

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FÁRMACIA

VERÔNICA DE SOUZA MIRANDA PACHECO

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS

Belo Horizonte

2016

VERÔNICA DE SOUZA MIRANDA PACHECO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para à obtenção do grau de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador (a): Prof(a) Dr(a) Evelyn de Souza Oliveira Lopes

Coorientador (a): Prof(a) Dr(a) Inayara Cristina Alves Lacerda

Colaborador (a): Prof(a) Dr(a) Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2016

VERÔNICA DE SOUZA MIRANDA PACHECO

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES
DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30 DE JUNHO DE 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Evelyn de S. L. Lopes
Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES
Orientadora e Presidente da Comissão

Inayara C. Lacerda
Profa. Dra. INAYARA CRISTINA ALVES LACERDA
Coorientadora

Raquel Bello de Araújo
Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAÚJO

Denise Sande Santos
Profa. Dra. DENISE SANDE SANTOS

Pacheco, Verônica de Souza Miranda.

P116i Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de celulasas a partir de resíduos agroindustriais / Verônica de Souza Miranda Pacheco. – 2016.

93 f. : il.

Orientadora: Evelyn de Souza Oliveira Lopes.

Co-orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.

Colaboradora: Vera Lúcia dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Enzimas – Aplicações Industriais – Teses. 2. Enzimas celulolíticas – Teses. 3. Celulasas – Teses. 4. Fungos filamentosos – Seleção – Teses. 5. Atividade celulolítica total (FPase) – Teses. 6. Agroindústria – Subprodutos – Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. II. Lacerda, Inayara Cristina Alves. III. Santos, Vera Lúcia dos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 660.62

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma se fizeram presentes e contribuíram em minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço meus pais (Maria Cândida e Delcio) e irmã Marcélia pelo apoio.

Agradeço meu pai por incontáveis vezes buscar-me na UFMG depois de um dia muito exaustivo. Agradeço minha mãe sempre preocupada em preparar meus lanchinhos para tornar meu dia mais agradável. Agradeço minha irmã por sempre escutar meus desabafos (muitos áudios no *whats app*).

Agradeço meu cunhado Daniel de Melo pelos inúmeros favores ao longo dessa etapa.

Agradeço meu amigo Roberto Carlos por acreditar que sou capaz.

Agradeço minhas amigas, Patrícia Silvério, Camila Suanine, Nayara Rosa e Thais Cristina, não somente por escutarem minhas angústias, mas também pelas palavras de carinho.

Agradeço minha querida estagiária Talyde Moraes e minha querida estagiária emprestada de coração Juliele Barbosa. Ambas sempre muito prestativas, pensamento positivo e corações gigantescos. Não consigo traduzir em palavras minha gratidão.

Agradeço Bárbara Oliveira pelas risadas em nossos momentos de desespero também pelo apoio e carinho.

Agradeço Elaine Costa por ensinar-me com carinho vários truques do laboratório e de meu experimento, também agradeço nossos lanchinhos com desabafos.

Agradeço Beatriz pelos conselhos, pensamento positivo e bom coração presenteando-me com reagentes e meios de cultura.

Agradeço Murielle Morais pelo exemplo de dedicação e por sempre nos pequenos gestos de maneira doce e suave sugerir-me ajustes na minha forma de trabalho.

Agradeço Fernanda Penido por sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas e ajudar nas traduções.

Agradeço Marcus Vinicius Dias-Souza, Luiz Fernando de Freitas Júnior e Ana Cristina pelas gentilezas durante minha rotina no laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradeço a técnica Ana do laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise do departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais pelas dicas e conversas.

Agradeço o professor Dr. Gecernir Colen, pela colaboração, pelos valiosos ensinamentos.

Agradeço professora Dra. Vera Lúcia dos Santos por todas os ensinamentos e palavras de conforto que devolveram meu sono. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Agradeço professora Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda por não ter dúvidas da minha dedicação.

Agradeço professora Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes pela orientação.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo e Dra. Denise Sande, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradeço ao CAPES pela bolsa concedida

*“Brindo a casa,
Brindo à vida,
Meus amores,
Minha família”.*

(Marcelo Falcão. O Rappa).

RESUMO

As celulasas correspondem às enzimas com a terceira maior aplicação industrial do mundo. São amplamente utilizadas nas indústrias têxtil, de papel e celulose, extração de sucos, detergentes, nutrição animal e bioetanol. A produção de enzimas utilizando microrganismos é preferencial devido à diversidade bioquímica e facilidade de manipulação celular. Os fungos filamentosos possuem grande potencial para secretar enzimas e são entre os microrganismos os maiores produtores de celulasas. O objetivo desse estudo foi isolar e selecionar fungos filamentosos, de resíduos agroindustriais, com potencial atividade celulolítica. Os fungos filamentosos foram isolados dos resíduos agroindustriais: bagaço de cana de açúcar, casca de amendoim e casca de coco seco. Foram isolados 28 fungos filamentosos desses resíduos e selecionados sete potencialmente produtores de enzimas celulolíticas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Curvalaria* sp. Os ensaios qualitativos de produção de celulase foram realizados em placas de Petri contendo ágar carboximetilcelulose (CMC) e foi calculado o Índice enzimático (IE). Os sete fungos filamentosos que apresentaram resultado positivo no ensaio qualitativo foram cultivados em meio líquido contendo celulose microcristalina. No caldo fermentado (preparado bruto enzimático) foi avaliada a produção de celulasas pelo teste de difusão em placas com gel e determinada a atividade celulolítica total FPase (*Filter Paper Cellulase*). Os fungos filamentosos que formaram halos claros, no ensaio qualitativo de difusão em gel em placa de Petri, foram submetidos ao microcultivo para a identificação convencional dos gêneros. Os IE variaram entre 1,92 e 8,54. Todos os fungos filamentosos que apresentaram IE maior do que 1 (um) apresentaram atividade celulolítica total no ensaio quantitativo. Os valores de FPase variaram entre 0,01299 FPU.mL⁻¹ (*Penicillium* sp. BM9 com 48h de fermentação) e 0,05013 FPU.mL⁻¹ (*Aspergillus* sp. CO2 com 72h de fermentação) e os valores de atividade específica variaram entre 0,04755 FPU.mg⁻¹ de proteína total (*Aspergillus* sp. CO2 com 24h de fermentação) e 0,56407 FPU.mg⁻¹ de proteína total (BM18 com 72h de fermentação). Estes resultados confrontados com a literatura mostraram-se promissores. Existe potencial para obtenção com esses fungos, de atividade celulolítica superior

aos valores encontrados, para isso são necessários estudos de otimização da produção. Estudos futuros investigando a a atividade de endoglucanases e β -glicosidases também são necessários para avaliar o sinergismo entre essas enzimas, já que os fungos produzem diferentes quantidades de enzimas do complexo celulolítico.

Palavras-chave: celulases, seleção de fungos filamentosos, atividade celulolítica total, FPase.

ABSTRACT

Cellulases are the third largest industrial enzymes worldwide. These enzymes are applied in various industries such as textile, pulp and paper, juice extraction, detergents, animal feed and bioethanol production. Enzymes produced by microorganisms are preferred due to their biochemical diversity and ease of genetic manipulation. Filamentous fungi have shown their great potential for secreting enzymes. The present work aimed to isolate and select filamentous fungi from agroindustrial residues with potential cellulolytic activity. The filamentous fungi were isolated from the following agroindustrial residues: sugarcane bagasse, peanut shell and coconut shell, and selected in Petri dishes containing carboxymethylcellulose (CMC) agar according to their Enzymatic Index (EI). The obtainment of crude enzymatic preparation to quantify the total cellulolytic activity (FPase) occurred under submerged fermentation by filamentous fungi. The FPase quantitative assay was performed using 3,5-dinitrosalicylic acid on a microplate reader with absorbance at 540 nm. The specific activity of crude enzymatic preparations was also quantified. The filamentous fungi that formed light halos around the wells in the gel diffusion assay were submitted to the microculture for conventional identification of genera. Twenty-eight filamentous fungi were isolated. Among these, seven filamentous fungi potentially producers of cellulolytic enzymes, which belonged to the genus *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Curvalaria* sp., were selected. EI ranged from 1.92 to 8.54. All filamentous fungi that presented EI greater than 1 (one) produced crude enzymatic preparation with total cellulolytic activity also evidenced in the qualitative gel diffusion assay. FPase values varied between 0.01299 filter paper units per milliliter (FPU.mL⁻¹) (*Penicillium* sp. BM9 with 48 h of fermentation) and 0.05013 FPU.mL⁻¹ (*Aspergillus* sp. CO₂ with 72 h of fermentation) and the values of specific activity ranged from 0.04755 FPU.mg⁻¹ of protein (*Aspergillus* sp. CO₂ with 24 h fermentation) and 0.56407 FPU.mg⁻¹ protein (BM18 with 72 h of fermentation). These results were promising when compared with the results of literature. There is potential for the obtainment of values of cellulolytic activity higher than the values found in the present study, so further studies of production optimization are required. Future studies investigating endoglucanases and β -glycosidases are needed to evaluate

synergism because fungi produce different amounts of enzymes of the cellulolytic complex.

Keywords: cellulolytic enzymes, cellulases, selection of filamentous fungi, total cellulolytic activity, FPase.

LISTA DE ABREVIATÓES

DC – Domínio catalítico
DCL – Domínio de ligação ao substrato
RL – Região de ligação
MLC – Módulo de ligação ao carboidrato
EG - Endoglucanase
CBH - celobiohidrolase
BG - β -glicosidases ou celobiase
EC – Exoglucanase
CMC- Carboximetilcelulose
BDA – Batata Dextrose Ágar
IE – Índice enzimático de atividade
DNS - ácido 3,5 dinitrosalicílico
FPU – Unidade internacional enzimas celulolíticas totais
BSA – Bovine serum albumin
AE - Atividade específica
ANOVA – Análise de variância
DNA - Desoxyribunucleic acid
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
SDS - Sodium dodecyl sulfate
PCR - Polymerase Chain Reaction
TBE - Tris/Borate/EDTA,
ITS - Internal Transcribed Spacer
DMSO - Dimetilsulfóxido
UI – Unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração de moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, mostrando a unidade de repetição celobiose e terminal redutor e não redutor.	27
FIGURA 2 - Ilustração da estrutura da celulose evidenciando região cristalina e região amorfa	27
FIGURA 3 – Ilustração da estrutura das enzimas celulolíticas dividida em três regiões: domínio catalítico (DC), domínio de ligação ao substrato (DLS), região de ligação (RL) e módulo de ligação a carboidratos (MLC)	29
FIGURA 4 - Ilustração do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da estrutura da celulose.....	33
FIGURA 5 – Ilustração do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e celobiases na degradação da estrutura da celulose.	34
FIGURA 6 - Fluxograma da metodologia de isolamento e seleção de fungos filamentosos com potencial celulolítico	51
FIGURA 7 – Isolamento de fungos filamentosos – Ilustração das diluições seriadas.....	54
FIGURA 8 – Purificação dos fungos filamentosos – Fotografias de cultura mista e cultura pura	54
FIGURA 9 - Conservação de fungos filamentosos.....	55
FIGURA 10 – Inóculo de forma pontual de cultura pura de fungo filamentoso, isolado de bagaço de cana de açúcar em meio de cultura CMC.	56
FIGURA 11 - Técnica de difusão em gel – Fotografia de inoculação de preparado bruto enzimático em poços de placa de Petri contendo ágar bacteriológico 2% e carboximetilcelulose 1%.....	60
FIGURA 12 - Fotografia de placa de Petri de microcultivo (técnica de Ridell) .	65

FIGURA 13 - Porcentagem de fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais.....	67
FIGURA 14 - Seleção primária dos fungos filamentosos potencialmente produtores de celulasas	68
FIGURA 16 – Quantidade de fungos filamentosos com potencial celulolítico na seleção primária.....	68
FIGURA 17 – A) Crescimento espalhado de fungo filamentoso dificultando a visualização de halos em ágar sem sais biliares B) Halos claros ao redor da colônia (resultados positivos) em meio de cultura ágar CMC 1% acrescido 0,2% de sais biliares de após 7 dias de incubação a 30°C seguido de revelação com solução iodo	70
FIGURA 18 - Resultado de índice enzimático (IE) dos fungos filamentosos, potencialmente produtores de enzimas com atividade celulolítica total, isolados de resíduos agroindustriais: casca de coco, casca de amendoim e bagaço de cana de açúcar moído seco.	70
FIGURA 19 - Formação de halos claros em torno dos poços pela técnica de difusão em gel, após revelação com iodo.	73
FIGURA 20 - Fotografias dos fungos filamentosos selecionados evidenciando as características morfológicas macroscópicas das colônias.	74
FIGURA 21- Atividade celulolítica total (FPU.mL ⁻¹) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação.	77
Figura 22 - Atividade específica (FPU.mg ⁻¹ de proteína) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 9 - Atividade celulolítica total (FPU.mL⁻¹) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa -----

Erro! Indicador não definido.96

TABELA 10 - Valores de proteína total (mg.mL⁻¹) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa -----

Erro! Indicador não definido.

