisado foi de 2,74 mg/mL. Estes resultados mostram que os extratos enzimáticos de *Botryosphaeria* sp. AM01, produzidos sob diferentes condições, empregados na sacarificação de diferentes biomassas, sendo estas submetidas a tipos de pré-tratamentos distintos, podem proporcionar obtenção de concentrações de glicose próximas. A seguir, sob condições ótimas de sacarificação (carga de bagaço a 18,82% p/v, carga de enzima de 410,71 U totais de endoglucanase, 280 rpm, 50 °C, e 24h) a autora obteve concentrações de 8,05 e 9,48 mg/mL de glicose e xilose, respectivamente. Tais dados sugerem que as concentrações de glicose e xilose obtidas no presente trabalho podem ser melhoradas se forem empregados planejamentos experimentais para otimização das variáveis temperatura, agitação, tempo, carga de palha, e carga de enzima, na sacarificação enzimática.

Lucarini et al. (2017) estudaram a sacarificação enzimática da palha de cana de açúcar submetida a deslignificação alcalina, para a obtenção de açúcares fermentescíveis empregando duas celulases, uma purificada de *T. reesei* (0,96 FPU/mL) e uma comercial, a Cellic® CTec2 produzida pela Novozymes (0,46 FPU/mL). Após seleção dos melhores níveis das variáveis pH, concentração de enzima e tempo de sacarificação, os ensaios foram realizados em frascos de 250 mL, contendo 5g de palha, a quantidade de enzima necessária para a carga enzimática desejada (10 FPU por grama de palha), 100 mL de tampão citrato 50 mmol/L, e foram levados a incubador rotativo por 24 horas, a 45 °C e 150 rpm. As quantidades de glicose obtidas foram de 3,27 e 2,75 mg/mL quando utilizaram-se as celulases de *T. reesei* e Cellic® CTec2, respectivamente. Segundo os autores, a Cellic® CTec2 é um biocatalisador concentrado, que contém um complexo de enzimas formulado para melhorar o seu desempenho e reduzir a dosagem requerida para a conversão da celulose em glicose. Devido ao elevado teor de β -glicosidase, enzima que permite a conversão final da celobiose em glicose, o produto proporciona melhor desempenho ao hidrolisar substratos lignocelulósicos pré-tratados com maiores quantidades de sólidos totais. Tendo em vista que neste estudo foi empregada uma carga de FPase 3,1 vezes maior do que a empregada nos experimentos de sacarificação do presente trabalho, e que, ainda assim, foram obtidas aqui concentrações de glicose praticamente iguais (apesar de os pré-tratamentos aos quais foram submetidas as palhas que proporcionaram esses resultados serem distintos) é possível inferir que o extrato enzimático de

Botryosphaeria sp. AM01 seja mais eficiente do que as enzimas utilizadas pelos autores, na sacarificação deste tipo de resíduo.

Pereira (2013) realizou um estudo sobre a sacarificação de diferentes tipos de biomassas, incluindo o bagaço de cana de açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico. A sacarificação deste resíduo foi realizada por um complexo de celulases liofilizado, Powercell®, empregando-se carga de 20 FPU por grama de bagaço. Os ensaios foram realizados a 60 °C, sob agitação de 150 rpm. Em 24 horas, foram obtidas concentrações de 11,71 e 1,63 mg/mL de glicose e xilose, respectivamente, no hidrolisado. Uma vez que, neste estudo, foi empregada uma carga de FPAse 5 vezes maior do que a utilizada no presente trabalho, é possível inferir que o extrato de *Botryosphaeria* sp. AM01 tem melhor potencial para obtenção de maiores concentrações de glicose e xilose quando empregado na sacarificação de palha de cana submetida ao pré-tratamento hidrotérmico do que o complexo enzimático Powercell® quando empregado na hidrólise do bagaço de cana submetido ao mesmo tipo de pré-tratamento. Trata-se de um dado interessante, já que complexos enzimáticos microbianos comerciais são conhecidos por serem mais eficientes do que enzimas não comerciais produzidas por novas linhagens, além de reafirmar o que a literatura vem apresentando sobre a palha apresentar potencial equivalente ou superior ao bagaço para obtenção de açúcares utilizados na produção de etanol de segunda geração (SANTOS et al., 2012; FREITAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; MOUTTA et al., 2014; LUCARINI et al., 2017).

Pelo exposto, conclui-se que as celulases produzidas pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 apresentaram eficiência de sacarificação semelhante, ou até mesmo maior, do que de as celulases citadas acima, tanto as comerciais quanto as purificadas produzidas por fungos filamentosos amplamente estudados e destacados pela literatura como melhores produtores de celulases. Além disso, o emprego do extrato enzimático aqui produzido resultou em maiores concentrações de açúcares redutores a partir da palha de cana submetida ao pré-tratamento hidrotérmico sem a adição de químicos, o que é benéfico em termos econômicos e ambientais.

6 CONCLUSÕES

A pesquisa realizada é de grande importância, pois não há relatos na literatura sobre a produção de celulases pelos fungos *Saccharicola* sp. EJC04 e *Botryosphaeria* sp. AM01 em fermentação submersa.

A realização de triagens iniciais para seleção do melhor substrato para a produção das enzimas, bem como para a avaliação da influência de condições como agitação e tempo de cultivo foram importantes para obtenção de melhores resultados em termos de atividades enzimáticas.

O emprego destes fungos endofíticos na produção de celulases por fermentação submersa empregando-se a ferramenta de planejamentos experimentais proporcionou aumento satisfatório nas atividades de β -glicosidases a partir do estudo das variáveis carga de substrato, carga de inóculo e velocidade de agitação, tanto para o co-cultivo quanto para os cultivos isolados dos fungos.

O fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 produziu um extrato enzimático cujas atividades celulolíticas foram notavelmente maiores tendo materiais lignocelulósicos como fonte de carbono, se comparado ao extrato produzido quando celulose comercial foi utilizada como substrato. Cabe ressaltar que a atividade de β -glicosidase foi 57 vezes superior quando o fungo foi cultivado em substrato lignocelulósico, o que é interessante em relação aos custos da produção enzimática.

As celulases produzidas por *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições ideais, apresentaram características físico-químicas que são adequadas à aplicação em processos biotecnológicos envolvendo a de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Além disso, a utilização das enzimas na sacarificação de palhas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes pré-tratamentos levou à obtenção de quantidades de glicose e xilose comparáveis às citadas na literatura, considerando-se que o processo não foi otimizado.

Dado o exposto, os resultados do presente trabalho, além de contribuírem como Pesquisa Básica com dados sobre celulases de gêneros pouco estudados, estimulam estudos posteriores sobre a otimização das condições de hidrólise enzimática das palhas de cana pré-tratadas empregando-se o extrato enzimático produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01 em fermentação submersa, sob condições ideais, visando a obtenção de maiores concentrações de açúcares fermentescíveis.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 1–28, 2013.
- ADSUL, M. G., GHULE, J.E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B., GOKHALE, D.V., VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, p. 67–72, 2004.
- AGBOR, V. B.; CICEK N.; SPARLING R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, Dec. 2011.
- AGOSTINHO, F. et al. Influence of cellulase enzyme production on the energetic-environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**, v. 315, p. 46–56, Aug. 2015.
- ALBANO, M. **Comparação da produção de celulasas e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 64 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANGARITA-MARTÍNEZ, J. D. **Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática da Palha de Cana-de-Açúcar Pré-tratada Hidrotermicamente**. 2014. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2014.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, mar. 2014.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 1-36, 2001.
- BAE S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, n. 5, p. 1366-71, Oct. 2004.
- BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **J. Exp. Bot.**, v. 60, p. 3279–3295, 2009.

- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Convers. Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, Feb. 2012.
- BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Bioscience**, v. 31, n. 5, p. 645-650, dec. 2006.
- BARAKAT, A.; VRIES, H. DE.; ROUAU, X. Dry fractionation as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review, **Bioresour. Technol.**, v. 134, p. 362–373, 2013.
- BARROS et al. Produção de celulases pelo fungo FSDE3 em cultivo semissólido utilizando resíduos da cana-de-açúcar. **Revista saúde e ciência on line**, v. 3, n. 3, p. 164-173, dez. 2014.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016.
- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p.1453-1459, feb. 2003.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J. Effect of different pretreatment of sugar cane bagasse on cellulase and xylanases production by the mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 grown in submerged culture. *BioMed Research International*, v. 2014, 9 pp., may-2014.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225–226, 1939.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- CASTRO, A. M.; ALBUQUERQUE DE CARVALHO, M. L.; LEITE, S.G.; PEREIRA JR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, n. 2, p. 151-158, feb. 2010.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

CUNHA, F. M.; KREKE, T.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 249-252, 2014.

DARAH, I.; IBRAHIM, C.O. Effect of agitation on lignin-degrading enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown in shake-flask cultures. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 4, p.174-182, 1996.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma β -glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

DIAS, M. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C. V.; MACIEL, M. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206–1216, 2009.

DUSSÁN, K.J., SILVA, D.D.V., MORAES, E.J.C., ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. **Chem Engineer. Trans.**, v. 38, p. 433-438, 2014.