TABELA 11 - Aividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.-----

Erro! Indicador não definido.

TABELA 12 - Atividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa - 99

TABELA 13- Atividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.----- 100

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Celulases comerciais microbianas produzidas por diferentes empresas -----	38
QUADRO 3 - Denominação das amostras -----	53
QUADRO 4 Meio de cultura ágar CMC 1% -----	55
QUADRO 5 Meio de cultura basal -----	56
QUADRO 6 - Meio de cultivo utilizando a técnica de difusão em gel -----	59
QUADRO 7 - Resultado dos ensaios de difusão em gel dos preparados brutos enzimáticos obtidos com os isolados produtores de celulases em diferentes tempo de fermentação. -----	72
QUADRO 8 - Identificação convencional de fungos filamentosos produtores de celulases, isolados de resíduos agroindustriais. -----	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1. Histórico das celulases	25
3.2. Celulose	26
3.3. Celulases	27
3.3.1. Estrutura das celulases	28
3.3.2. Classificação das celulases	29
3.3.3. Atuação das celulases sobre a estrutura da celulose.....	29
3.3.4. Sinergismo	31
3.3.5. Influencia da temperatura, pH e íons na atividade celulolítica	34
3.4. Microrganismos produtores de celulase	35
3.4.1. Fungos filamentosos produtores de celulases.....	36
3.4.2. Microrganismos geneticamente modificados	38
3.5. Processos fermentativos para produção de celulases.....	39
3.5.1. Fermentação submersa	39
3.6. Indutores e mecanismos de repressão catabolica na produção de celulases por fungos filamentosos	40
3.7. Ensaio de quantificação de celulases	42
3.7.1. Celulose microcristalina.....	42
3.7.2. Papel filtro	43
3.7.3. Carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose	43
3.7.4. Celulose de <i>Valonia</i> sp.	44
3.7.5. Substrato cromogênio: p-nitrofenil- β -glicosídeo (pNPG)	44
3.7.6. Celobiose.....	45
3.7.7. Algodão.....	45
3.8. Aplicações industriais	45
3.8.1. Aplicação de celulases na indústria de alimentos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Fluxograma da metodologia.....	51

4.2.	Coleta das amostras.....	52
4.3.	Denominação dos fungos filamentosos isolados das amostras de resíduo agroindustrial.....	52
4.4.	Isolamento dos fungos filamentosos	53
4.5.	Purificação dos fungos filamentosos isolados.....	54
4.6.	Conservação e manutenção dos fungos filamentosos.....	54
4.7.	Ensaio qualitativo: Seleção primária em meio sólido	55
4.8.	Padronização do inóculo.....	57
4.9.	Seleção secundária.....	58
4.9.1.	Fermentação submersa	58
4.9.2.	Ensaio qualitativo: Difusão em gel.....	59
4.9.3.	Ensaio de quantificação: Determinação da atividade celulolítica total	60
4.9.3.1.	Preparo das soluções	60
4.9.3.1.1.	Reativo DNS.....	60
4.9.3.2.	Soluções estoque: metabissulfito de sódio e fenol.....	61
4.9.3.3.	Solução tampão acetato de sódio 50 mM.....	61
4.9.4.	Determinação da atividade celulolítica total (FPase)	61
4.9.5.	Curva analítica padrão de glicose	62
4.9.6.	Cálculo da atividade enzimática celulolítica total (FPase).....	62
4.10.	Dosagem de proteínas totais	63
4.10.1.	Curva analítica padrão de proteína	63
4.11.	Determinação da atividade específica (AE).....	64
4.12.	Descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias.....	64
4.13.	Identificação convencional dos fungos filamentosos por microcultivo	64
4.14.	Análises estatísticas.....	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1.	Isolamento de fungos filamentosos de resíduos agroindustriais	67
5.2.	Ensaio qualitativo: Seleção primária em meio sólido	67
5.1.	Seleção secundária em meio líquido (Fermentação submersa)	71
5.1.1.	Ensaio qualitativo: difusão de gel	72
5.2.	Descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias.	73
5.3.	Identificação convencional dos fungos filamentosos por microcultivo .	75

5.3.1. Ensaio quantitativo: Determinação da atividade celulolítica total (Fpase)	75
5.4. Ensaio quantitativo: Determinação de proteínas totais	81
5.5. Ensaio quantitativo: Determinação da atividade específica	82
6. CONCLUSÃO	85
7. PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A	95

1. INTRODUÇÃO

Resíduos agroindustriais consistem em diversos resíduos gerados na agricultura e indústria de alimentos. Os resíduos agroindustriais incluem bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, casca de coco verde, casca de cacau, palha e casca de arroz, bagaço de laranja, casca de amendoim, entre outros (PEREIRA, 2012). Deste modo, os resíduos agroindustriais são ricos em substratos lignocelulósicos que proporcionam o crescimento de uma diversidade de microrganismos, pois apresentam na sua composição compostos orgânicos e diversos nutrientes essenciais para o crescimento microbiano como fósforo, nitrogênio e potássio (ZANCHETTA, 2012). Entretanto, para que os microrganismos sejam capazes de utilizar os substratos lignocelulolíticos é necessário que os mesmos sintetizem e excretem diversas enzimas entre elas as celulases. Os microrganismos celulolíticos mais importantes são fungos e bactérias. Os fungos filamentosos apresentam maior potencial de secreção de enzimas e são os mais utilizados industrialmente (JUNIOR, 2011; PEREIRA, 2012).

Em relação ao processo industrial de produção de enzimas, as de origem microbiana apresentam maior interesse devido à possibilidade de manipulação genética, e o rápido crescimento de microrganismos via fermentação. Além disso, a obtenção de enzimas microbianas não depende de sazonalidade, como a produção de enzimas de fonte vegetal ou requerem processos complexos de separação ou purificação, como as enzimas de fonte animal (MACHADO, 2013).

Os fungos filamentosos que decompõem substâncias celulósicas crescem sob resíduos agroindustriais, colonizando o substrato lignocelulósico, produzindo enzimas para degradá-lo e assim utilizar seus nutrientes para sua sobrevivência. Eles secretam as celulases para o meio extracelular, pois são incapazes de transportar substâncias insolúveis em água, como a celulose, para o meio intracelular, caracterizando-as como enzimas extracelulares. Diferentes substratos lignocelulósicos induzem a produção de diferentes complexos enzimáticos, já que os substratos apresentam diferenças quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina (PEREIRA, 2012).

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose. Possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose. As celulasas são classificadas de acordo com a atuação no sítio de ligação. Podem ser classificadas em endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas cadeias terminais; exoglucanases, que atuam na região externa da celulose liberando celobiose e as β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Celulasas comerciais são utilizadas em diversas aplicações, incluindo indústrias têxteis e de detergentes, indústrias de polpa e papel, ração animal, produção de etanol e indústrias de alimentos (SINGHANIA et al., 2010).

O uso das celulasas pela indústria teve início na década de 80, com a aplicação na produção de ração animal e posteriormente nas indústrias alimentícias (FACCHINI, 2010; SANTOS, 2010). Na indústria de alimentos, as celulasas são principalmente, utilizadas na extração de componentes de chá verde, extração de proteínas de soja, na hidrólise de isoflavonas glicosiladas de soja, extração de óleos e aromatizantes, filtração de cerveja, maceração de polpas de frutas, clarificação de sucos de frutas, em processos de vinificação entre outras aplicações (BHAT, 2000; CASTRO 2010).

Depois das proteases e amilases, as celulasas representam a terceira enzima industrial mais comercializada em todo o mundo, devido à sua versatilidade de aplicações, sendo produzida principalmente pelos fungos filamentosos *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000). No Brasil em 2008 apenas considerando as importações e exportações as celulasas movimentaram UD\$1,35 milhões (DIAS 2012). No entanto, podem tornar-se enzimas de interesse ainda maior com a produção de etanol a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica (SANTOS, 2010).

Entretanto, o principal entrave para a aplicação abrangente das celulasas na indústria, é o alto custo de produção da enzima. A indústria e a pesquisa aplicada buscam estratégias para diminuir o custo de produção, por isso, a busca por microrganismos com altas taxas de produção de celulasas e

a utilização de processos fermentativos de menor custo são as estratégias mais utilizadas (DELATORRE, 2010; ZANCHETA, 2012). Diante do exposto justifica-se, a bioprospecção, ou seja, a busca sistemática por fungos filamentosos em resíduos agroindustriais como uma estratégia para a seleção de linhagens promissoras na produção de celulases.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar e selecionar fungos filamentosos de resíduos agroindustriais potencialmente produtores de celulasas.

2.2. Específicos

- Isolar fungos filamentosos de resíduos agroindustriais: bagaço de cana, casca de amendoim e casca de coco seca;
- Realizar seleção primária em meio sólido dos fungos filamentosos com potencial atividade celulolítica total;
- Realizar seleção secundária por fermentação submersa com os fungos filamentosos que apresentarem resultado positivo na seleção primária;
- Determinar qualitativamente e quantitativamente a atividade celulolítica total nos preparados brutos enzimáticos provenientes dos fungos filamentosos isolados;
- Determinar a atividade específica dos preparados brutos enzimáticos provenientes da fermentação submersa;
- Realizar a identificação convencional dos fungos filamentosos selecionados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico das celulases

O estudo de celulases teve início durante a Segunda Guerra Mundial. Nos acampamentos os soldados das forças armadas norte-americanas instalados nas ilhas Solomon, no Pacífico Sul observaram-se a deterioração de fardas, barracas, bolsas e outros objetos fabricados com algodão. Neste contexto foram montados laboratórios para investigar a causa das deteriorações. O grupo de pesquisa, liderado pelo Dr Elwyn T. Reese, investigava a detecção de organismos agentes das deteriorações, mecanismos de ação e métodos de controle conduzindo experimentos no laboratório das forças armadas, em Natick, Massachusetts, Estados Unidos (CASTRO, 2010; GUSAKOV, 2011; SANTOS 2008; WILSON, 2009).

Milhares de amostras de microrganismos foram coletadas nos acampamentos das regiões tropicais, entretanto, a amostra de um fungo filamentosos coletada na Nova Guiné chamou atenção dos pesquisadores. A linhagem de fungo filamentoso foi codificada como QM6a, posteriormente identificada como *Trichoderma viride*, atualmente é denominado de *Trichoderma reesei* em homenagem ao Dr Elwyn Reese. Esta espécie foi relatada com a característica de secretar enzimas capazes de degradar a celulose. Em 1953 o grupo de pesquisa do Dr. Reese determinou que essas enzimas eram naturais e que constituíam complexos de diversas moléculas com distintas habilidades na degradação do substrato nomeando-as como celulases (BORTOLAZZO, 2011; CASTRO, 2010).

Em 1956, Dr. Reese passou a trabalhar em conjunto com a Dra. Mary Mandels e o foco das pesquisas mudou de prevenção da hidrólise da celulose para a otimização da produção de celulases a partir do fungo filamentoso *Trichoderma viride*. Em 1973 surgiram pesquisas voltadas para a conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energético e em 1979 o grupo de pesquisadores do Dr Reese e Dra Mandels anunciaram o isolamento de uma linhagem mutante do gênero *Trichoderma* com elevada

produção de celulases com poder hidrolítico 20 vezes superior a linhagem nativa (CASTRO, 2010; SANTOS, 2008)

Mandels e Reese publicaram muitos estudos sobre a influência dos principais fatores que afetam a produção de celulases incluindo formulações de meio de cultivo ideais, sendo estes estudos até hoje utilizados como referência na elaboração de meios de cultivo para a produção de celulases. Ao longo dos anos, cada década foi marcada por significativos avanços em estudos sobre as enzimas do complexo celulolítico e os avanços das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento (BORTOLAZZO, 2011; CASTRO, 2010).

No início do século XXI grandes investimentos foram destinados para a produção de celulases, especialmente para a aplicação na obtenção de etanol combustível. Desde então, estudos sobre isolamento de microrganismos produtores de celulases, aumento da expressão de celulases por mutações gênicas, clonagem e expressão de genes, compreensão sobre os mecanismos de hidrólise da celulose, purificação e caracterização dos componentes do complexo celulolítico, elucidação das estruturas tridimensionais das celulases e demonstração do potencial industrial dessas enzimas tem sido foco da pesquisa básica e aplicada (AFONSO, 2012; CASTRO, 2010).

3.2. Celulose

A celulose é o material mais abundante na terra. A unidade de repetição da celulose é o dissacarídeo celobiose devido à configuração espacial alternada das ligações glicosídicas (Figura 1). A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado. A estrutura da celulose apresenta regiões altamente ordenadas denominada de regiões cristalinas estabilizadas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e apresenta regiões menos ordenadas denominadas de amorfas, onde as cadeias apresentam orientação randomizada (Figura 2) (FARINAS, 2011).

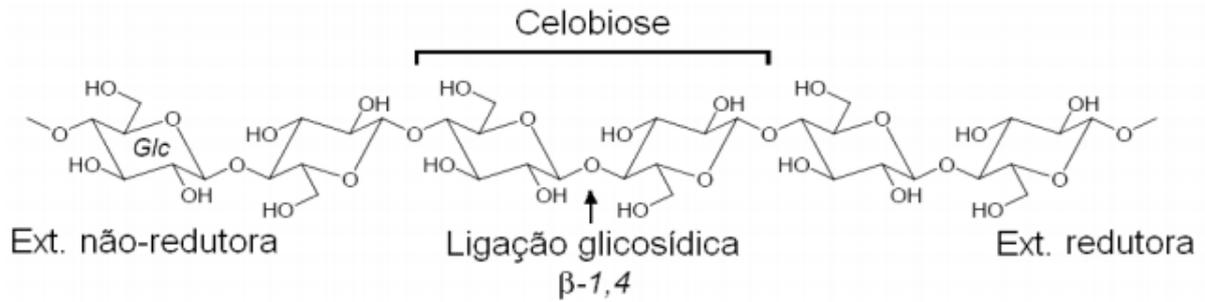


FIGURA 1 – Ilustração de moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, mostrando a unidade de repetição celbiose e terminal redutor e não redutor.

Fonte: MARCO, 2012

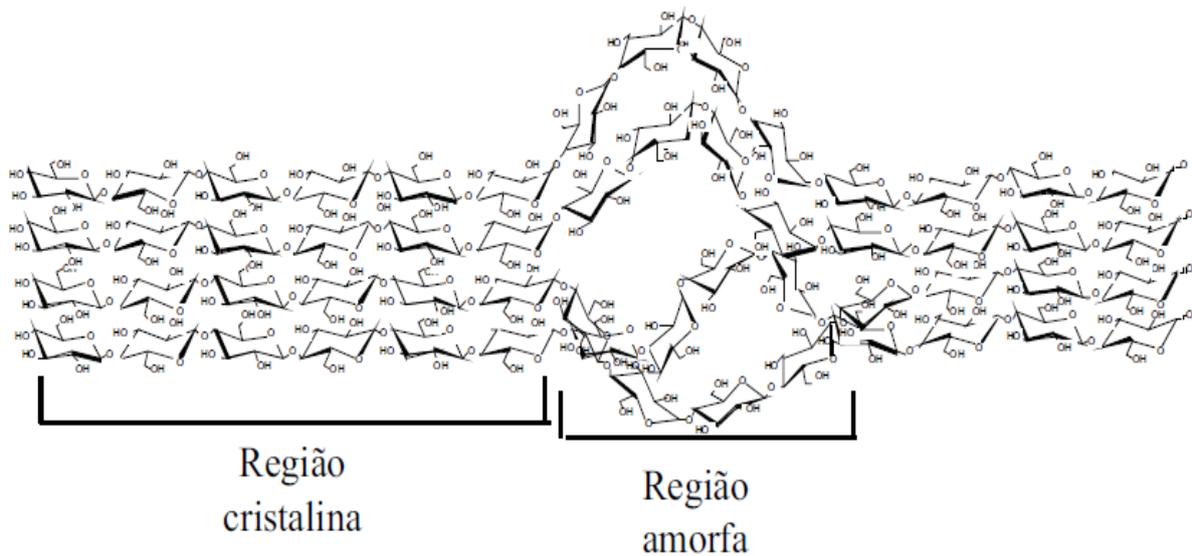


FIGURA 2 - Ilustração da estrutura da celulose evidenciando região cristalina e região amorfa

Fonte: FARINA, 2011

3.3. Celulases

De acordo com a Enzyme Commission da International Union of Biochemistry and Molecular Biology as enzimas são classificadas de acordo com as reações químicas que catalisam (BON et al., 2008). As celulases são, portanto, definidas, como enzimas hidrolases que clivam ligações do tipo β -

1,4,glicosídicas do polímero insolúvel celulose, cuja estrutura se forma pela união de β -glicose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (**Figura 2**). (CASTRO, 2010; MARTINS, 2008; SANTOS, 2014; SINGHANIA et al., 2010).

3.3.1. Estrutura das celulasas

As celulasas são constituídas por uma sequência complexa e específica de aminoácidos em geral se apresentam de forma glicosilada (TONOLETTO, 2012). Essas enzimas possuem massas moleculares relativamente elevadas sendo que o teor de carboidratos varia cerca de 1% a 50% da massa total da enzima. A estrutura das enzimas celulolíticas é dividida em três regiões: domínio catalítico (DC), domínio de ligação ao substrato (DLS), região de ligação (RL) e módulo de ligação a carboidratos (MLC) (Figura 3) (CASTRO 2010; LYND et al., 2002)

O DC e DLS estão ligados um ao outro por meio de uma cadeia polipeptídica flexível. A região DC é a localização da molécula onde ocorre a catálise, ou seja, onde está localizado o sítio ativo da enzima, esta região contém cerca de 90% do número total de aminoácidos da sequência peptídica. O sítio ativo possui a função de hidrolisar as ligações glicosídicas da celulose. Portanto, cada classe de celulase possui uma configuração diferente de sítio ativo permitindo, desta forma, a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. Já a função do DLS é a adsorção do substrato, permitindo o aumento da concentração de celulasas na superfície da celulose. (LYND et al., 2002; MARTINS, 2008; TONOLETTO, 2012). Já RL contém uma pequena quantidade de aminoácidos, entretanto, altamente glicosilados esta região tem a função de ligar a região de DC à região MCL. A região MCL é constituída de pequenos polipeptídeos estáveis contendo entre 40 e 120 aminoácidos. A região MLC tem a função de manter e aproximar a enzima à superfície do substrato, desta forma aumentando a taxa de degradação do polissacarídeo. Também tem a função de romper as interações químicas da cadeia do substrato, principalmente se as cadeias possuírem elevada cristalinidade e possuem a função de aumentar a especificidade da enzima na

atuação de regiões seletivas na molécula do substrato (LYND et al., 2002; TONOLETTO, 2012).

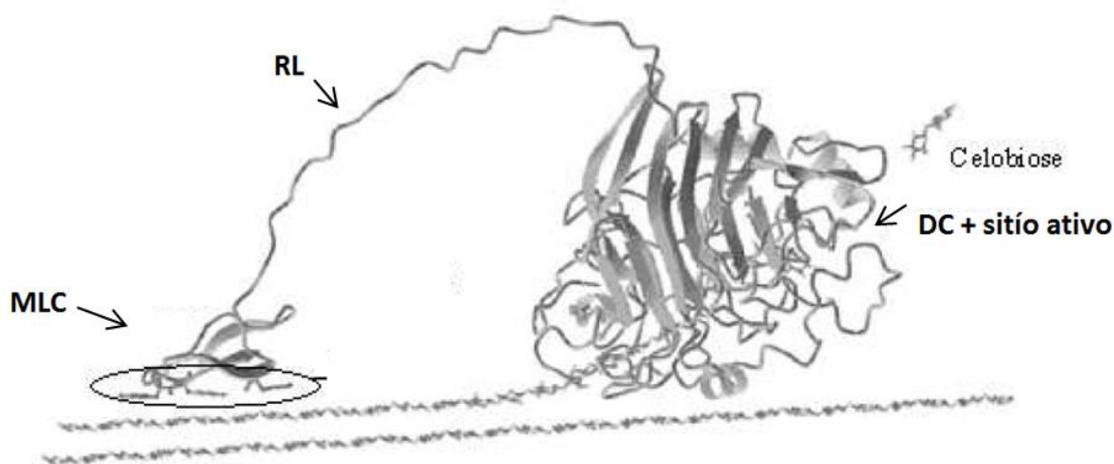


FIGURA 3 – Ilustração da estrutura das enzimas celulolíticas dividida em três regiões: domínio catalítico (DC), domínio de ligação ao substrato (DLS), região de ligação (RL) e módulo de ligação a carboidratos (MLC)

Fonte: Martins, 2005 (Adaptado)

3.3.2. Classificação das celulases

As celulases são classificadas de acordo com a Enzyme Commission com o código 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO, 2010; LYND et al., 2002). O complexo de enzimas celulolíticas é composto por três tipos de enzimas: endoglucanases (EG ou CMCase), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases ou celobiohidrolase (ExG, CBH ou avicelase), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidasases (BG ou celobiase), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO, 2010; CUNHA, 2011).