DUTTA, T.; SAHOO R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 275-282, 2008.

ELLILÄ, S. et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 30, feb. 2017.

ERIKSSON, K-E. L.; BERMEK, H. Lignin, lignocellulose, ligninase. **Appl. Microbiol. Ind.**, p. 373–84, 2009.

FANG, H., ZHAO, C., SONG, X.Y., Otimization of enzymatic hydrolysis of steam exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* 72 NL02. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4111- 4119, 2010.

FARINAS, C. S. et al. **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008.

FARINAS, C. S. et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. de M. et al. **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. 1ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 211-241, 2014.

FLORENCIO, C. et al. Caracterização de endoglucanases produzidas pela linhagem *Trichoderma reesei* Rut C30 pelos processos de fermentação submersa e combinada. **Anais da V jornada científica – EMBRAPA São Carlos, São Carlos, 2013**.

FLORENCIO, C. et al. Secretome data from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated in submerged and sequential fermentation methods. **Data in brief**, v. 8, p. 588-598, may-2016.

FREITAS, A. S. et al. Viabilidade de utilização da palha de cana-de-açúcar na produção de etanol. **Anais do XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba, 2017.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. **Proc. Biochem.**, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

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

GHOSH, P.; GHOSE, T. K. In: **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, series editor: SCHEPER, T. New York: Springer, v. 85, 2003.

GOMATHI, D. et al. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. s67-s73, jan. 2012.

GOMES, E. et al. In: LEMOS, ELIANA G. M., STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo - SP: [s.n.], p. 271, Cap. 10, 2012.

GORI, M. I.; MALANA, M. A. Production of Carboxymethyl Cellulase from Local Isolate of *Aspergillus* Species. **Pakistan journal of life and social Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2010.

HAMES, B. et al. **Preparation of samples for compositional analysis**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical report NREL/TP-510-42620. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42620.pdf>> Acesso em: 16 jun. 2018.

HAMID, S. B. A.; ISLAM, M. M.; DAS, R. Cellulase biocatalysis : key influencing factors and mode of action. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2157–2182, 2015.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 162-168, 2011.

HOOD, E. E. et al. **Subcellular** targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. 709–719, 2007.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163–173, 2008.

ISIKGOR, F. H., BECER C. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, p. 4497-4559, 2015.

KAPP et al. Curva de Produção e Caracterização de Atividade Residual de Endoglucanase produzida por *Penicillium simplicissimum* frente a pH e Temperatura. **Rev. Ciên. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 37, Agosto 2016.

KLOCK, U; ANDRADE, A. S. **Química da madeira**. 3ª Ed. Revisada. Curitiba, 2005.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, volume 2011, p. 0-10, 2011.

KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201–208, 2012.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnol. Prog.**, v. 25, p. 302–314, 2009.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF). **Food Sci. Biotechnol.**, v. 20, n. 5, p. 1289-1298, 2011.

KURASHIMA, K. et al. Enzymatic beta-glycosidation of primary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 87-98, 2003.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude - glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LIMA, V. M. G. et al. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p.105-110, 2003.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. **Progress in Energy & Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 259-262, feb-2004.

LIU, S. H.; LIU, X. F. Technological development of non-grain based fuel ethanol production. **Liquor Making**, v. 37, 2010.

LONSANE, B.K., et al., Engineering aspects of solid-state fermentation, **Enzyme Microb. Technol.**, v. 7, p. 258–265, 1985.

LUCA, R. C. **Otimização da produção de pectinases e de β - glicosidase do fungo *Annulohyphoxylon stygium* DR47 em resíduos agroindustriais.** Trabalho de conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Engenharia de Alimentos. 2018.

LUCARINI, A. C., et al. Estudo da hidrólise enzimática da palha da cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, v. 03, n. 2, p. 242–253, 2017.

LUCAS, R. et al. β -glucosidase from *Chalara paradoxa* CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3698-3703, 2000.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir do melão de soja.** 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 1999.

MARQUES, N. P. **Produção de Celulases por fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IQAr, Araraquara, 2017.

MARQUES, N. P. **Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IQAr, Araraquara, 2013.

MATKAR, K. et al. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 24 – 33, 2013.

MELLO, G. F. et al. **Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol celulósico**, em: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UFSCar – São Carlos – SP, 16 a 19 de Julho de 2017.

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

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062–1071, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MOUTTA, R. D. O. et al. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93-100, 2014.

NARRA, M. et al. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 150–161, 2014.

OGEDA, T. L. **Hidrólise enzimática de celuloses pré-tratadas**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 110 p., 2011.