3.3.3. Atuação das celulases sobre a estrutura da celulose

As endoglucanases ou EC 3.2.1.4 (1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases), também denominadas de carboximetilcelulase possuem

massa molecular entre 32 e 100 kDa e pH ótimo entre 2,9-6,0. São responsáveis por iniciar randomicamente a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 da celulose amorfa liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e por consequência novos terminais redutores e não redutores. Os terminais redutores possuem uma hidroxila livre heterosídica na glicose já os terminais não redutores possuem uma hidroxila heterosídica que participa de ligação com a glicose adjacente (Figura 2) (SANTANA, 2010).

A ação das endoglucanases resulta em uma rápida redução do tamanho da cadeia de celulose, ou seja, diminuição do grau de polimerização. As endoglucanases possuem atividade reduzida conforme ocorre o encurtamento da cadeia de celulose e somente atuam na região amorfa da celulose. Portanto devido ao alto grau de polimerização e baixa cristalinidade a carboximetilcelulose (CMC) é bastante utilizada como substrato preferencial de atividade de endoglucanases (FARINAS, 2011; SANTANA 2010; SANTOS, 2014).

As exoglucanases também denominadas de avicelases, glucanohidrolase ou exo- β -glucosidase (EC. 3.2.1.91), ou celobiohidrolase ou exo-1,4- β -D-glucanases possuem massa molecular entre 49 e 72 kDa e pH ótimo entre 4,0-6,4. Atuam na região cristalina da celulose nos terminais redutores e não redutores encurtando as cadeias de celulose reduzindo de forma lenta e gradual o grau de polimerização da celulose liberando celobiose. Portanto, o substrato celulose microcristalina é bastante utilizado como substrato preferencial de atividade de exoglucanases (MARTINS 2008; SANTOS, 2014). As celobiohidrolase são divididas em dois grupos: celobiohidrolase 1 (CBH1) e celobiohidrolase 2 (CBH2). As CHB1 hidrolisam os terminais redutores, enquanto que a CHB2 hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas tem ação reduzida conforme ocorre o aumento do produto de hidrolise (celobiose) (FARINAS, 2011; SANTANA 2010; SANTOS, 2014). As exoglucanases são responsáveis pela amorfogênese promovendo um aumento na taxa de hidrólise da celulose devido a exposição das regiões cristalinas. Este mecanismo ainda não foi completamente elucidado, entretanto, entende-

se que o mecanismo envolve uma ruptura física do substrato, causando desestratificação das fibras de celulose (CASTRO, 2010).

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) ou β -glicosídeo glucohidrolases, também denominadas de celobíases possuem massa molecular entre 45 e 250 kDa e pH ótimo entre 4,0-5,6. As β -glicosidases são responsáveis por hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis com a liberação de glicose. As β -glicosidases finalizam a despolimerização e aumentam a taxa de global de hidrólise do processo já que consome a celobiose que é inibidora da ação das exoglucanases (MARTINS 2008, SANTOS, 2014). As misturas de enzimas celulolíticas têm sido bastante abordadas na literatura. O fungo filamentosso *T reesei*, por exemplo, secreta poucas β -glicosidases desta forma tem sido adicionado a essas misturas β -glicosidases comerciais produzidas por *A ninger* (CARVALHO, 2010).

3.3.4. Sinergismo

As enzimas do complexo celulolítico apresentam melhor rendimento quando atuam de forma conjunta do que quando atuam de forma isolada, ou seja, a soma dos rendimentos individuais é inferior ao rendimento conjunto Este mecanismo é denominado de sinergismo (CASTRO, 2011; LYND et al., 2002). Sinergismo é definido como a atividade quantificada por misturas de substâncias é superior a soma das atividades dessas substâncias avaliadas separadamente (WOOD et al. 1979).

O máximo de sinergismo depende do substrato, do microrganismo e do processo de produção da enzima, mas geralmente é obtido com elevadas concentrações de exoglucanases no preparado de celulasas (CARVALHO, 2011). A formulação ideal do preparado de enzimas celulolíticas pode ser obtido pelo cultivo de linhagens superprodutoras das principais classes de enzimas celulolíticas, pela produção de cada enzima celulolítica de forma separada com posterior mistura em proporções otimizadas. No entanto, também pode ocorrer a produção por meio da incorporação de genes produtores de enzimas celulolíticas em organismos hospedeiros capazes de

excretar enzimas celulolíticas em proporções adequadas para o máximo sinergismo (CASTRO, 2010).

São conhecidas pelo menos três formas de sinergismo entre as celulases (CASTRO, 2010). Sinergismo endoglucanases-exoglucanases, sinergismo exoglucanases-exoglucanases e sinergismo exoglucanases- β -glicosidases ou β -glicosidases-endoglucanases (ASTOLFI, 2014; CASTRO, 2011; HARGAVARES, 2010; JUNIOR, 2012) O grau de sinergismo é igual à razão entre a atividade de misturas de enzimas e a soma das atividades das enzimas separadamente (CASTRO, 2011).

No sinergismo endoglucanases-exoglucanases, as endoglucanases atuam randomicamente na região amorfa da celulose diminuindo significativamente seu grau de polimerização, ou seja, disponibilizando os terminais redutores e não redutores para a atuação de exoglucanases. Em seguida no sinergismo exoglucanases-exoglucanases, as exoglucanases atuam hidrolisando os terminais redutores e não redutores que foram liberados pelas endoglucanases. Posteriormente no sinergismo exoglucanases- β -glicosidases e endoglucanases- β -glicosidases, as exoglucanases e endoglucanases atuam nos produtos de hidrolise das exoglucanases e endoglucanases liberando celobiose e oligossacarídeos respectivamente, sendo estes substratos para as β -glicosidases. Desta forma as β -glicosidases hidrolisam celobiose a glicose (Figura 4) (Figura 5) (CARVALHO, 2011; CASTRO, 2010; FARINAS, 2011; JUNIOR, 2012; NASCIMENTO, 2015).

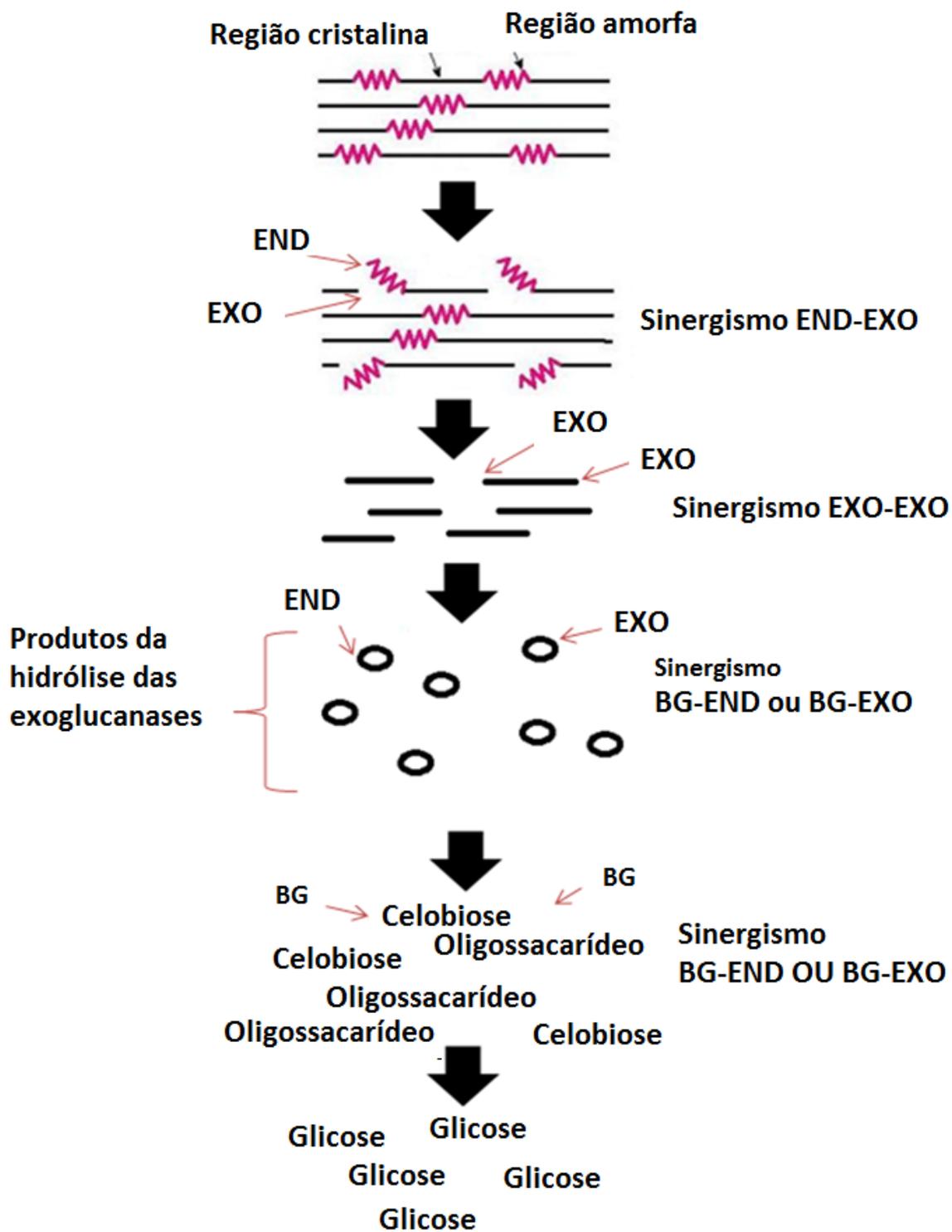


FIGURA 4 - Ilustração do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da estrutura da celulose

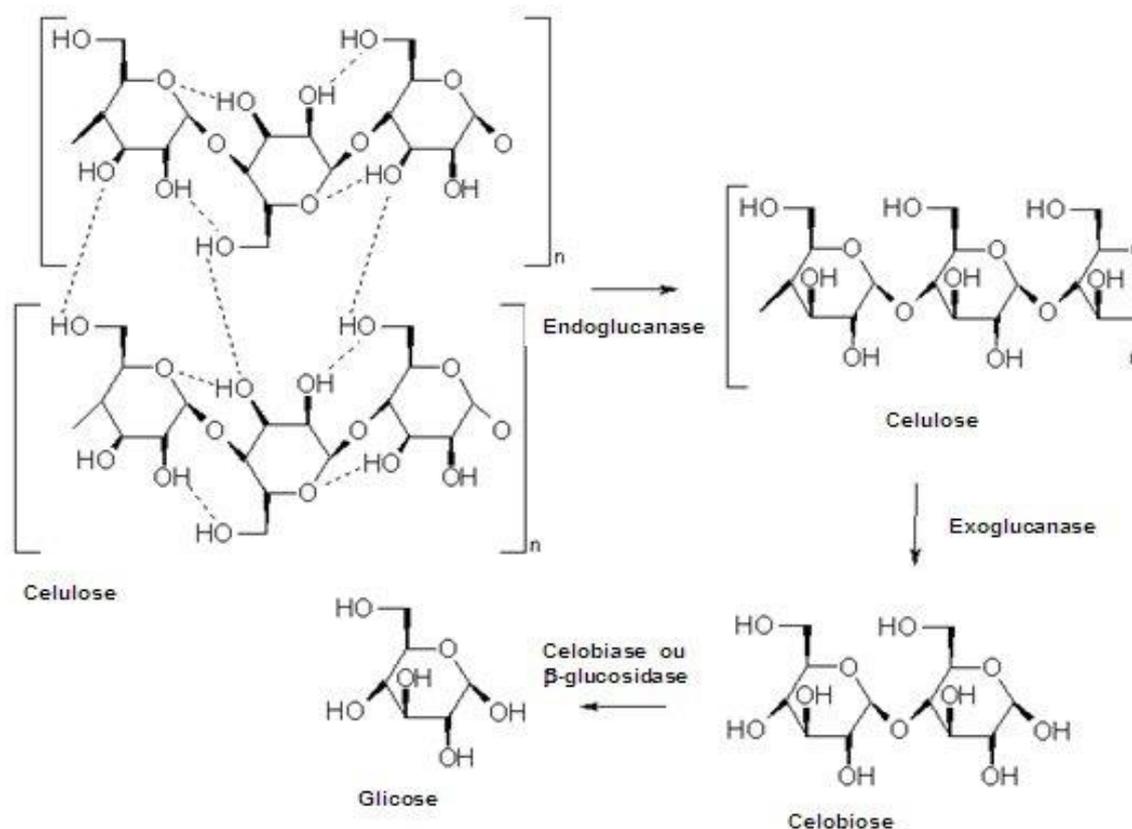


FIGURA 5 – Ilustração do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e celobiases na degradação da estrutura da celulose.

Fonte: FARINAS, 2011

3.3.5. Influencia da temperatura, pH e íons na atividade celulolítica

A atividade enzimática é influenciada por qualquer condição que afete a conformação na estrutura protéica (OLIVEIRA, 2014). O pH e a temperatura são as condições que mais influenciam na alteração conformacional da proteína (OLIVEIRA, 2014). Portanto, com o objetivo da utilização de celulases em diversos processos industriais é fundamental que temperatura e pH ótimos da celulase seja compatível com as condições do processo onde a mesma será aplicada (CASTRO, 2010).

A maioria das celulases relatadas na literatura atuam em condições de pH ácido na faixa de entre 4,8 e 5,5 (CUNHA et al., 2012; JUNIOR., 2012). Singh et al.. (2009) verificaram que o pH 4,8 foi o melhor pH para a atividade das celulases produzidas por *A. heteromorphus*. De acordo com Stemberg et al.. (1976) em um estudo sobre a estabilidade de celulase obtidas em meio

líquido por *T. viride*, as mesmas foram parcialmente inativadas em determinadas faixas de pH, sendo a faixa de pH entre 3,0 e 3,4 deletéria para as β -glicosidases e a faixa de pH inferior a 3,0 deletéria para Fpases e endoglucanases.. No entanto, bactérias como *Bacillus* sp. produzem celulasas altamente ativas em valores de pH alcalinos (10,5) (CASTRO, 2010).

Oliveira (2010), analisou as condições de determinação da atividade enzimática de celulasas de *Melanoporia* sp. CCT 7736 e verificou valores ótimos de atividade na temperatura de 60 °C e pH 6,5. Já as celulasas obtidas do *T. polysporum* e *A. niger* NRRL 2001 no mesmo estudo apresentaram atividade ótima na temperatura em torno de 40°C e pH 5,5. Em relação às celulasas de actinomicetos, especialmente do gênero *Streptomyces*, a literatura relata resultados que indicam melhor atuação em temperaturas por volta de 50°C (CASTRO, 2010).

Outra propriedade das celulasas é a capacidade de ser influenciada por outras moléculas, especialmente metais, podendo ter efeitos inibitórios ou indutores. Os íons Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} e Zn^{2+} são os que mais inibem chegando a causar a perda total da atividade catalítica, mesmo quando presentes em concentrações baixas (2 mM) (CASTRO, 2010). Ramani et al.. (2012) em estudo sobre produção de celulasas utilizando fermentação submersa e *Penicillium funiculosum* NCL1, relataram que ocorreu aumento na produção de β -glicosidases quando adicionado os íons Mn^{2+} , NH^4 , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Na^{+} e Co^{2+} .

3.4. Microrganismos produtores de celulase

Os microrganismos produtores de celulasas degradam principalmente carboidratos e geralmente são incapazes de utilizar proteínas e lipídeos como fonte de energia (JUNIOR, 2012) São encontrados em diversos grupos taxonômicos, dentre eles bactérias e fungos, e tem papel fundamental no ciclo do carbono (DAROIT, 2007). Entretanto, a secreção de grande quantidade de celulasas extracelulares é característica de apenas algumas linhagens de fungos (JUNIOR, 2012)

Alguns exemplos de bactérias celulolíticas comumente relatadas na literatura são: *Acidothermus cellulolyticus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Caldibacillus cellovorans*, *Cellvibrio fulvus*, *Micromonospora chalcae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces reticuli*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium thermocellum*, *Fibrobacter succinogenes* (CARVALHO, 2013; JUNIOR, 2012; MARCO, 2012).

Bactérias celulolíticas termófilas como *Celullomonas* e *Thermobifida* também são bastante relatadas na literatura. A *Celullomonas* produz seis endoglucanases e uma exoglucanase e a *Thermobifida* produz três endoglucanases e uma exoglucanase. O gênero *Thermotoga* produz celulasas termoestáveis com temperaturas ótimas de 95 a 105°C e a *Anaerocellum thermophilum* tem sido bastante estudada sendo os genes desta espécie clonados e superexpressados em *Escherichia coli* (MARCO, 2012).

A atividade celulolítica em leveduras é relativamente rara, por isso poucas leveduras são relatadas na literatura como produtoras de celulasas. Alguns exemplos reportados são *Aureobasidium microstietum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus laurentii* UFLA CES 519, (CARVALHO, 2013).

A bioprospecção de microrganismos com altas taxas de produção de celulasas é uma das estratégias para redução de custos para produção de preparados enzimáticos comerciais (NASCIMENTO, 2015). Fungos filamentosos são os mais reportados na literatura como produtores de celulasas. A maioria das pesquisas sobre produção industrial de enzimas utiliza fungos filamentosos devido a facilidade de crescimento em ambientes aeróbios além de apresentarem alta produção de diversas enzimas extracelulares (OLIVEIRA, 2014).

3.4.1. Fungos filamentosos produtores de celulasas

Os organismos que predominantemente degradam material lignocelulósico na natureza são os fungos filamentosos. Por isso, a produção de celulasas por fungos filamentosos é amplamente disseminada na natureza (JUNIOR, 2012). O *Trichoderma reesei* é o fungo filamentoso melhor

caracterizado e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases (OLIVEIRA, 2014).

Entretanto, o complexo celulolítico produzido por *T. reesei* é deficiente em β -glicosidases, secreta duas exoglucanases e duas endo-glucanases que juntas representam 90% do total de celulases e sete β -glicosidases que juntas representam menos de 1% do total de celulases produzidas pelo fungo, portanto, nas preparações enzimáticas comerciais ocorre a adição de β -glicosidases produzidas por *Aspergillus niger* (BALSAN, 2011; SANTOS, 2010).

Outros fungos filamentosos capazes de produzir enzimas do complexo celulolítico tem sido propostos como alternativas interessantes na busca de novas preparações enzimáticas comerciais (Quadro 1) (Quadro 2) (MARTINS, 2008). As principais diferenças dentre a diversidade de fungos filamentosos produtores de celulases estão relacionadas a quantidade de β -glicosidases e a estabilidade das enzimas sob diferentes condições de processo (MARTINS, 2008).

Por isso, outras espécies de fungos filamentosos que produzem celulases tais como: *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium persicinum*, *Humicola insolens*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Mucor circinelloides*, *Melanoporia* sp., *Melanocarpus albomyces*, *Chaetomium cellulyticum*, *Neurospora crassa*, *Thermoascus aurantiacus*, *Paecilomyces inflatus* têm sido bastante estudadas e já demonstraram semelhanças com o complexo enzimático produzido por *T. reesei* (JUNIOR, 2012; MARCO, 2012; MARTINS, 2008; OLIVEIRA, 2014).

QUADRO 1

Celulases comerciais microbianas produzidas por diferentes empresas

Enzimas comerciais	Fornecedor	Fonte microbiana
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>A. niger</i>
Novozymes 188	Novozymes	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Bio-feed beta L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Energex L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Cellulyve	50L Lyven	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
GC 440	Genencor-Danisco	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
GC 880	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
GC 220	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Accelerase®1500	Genencor	<i>T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Amano Enzyme	<i>A. niger</i>
Cellulase TRL	Solvay Enzymes	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Econase CE	Alko-EDC	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Cellulase TAP106	Amano Enzyme	<i>T. viride</i>
Biocellulase TRI	Quest Intl.	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. reesei</i>
Biocellulase A	Quest Intl.	<i>A. niger</i>

Fonte: ASTOLFI, 2014

3.4.2. Microrganismos geneticamente modificados

Muitas preparações enzimáticas comerciais são produzidas por linhagens modificadas geneticamente para uma produção mais eficiente de celulases ou para atuação em processos que requerem temperaturas elevadas e diferentes faixas de pH (CASTRO, 2010). A Accelerase 1500, por exemplo, é produzida por uma linhagem modificada geneticamente de *T. reesei* (ASTOLFI, 2014). Estudos utilizando diferentes técnicas são relatados na literatura, dentre as quais as mais comuns concernentes às celulases são a mutação clássica (aleatória) e a expressão gênica (CASTRO, 2010).

A mutação clássica é utilizada há décadas sobre linhagens de *T. reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*), gerando diversas linhagens, sendo as técnicas mais utilizadas radiação ultravioleta, acelerador linear, uso de nitrosoguanidina

e metanossulfonato de etila. Já para expressão gênica os organismos hospedeiros mais comumente utilizados para a expressão heteróloga de proteínas, estão a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Genes recombinantes em fungos filamentosos também tem sido relatado na literatura visando a expressão de celulasas (CASTRO, 2010).

3.5. Processos fermentativos para produção de celulasas

A produção de celulasas pode ser realizada por fermentação submersa e fermentação em estado sólido. Em escala industrial, celulasas comerciais são produzidas por fermentação submersa - FS, entretanto, a produção de celulasas por fermentação em estado sólido - FES tem sido amplamente investigada pelos pesquisadores nos últimos 25 anos com o objetivo de redução de custos de produção utilizando resíduos agroindustriais como substrato (BHANU-PRAKASH et al., 2008; MUCURI, 2012). No entanto, a FES possui desvantagem da dificuldade do controle dos parâmetros durante o processo fermentativo tais como: pH, temperatura, umidade, crescimento celular e perda de produto durante a etapa de extração (HOLKER, LENZ, 2005; PANDEY 2003; TONOLETTO, 2012).

3.5.1. Fermentação submersa

A fermentação submersa (FS) é definida como o processo onde os microrganismos desenvolvem-se em meio de cultura na presença de água livre e normalmente com substratos solúveis, sob agitação, sendo conduzida em escala industrial em biorreatores agitados e aerados mecanicamente (JUNIOR, 2012). A tecnologia de FS se desenvolveu bastante durante a Segunda Guerra Mundial devido a necessidade de acelerar a produção de penicilina (PANDEY, 2003).

A FS com fungos filamentosos é utilizada para a obtenção de uma variedade de metabólitos dentre os principais estão as enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, carotenoides, biotina, aminoácidos entre outros (CARVALHO, 2013; SILVA, 2008). Entretanto, apesar da FS ser mais utilizada

em escala industrial apresenta algumas desvantagens como por exemplo: maior dificuldade operacional em relação a transferência de oxigênio para os microrganismos, devido à baixa solubilidade do oxigênio em água, maiores custos com aeração e agitação, além disso geram grande volume de efluentes (SANTANA, 2010; TONOLETTO, 2012).