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

OLIVEIRA, F. M. V. et al. 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.

OLIVEIRA, L. R. M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw, **Ind. Crops. Prod.**, v. 58, p. 1-7, jul-2014.

OLIVEIRA, M. U. et al. Uso de sub-produtos agrícolas para produção de endoglucanases por *Penicillium* sp. 17-5. **Anais do XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC**, Caxias do Sul-RS, 2016.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular Técnica 04 EMBRAPA**, Brasília-DF, p. 1-6, 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17–24, aug-2000.

PANDEY, A. et al. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. San Diego: Academic Press Publisher, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Elsevier, 886 pp., set-2016.

PANT, A. et al. β - Caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol**, v. 57, p. 81– 95, 2014.

PAPAGIANNI, M. et al. Submerged and Solid-State Phytase Fermentation by *Aspergillus niger*. Effects of Agitation and Medium Viscosity on Phytase Production, Fungal Morphology and Inoculum Performance. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 319-326, 2001.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PEREIRA JUNIOR, N. Biorrefinarias – Rota Bioquímica. In: MELO, L.C.P. **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE, p. 19-76, 2010.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade federal de Goiás. Goiânia, 2014.

PEREIRA, D. G. S. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFV – Viçosa, 2013.

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

PEREIRA, J. C. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PORCEL, E. M. R. et al. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 139-144, 2005.

RAMANATHAN, G., et al. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. **Journal of scientific & industrial research**, vol. 69, pp. 454-459, June-2010

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

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **J. Exp. Bot.**, v. 59, n. 5, p. 1109–1114, feb-2008.

ROMERO, M. D. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n 3–5, p. 244-250, Aug-1999.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841–845, 2008.

SAHA, B. C. Enzymes as Biocatalysts for Conversion of Lignocellulosic Biomass to Fermentable Sugars, in **Handbook of Industrial Biocatalysis**, ed. C. T. Hou, CRC Press, 2005.

SAHA, B. C. et al. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367-372, 2013.

SAJITH, S. et al. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 6 p. 461, 2016.

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

SANTOS, F. A. et al. Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, L. V. et. al. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 40-57, 2016.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SERRA, S. A. et al. Seleção de meio de cultivo para produção de celulases por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa e comparação entre linhagens mutantes e parental. **Anais do II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia**. Brasília-DF, 2015.

SHARMA, A. et al. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 1346-1380, 2016.

SHARMA, A. et al. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 8, 2016.

SILVA, A. S. A. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production, in: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, Dr. Anuj Chandel (ed). INTECH, 2013.

SILVA, A. S. **Avaliação da produção de celulases e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia**. 2014. 105f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

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

SINGHANIA, R. R.; SAINI, J. K.; SAINI, R.; ADSUL, M.; MATHUR, A.; GUPTA, R.; TULI, D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 490-495, 2014.

SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in Biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>>.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/7153/8124eba6d60c5c6140128866f3dfef10a7ed.pdf>>.

SLUITER, A. et al. **Determination of Sugars , Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>>.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 491–502, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, vol. 83, n. 1, pp. 1–11, 2002.

- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 1621–1651, 2008.
- TANASOVA, M.; STURLA, S. J. Chemistry and biology of acylfulvenes: sesquiterpene-derived antitumor agents. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 6, p. 3578–3610, 2012.
- TANYILDIZI, M.S., et al. Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2291-2296, 2005.
- TÉLLEZ-LUIS, S.J., RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Mathematical modelling of hemi-cellulosic sugar production from sorghum straw. **J Food Eng**, v. 52(3), p. 285-291, 2002.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- VAIDYANATHAN, S. et al. Monitoring of submerged bioprocesses. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 19, p. 277–316, 1999.
- VILELA, E. D. de SOUZA. **Análise da produção de celulases e β -glicosidasas produzidas por *Streptomyces sp.*** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2013.
- WAGHMARE, P. R.; KADAM, A. A.; SARATALE, G. D.; GOVINDWAR, S. P. Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 136-141, 2014.
- WOOD, T. M. Fungal cellulases I and II Classification of cellulase components. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, 1980.
- YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421–450, 2011.
- YANG, B.; WYMAN, C. Pre-treatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26-40, 2008.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 753-771, 2006.
- ZHANG, N. et al. Biological materials by design cellulose-hemicellulose interaction in wood secondary cell-wall. **Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering**, v. 23, n. 8, 2015.
- ZHOU, C. H. et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 5588–5617, 2011.
- ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 578-582, 2009.

ZIMBARDI, A. L. R. L. **Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica.** Tese (Doutorado em Química). FFCLR-USP- Ribeirão Preto, 2014.