O crescimento do fungo filamentosos e a produção de celulases é influenciada por diversos parâmetros operacionais tais como: composição do meio de cultivo, temperatura, pH e oxigênio dissolvido no meio de cultivo, forças de cisalhamento, reologia e morfologia do fungo, concentração do substrato indutor, disponibilidade dos nutrientes, agitação, aeração entre outros. O entendimento desses parâmetros é fundamental para a produção em larga escala de celulases (JUNIOR, 2012; LI, 2010).

A batelada alimentada é a forma mais empregada para a FS em escala industrial. Biorreatores em diversas configurações podem ser utilizados, sendo os reatores de mistura mecânica utilizados em 90% do total de bioreatores utilizados industrialmente, no entanto, para a FS de fungos filamentosos com elevada sensibilidade ao cisalhamento são utilizados reatores tais como *air lift*, *loop reactors*, *bubble column* entre outros (CARVALHO, 2013).

Para otimização da produção de celulases ou outro metabólito por processos fermentativos é necessário o conhecimento detalhado das características fisiológicas do crescimento do microrganismo (GAUTAM, et al., 2010). São necessárias diferentes condições químicas e físicas para cada microrganismo, portanto, o conhecimento dos parâmetros de cada espécie são necessários para a produção máxima da enzima celulolítica de interesse (CARVALHO, 2013; KOCHER, KALRA, BANTA, 2007)

3.6. Indutores e mecanismos de repressão catabólica na produção de celulases por fungos filamentosos

Em fungos filamentosos existem três estados de regulação da produção de celulases: expressão a nível basal, secreção de celulases por indutores e repressão catabólica (GONG, 1979; SUTO, TOMITA, 2001). A expressão de

celulases a nível basal é pouco elucidada, entretanto, alguns autores consideram que ocorre a síntese em nível basal de CBH 1 e CBH 2 para iniciar a degradação de celulose. O fungo filamentoso produz celulases constitutivas que são secretadas e clivam, inicialmente, os polissacarídeos. Moléculas menores são geradas e penetram na célula sendo as responsáveis pela indução da expressão dos genes que codificam celulases (OLIVEIRA, 2014; PEREIRA, 2013).

A síntese em nível basal ocorre porque a celulose é um indutor insolúvel e não é capaz de atravessar a membrana celular e a celulose atua como sinal induzindo celulases conidiais constitutivas basais. Desta forma a celulase expressa em nível basal pode ajudar os fungos filamentosos a reconhecer a existência da celulose. Acredita-se que as proteínas ativadoras e as proteínas de repressão catabólica não afetam a expressão de celulase em nível basal (OLIVEIRA, 2014, PEREIRA, 2013).

Majoritariamente a produção de celulases por fungos filamentosos é induzida por celulose, no entanto, outros indutores como celobiose, galactose, sacarose, lactose entre outros tem sido reportado na literatura (OLIVEIRA, 2014). A sacarose, por exemplo, é o indutor de *Hypocrea jecorina* (linhagem mutagênica de *T reesei*) já a gentiobiose é o indutor de *Penicillium purpurogenum* para a produção de celulases (PEREIRA, 2013). Um dos desafios da produção de celulases esta relacionado com o custo dos indutores. Resíduos agroindustriais tem sido amplamente reportado na literatura para redução do custo de produção (AFONSO, 2012; AGUIAR, MENEZES, 2000; ALEXANDRINO, 2007; BHANU, PADMAIA, KIRAN, 2008; FERREIRA, 2011; OLIVEIRA, 2010; ZANCHETTA, 2012).

De modo geral a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de glicose e induzida na presença dos diversos indutores. A repressão catabólica ocorre devido a formação de uma série de sinais no interior da célula que são iniciados devido a presença de glicose. O indutor aciona a transcrição do gene da celulase mediada por proteínas ativadoras e elementos de ativação, ocorrendo a secreção de uma grande quantidade de celulases que vão degradar ainda mais celulose para oligossacarídeos e

glicose. Com isso, após a degradação da celulose, uma grande quantidade de glicose é liberada o que causa a repressão catabólica. A glicose se liga a região promotora dos genes de celulase bloqueando a transcrição e expressão destes genes. A repressão catabólica impede que o fungo filamentosos sintetize quantidade elevadas de celulases mesmo quando existe abundância de fonte de carbono facilmente assimilável (PEREIRA, 2013).

3.7. Ensaio de quantificação de celulases

A quantificação de celulases pode ser total ou individual (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) (HARGREAVES, 2008). Por isso, em muitos estudos, substratos modelos são utilizados para a diferenciação entre as atividades enzimáticas do complexo celulolítico. Como substrato modelo podem ser utilizados: celulose microcristalina, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, papel filtro, algodão, alfa-celulose, celulose *Volonia* sp., celulose bacteriana, celodextrinas e derivados cromogênicos, entre outros substratos (MARTINS, 2008). Metodologias tais como microbalança de cristais de quartzo, FPase automatizado, microfibrilas fluorescentes e biossensor amperométrico, celobiose desidrogenase também tem sido relatado na literatura (ASTOLFI, 2014).

Diante de diferentes metodologias para determinação da atividade celulolítica é importante ressaltar a dificuldade em realizar comparações dos níveis de atividade de celulases devido a diversidade de métodos e condições de reação. Por isso, pode ocorrer interpretações equivocadas quanto a atividade celulolítica de um determinado preparado enzimático produzido por um microrganismo (VALADARES, 2013).

3.7.1. Celulose microcristalina

A celulose microcristalina é preparada a partir de fibra de celulose, ou seja, é preparada a partir da polpa de madeira, pela hidrólise com HCl seguida de neutralização e subsequentes etapas de lavagens e secagens utilizando solventes água, acetona e etanol. Desta forma, a região amorfa da celulose é hidrolisada pelo ácido gerando partículas cristalinas com grau de polimerização

entre 100 e 250 e índice de cristalinidade em torno de 47%. São celuloses quase puras e o tratamento ácido remove hemiceluloses. Por possuir baixo grau de polimerização, ou seja, possuir muitas extremidades de cadeia, a celulose microcristalina é utilizada como substrato modelo para quantificar exoglucanases (MARCO, 2012; MARTINS, 2008).

3.7.2. Papel filtro

A utilização de papel filtro é tradicional, sendo bastante utilizado como substrato modelo para quantificar atividade celulolítica total (HARGREAVES, 2008). As fibras de celulose que constituem o papel filtro possuem uma estrutura complexa, portanto, para a hidrólise deste substrato é necessário sinergismo entre as celulases. O papel filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia da União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC desde 1984 para avaliar a atividade celulolítica total (GHOSE, 1987). O método utilizando o substrato papel filtro é denominado de FPase e foi desenvolvido pelos pesquisadores Mandels et al., 1976 (MARTINS, 2008).

Embora seja um método amplamente utilizado não é considerado reprodutível. Além disso, o método possui uma sensibilidade inadequada já que a celobiose não é um açúcar redutor e não é quantificado pelo método. Portanto, caso o preparado enzimático possua elevada quantidade de β -glicosidase será produzida elevada quantidade de celobiose que não será quantificada ocasionando uma falsa leitura de absorbância para o ensaio de DNS (ASTOLFI, 2014).

Xiao et al. (2004) desenvolveram melhorias no método utilizando o mesmo modelo substrato papel filtro, entretanto, melhorando a reprodutibilidade do método. Para melhorar a reprodutibilidade do método foi proposta redução do volume de reagentes e substrato, podendo o ensaio ser realizado em microplacas.

3.7.3. Carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose

A carboximetilcelulose – CMC e hidroxietilcelulose – HEC são polímeros aniônicos derivados da celulose muito solúveis em água. A solubilidade em

água ocorre quando ocorre a substituição suficiente de grupos carboximetílicos ou hidroxietílicos. CMC e HEC são produzidos comercialmente em diferentes graus de polimerização. Em baixas concentrações as moléculas de CMC e HEC são mais estendidas em ramificações e conforme a concentração aumenta as moléculas se sobrepõem podendo formar um gel termoreversível. A CMC de viscosidade média é preconizada pela IUPAC para quantificar endoglucanase, sendo a HEC utilizada como substrato alternativo (MARCO, 2012; MARTINS 2008).

CMC e HEC são celulosas modificadas, muito utilizadas como modelo de substrato para quantificação de endoglucanases devido a grande solubilidade em água e por não serem hidrolisados por exoglucanases já que possuem baixo caráter amorfo, além do impedimento estérico causado pelos grupos substituintes carboximetílicos e hidroxietílicos causando o impedimento da cadeia de celulose para adentrar ao sítio ativo das exoglucanases (MARTINS, 2008).

3.7.4. Celulose de *Valonia* sp.

Valonia sp. é uma alga que produz microfibrilas de celulose com índice de cristalinidade próximo de 100%. Este substrato tem sido utilizado para estudos de adsorção e sinergismo devido a cristalinidade e homogeneidade (MARTINS, 2008).

3.7.5. Substrato cromogênico: p-nitrofenil- β -glicosídeo (pNPG)

A quantificação da atividade de β -glicosidase utilizando substratos cromogênicos como pNPG é a técnica mais utilizada (VALADARES, 2013). O método pNPG tem como base a determinação de p-nitrofenol, sendo uma unidade de β -glicosidase definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto. O substrato pNPG na concentração ótima, é adicionado a um tampão apropriado, com pH ideal, contendo a enzima e em seguida incubado a temperatura ideal. Após 10 minutos de incubação, a reação é interrompida pela adição de três volumes de solução saturada de tetraborato de sódio, e em seguida a absorbância é lida em 405 nm (ASTOLFI, 2014).

Vários substratos cromogênicos podem ser utilizados para quantificar a atividade de β -glicosidase entre eles estão: pNP- β -D-glicopiranosídeo, pNP- α -D-glicopiranosídeo, pNP- β -D-xilopiranosídeo, pNP- α -D-xilopiranosídeo, pNP- β -D-fucopiranosídeo, pNP- α -D-fucopiranosídeo, pNP- β -D-galactopiranosídeo, pNP- α -D-galactopiranosídeo, pNP- β -D-manopiranosídeo, pNP-N-acetil- β -D-galactosaminídeo, pNP- β -D-celobiosídeo entre outros (Daroit, 2007). É importante, ressaltar que não existe uma correlação linear entre a metodologia utilizando um substrato cromogênico análogo como pNPG e um substrato natural como a celobiose (Valadares, 2013).

3.7.6. Celobiose

A celobiose não é hidrolisada por endoglucanase e exoglucanase, mas é o principal produto da ação da β -glicosidase por isso esse substrato é utilizado para quantificação da atividade de β -glicosidase (HARGREAVES, 2008). Ghose (1987), descreve metodologia para determinação de atividade de β -glicosidase utilizando celobiose. Neste método a atividade é determinada como celobiase (VALADARES, 2013). Neste método a atividade de celobiase é quantificada pela liberação de glicose após 30 minutos de hidrólise em solução contendo o substrato celobiose em pH 4,8 e temperatura de 50°C. A glicose liberada é quantificada pelo método de glicose oxidase (GOD) com um kit comercial (MARTINS, 2008).

3.7.7. Algodão

Apesar do algodão conter impurezas tais como pectinas, proteínas e ceras, ainda sim é a forma mais pura natural de celulose. Tais impurezas podem ser facilmente removidas por meio de extração alcalina e/ou orgânica a quente com subseqüentes etapas de lavagens e secagens. O algodão apresenta índice de cristalinidade entre 70 e 80%. Portanto, é utilizado para quantificar exoglucanases já que a estrutura do substrato não possibilita acesso para endoglucanases e β -glicosidases. Também é utilizado como fonte de carbono para a produção de celulases (MARTINS 2008).

3.8. Aplicações industriais

Celulases são comumente utilizadas em diversas aplicações industriais por isso ocorre um aumento da demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas, específicas, com características físicas e químicas adequadas a cada tipo de aplicação industrial (BHAT, 2000; DAROIT, 2007). A produção de celulases em escala industrial teve início em meados da década de 80, na indústria de ração animal em seguida na indústria de alimentos e posteriormente indústria têxtil e lavanderia, detergentes, papel e atualmente na produção de etanol de 2ª geração (DELATORRE 2013; FACCHINI, 2010; SANTANA, 2010).

Na indústria de ração animal celulases são utilizadas como aditivos juntamente com a ração de animais ruminantes e monogástricos para aumentar a digestibilidade. Na ração para animais monogástricos atuam junto com as xilanases na hidrólise de polissacarídeos não amiláceos já na ração para animais ruminantes atuam junto com pectinases e hemicelulases para aumentar a hidrólise da parede celular das plantas que são base da alimentação destes animais (BRITO et al., 2008; DELATORRE, 2007; FACCHINI, 2010; FAGUNDES, 2008).

Na indústria têxtil as celulases são utilizadas em processos de biopolimento para desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose e em processos de bioestonagem para o amaciamento e remoção de pigmentos de brim e jeans. O processo de biostonagem permite redução do tempo e uso de máquinas e condições de automação do processo. Anteriormente o processo de estonagem era químico ou realizado com pedras pomes gerando grande volume de resíduos químicos e danificando o tecido, respectivamente (BHAT, 2000; DIAS, 2012).

Já na indústria de detergente, celulases são utilizadas em formulações para lavanderia, substituindo produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, prejudiciais ao meio ambiente e que provocam o desgaste de equipamentos. Nas formulações de detergente destinados a lavanderia, as celulases são adicionadas com o objetivo de diminuir o desgaste de peças devido o acúmulo de fiapos de tecido nos equipamentos (DIAS, 2012). Nas formulações de detergentes domésticos existe a combinação de proteases, amilases, lipases e

celulases que resultam em uma limpeza sinérgica e possibilita a manutenção das cores do tecido (SANTOS, 2008).

Na indústria de papel celulases são utilizadas na fabricação de papel reciclado. Nesta aplicação industrial as celulases modificam as propriedades mecânicas da polpa (matriz celulósica) liberando pigmentos da superfície das fibras permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (DELATORRE, 2010, DIAS, 2012). A utilização de celulases no processo de fabricação de papel permite economia de 20% e estima-se que a economia pode chegar a 40% dependendo do tipo de enzima empregada (SILVA, 2008).

Diversas enzimas incluindo celulases também são utilizadas para o tratamento de efluentes dos mais diversos tipos. Por exemplo, a utilização de celulases para o tratamento de resíduos gerados pelas indústrias de papel em substituição ao uso de agentes químicos contribuindo para a preservação do meio ambiente (SANTOS, 2008).

Atualmente o interesse da aplicação industrial de celulases tem sido bastante voltado para bioconversão da biomassa de resíduos agroindustriais para a produção de etanol. Sendo a biomassa considerada a única fonte de carbono suficiente para substituir o uso dos combustíveis fósseis. Neste contexto, investimentos milionários têm sido realizados para possibilitar a degradação completa de resíduos agroindustriais em açúcares simples e fermentáveis para produção de etanol (CARVALHO, 2011, CUNHA 2011, ZUNINGA, 2010).

3.8.1. Aplicação de celulases na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos as celulases são utilizadas em diversos processos. Celulases juntamente com pectinases, hemicelulases são amplamente utilizadas no processo de fabricação de sucos de frutas. São utilizadas para acelerar a hidrólise de polissacarídeos na etapa de maceração, desta forma, promovem a redução da viscosidade, diminuem turbidez, aumentam a clarificação, além da liberação de açúcares e pigmentos. A

otimização da homogeneização possibilita ainda a mistura de diversas frutas e a concentração de sólidos. Alguns estudos relatam a obtenção de estabilizantes naturais como pectina obtidos de bagaço de laranja utilizando celulasas para otimizar a extração (BHAT, 2000; CASTRO 2010; ESTELLER & BORGES 2008, TOLAN, FOODY, 1999).

As celulasas também são muito utilizadas no processo de fabricação de cervejas. São utilizadas em cervejarias de grande porte para acelerar a clarificação do mosto. As celulasas facilitam a filtração do mosto promovendo “poros” no malte acelerando a passagem do mosto e liberando amido presos nas fibras aumentando o rendimento da sacarificação do amido pelas amilases do malte (BEGUIN, AUBERT, 1994, CASTRO, 2010; ESTELLER & BORGES 2008).

Celulasas e outras enzimas são utilizadas na extração de óleos tais como: amendoim, canola, gergelim, girassol, mostarda, abacate entre outros, O óleo encontra-se nos vacúolos intracelulares, sendo necessário o rompimento das paredes e membranas celulares para sua extração. Os tratamentos mecânico e térmico causam a ruptura das estruturas celulares, porém, não são suficientes, já que parte do óleo permanece na célula, sem ser extraído (SANTOS, 2008). Celulasas também são utilizadas para a extração de componentes de chá verde tais como os compostos fenólicos dentre eles as catequinas. O extrato bruto de chá verde é preparado a partir de folhas secas de *Camellia sinensis* e as celulasas e outras enzimas melhoram a obtenção do extrato bruto rico em polifenóis que estão presentes dentro dos vacúolos da planta (RUEGGER & TAUKE-TORNISELO, 2004; CASTRO, 2010; PEREIRA et al., 2010)

Na América do Norte majoritariamente a obtenção de xarope de glicose e frutose é realizada utilizando celulasas. O xarope de glicose e frutose é amplamente utilizado refrigerantes, doces, confeitos, balas, bombons, iogurtes, sorvetes, panificação, biscoitos entre outros. Após a remoção do gérmen do milho, antes da etapa de moagem, na etapa de infusão dos grãos em água, as celulasas e outras enzimas são adicionadas para a separação de amido das frações insolúveis reduzindo a viscosidade. Já a hidrólise do amido até glicose

é realizada pela adição de α -amilases e amiloglicosidases (ESTELLER & BORGES 2008)

Pesquisa para melhoramento de tecnologia industrial de palmitos também têm sido reportado na literatura com o uso de celulases, pectinases e hemicelulases para modificar a textura de palmitos. Em geral, as pontas duras de palmito são descartadas e consideradas não comestíveis. Outros trabalhos investigam a adição de celulases, pectinases, hemicelulases em purês e molhos doces ou salgados formados pela mistura de diferentes vegetais ou frutas, promovendo a redução na sensação de arenosidade e adesividade (ESTELLER, BORGES, 2008; HARGREAVES, 2008).

Celulases também tem sido utilizadas na produção de molhos de pimenta sendo adicionada na etapa de maceração para melhorar a liberação de capsaicina. Estudos sobre a hidrólise de fontes vegetais ricas em corantes tais como carotenos e clorofila também tem sido investigados pela adição de celulases e posterior purificação e isolamento na obtenção de biocorantes concentrados. A adição de celulases na etapa de despolpação de sementes de cacau também tem sido relatada na literatura para a obtenção de cacau com características sensoriais otimizadas. Alguns estudos demonstraram que a utilização de celulases na extração do café solúvel é promissora, aumentando a extração e reduzindo os resíduos de processamento (ESTELLER & BORGES 2008).

Celulases também são utilizadas na obtenção de proteína de soja. O método químico de extração é realizado com ácido sendo um processo de custo bastante elevado que ocasiona cerca de 25% de perda da proteína. Desta forma o método mais viável e econômico é a realização de uma hidrólise enzimática utilizando celulases e outras enzimas, assegurando as propriedades nutricionais e funcionais da proteína (CASTRO, 2010. ESTELLER & BORGES 2008). Também são utilizadas celulases, especificamente, β -glicosídases para a hidrólise de glicosil isoflavonas à suas formas agliconas desta forma o produto obtido aumenta a biodisponibilidade das isoflavonas ao intestino humano. As Isoflavonas são a maioria dos compostos fenólicos da soja e e têm sido relacionados a importantes propriedades biológicas, tais como: atividade

anti-oxidante atividade antifúngica, propriedades estrogênicas e atividade anticancerígena (CASTRO, 2010, PARK, 2001).

Na produção de vinhos, β -glicosídases são utilizadas para aumentar a liberação de compostos ricos em aromas já que uvas e outras frutas possuem compostos voláteis e diferentes precursores de aroma não voláteis. A fração de terpenos não-voláteis em uvas é geralmente maior do que a fração volátil. Na forma não volátil o terpeno encontra-se ligado a um dissacarídeo e somente proporciona aroma quando o mesmo esta liberado. A liberação de terpenos pode ser realizada por ácidos e por enzimas, entretanto, a hidrólise enzimática possui a vantagem de não modificar o padrão de distribuição natural do aroma. Também são empregadas na produção de vinhos brancos e rosados hidrolisando antocianinas reduzindo a coloração vermelha. Entretanto, as β -glicosídases utilizadas na fabricação de vinhos devem possuir tolerância a etanol e glicose, além de pH ótimo ácido (DAROIT, 2007).

β -glicosídases também podem ser utilizadas para a hidrólise de compostos cianogênicos presentes em alguns vegetais, como mandioca. Também são utilizadas na extração de aromatizantes como vanilina de *Vanilla fragrans* sendo esta essência comumente utilizada na fabricação de bolos, doces, sorvetes, chocolates e bebidas e na produção de sucos cítricos são utilizadas para hidrólise de prunina diminuindo o amargor; β -glicosídases têm sido relatadas na literatura quanto à possibilidade de liberação de compostos fenólicos a partir de suas formas glicosiladas em frutas e outros vegetais processados, podendo ser utilizados como antioxidantes (DAROIT, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) e no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1. Fluxograma da metodologia

A metodologia do presente trabalho foi realizada conforme fluxograma abaixo.

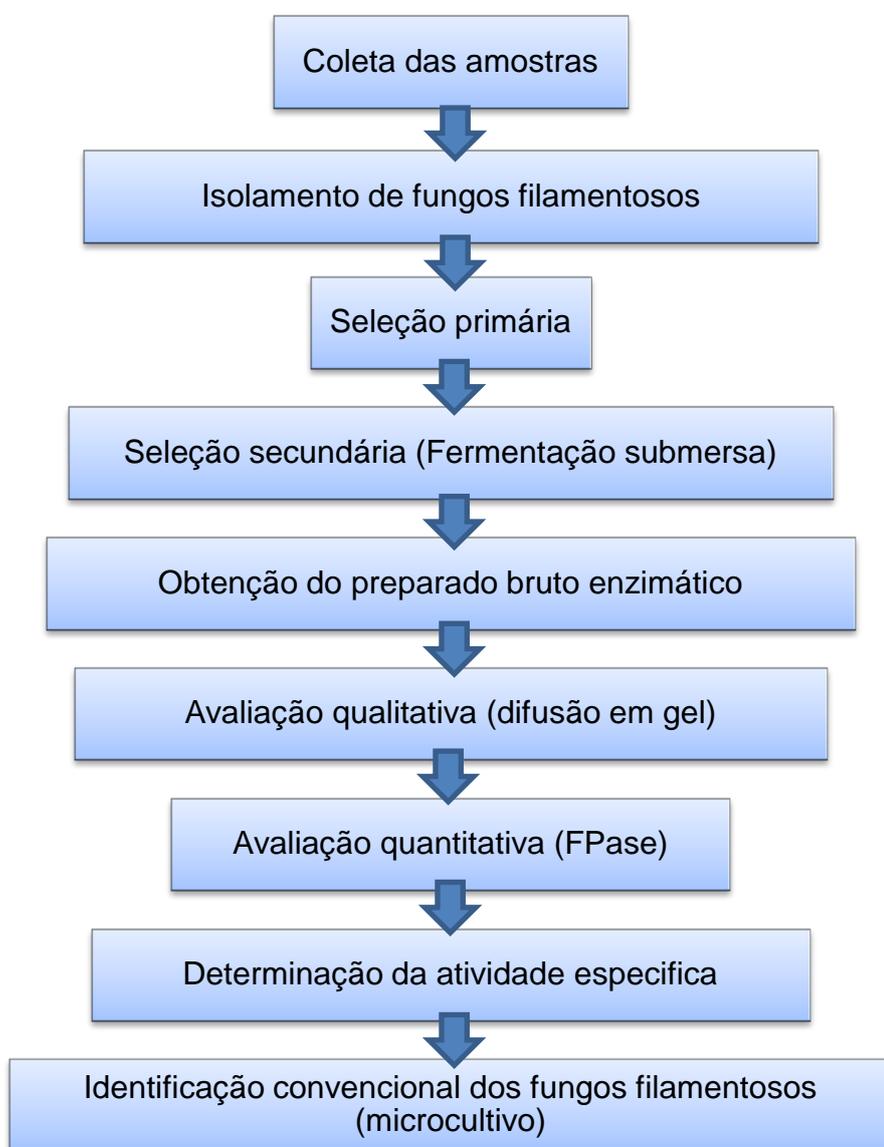


FIGURA 6 - Fluxograma da metodologia de isolamento e seleção de fungos filamentosos com potencial celulolítico

4.2. Coleta das amostras

Foram coletados os resíduos agroindustriais bagaço de cana de açúcar, casca de amendoim e casca de coco. O bagaço de cana de açúcar foi obtido de uma fábrica de cachaça artesanal (denominada Alambique Alto Batatal) localizada em Tombos-RJ, a casca de amendoim foi obtida de um produtor rural (Fazenda Pitangueira) localizado em Pequi-MG e a casca de coco seca foi obtida de uma fábrica de produção de doces (Doces Teixeira) localizada em Contagem-MG.

As amostras foram coletadas diretamente da área de descarte de bagaço de cana de açúcar do Alambique Alto Batatal, armazém de amendoim da Fazenda Pitangueira e container de resíduo de casca de coco seca da fábrica de Doces Teixeira. Todas as amostras foram coletadas em diversos pontos para a obtenção de amostra heterogêna com diversidade de fungos.

Todas as amostras foram coletadas com auxílio de pinça previamente flambada, acondicionadas em sacos plásticos estéreis, transportadas sob refrigeração (caixas térmicas) ao LAMIB, Departamento de Alimentos da UFMG, onde as amostras foram armazenadas a 4°C para análises posteriores.

4.3. Denominação dos fungos filamentosos isolados das amostras de resíduo agroindustrial

Os fungos filamentosos isolados das amostras receberam códigos conforme o tipo de resíduo agroindustrial em que foram isolados (Quadro 3).

QUADRO 2

Denominação dos fungos filamentosos isolados das amostras de resíduos agroindustriais

Código dos fungos filamentosos isolados	Resíduo agroindustrial
BM	Bagaço de cana de açúcar seco moído
BP	Bagaço de cana de açúcar seco em pedaços
CO	Casca de coco seco
CA	Casca de amendoim

4.4. Isolamento dos fungos filamentosos

Cinco gramas das amostras de cada resíduo agroindustrial foram homogeneizadas em 45mL de água peptonada 0,1% em frascos Erlenmeyers com capacidade de 500mL. Após a homogeneização as amostras foram diluídas para 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , das quais alíquotas de 100 μ l foram, em triplicata, semeadas na superfície das placas de Petri contendo o meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA) (20% batata, 2% dextrose e 2% ágar), adicionado de clorofenicol (100 mg.L^{-1}) para inibição do crescimento de bactérias. Em seguida as placas foram incubadas em estufa por um período de 5 a 7 dias a temperatura de 30°C (Figura 7) (BASSO & GALLO, 2010).

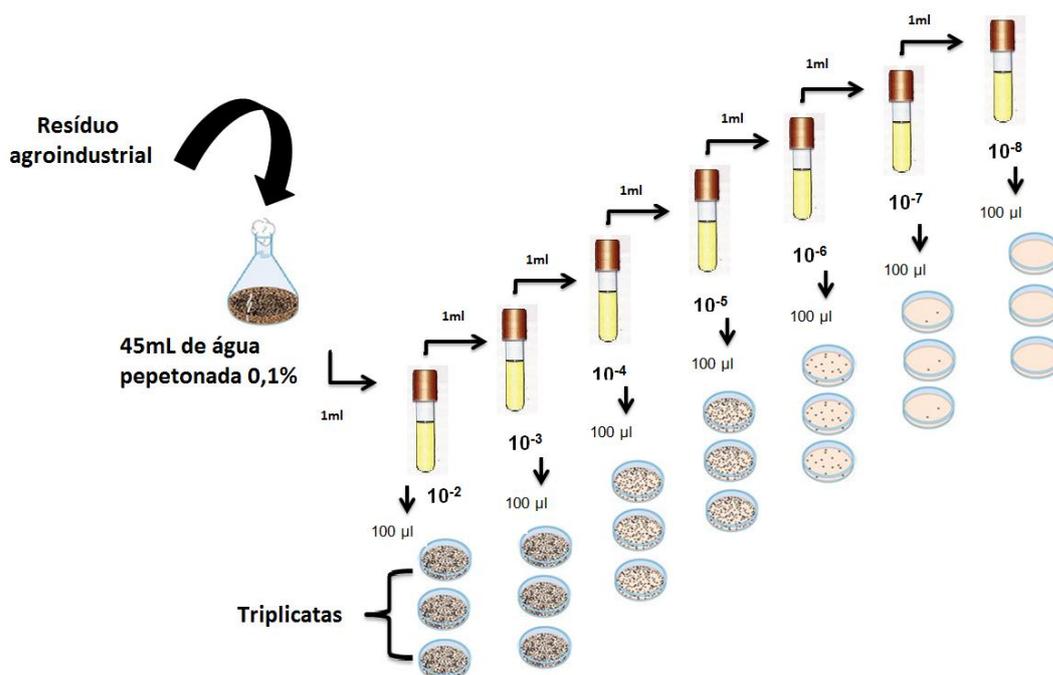


FIGURA 7 – Isolamento de fungos filamentosos – Ilustração das diluições seriadas

4.5. Purificação dos fungos filamentosos isolados

Para obtenção das culturas puras dos fungos filamentosos, foram feitas transferências sucessivas de uma porção das colônias mais isoladas, com o auxílio de alça de repique do tipo ponta de agulha para placas de Petri contendo novo meio de cultura BDA adicionado de clorofenicol (100 mg.L^{-1}) (CAVALCANTI, 2010). As placas foram incubadas em estufa por um período de 5 a 7 dias a temperatura de 30°C . Todas as transferências foram realizadas em duplicata (Figura 8) (CARVALHO, 2013).

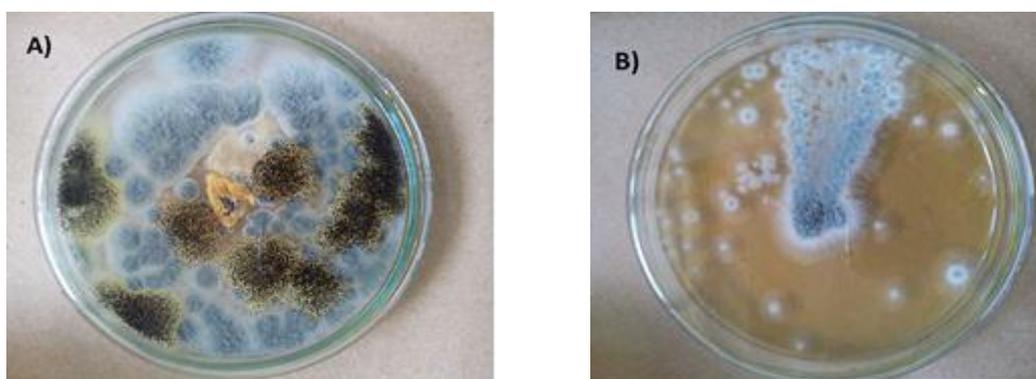


FIGURA 8 – Purificação dos fungos filamentosos – Fotografias de cultura mista e cultura pura

A) cultura mista isolada de bagaço de cana de açúcar B) cultura pura isolada de bagaço de cana de açúcar.

4.6. Conservação e manutenção dos fungos filamentosos

As colônias puras dos fungos filamentosos obtidas foram conservadas em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967) e mantidas por repiques sucessivos em placas de Petri (semanalmente) e em tubos de ensaio com ágar inclinado (mensalmente) ambos contendo o meio de cultura BDA adicionado de clorofenicol (Figura 9). Essas culturas puras foram conservadas como culturas estoque para posteriores análises e mantidas sob refrigeração (temperatura de 4°C).

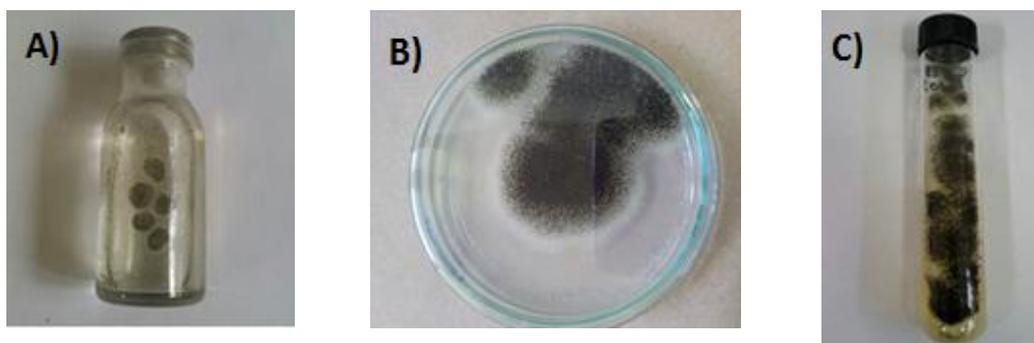


FIGURA 9 - Conservação de fungos filamentosos

A) cultura pura conservada em água destilada estéril. B) cultura pura conservada por repique sucessivo em placa de Petri e C) cultura pura conservada por repique sucessivo em tubo de ensaio

4.7. Ensaio qualitativo: Seleção primária em meio sólido

O método utilizado consistiu no cultivo dos fungos filamentosos previamente isolados em meio sólido contendo substrato seletivo, ou seja, meio de cultura ágar carboximetilcelulose (CMC) 1% (NOGUEIRA & CAVALCANTI, 1996; TUNCER, 1999) adicionado de meio de cultura basal ((MANDELS & WEBER, 1969) (Quadro 4) (Quadro 5). A carboximetilcelulose (CMC) foi utilizada como substrato preferencial para a produção de celulases, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (FLORENCIO, 2011).

QUADRO 3

Meio de cultura ágar CMC 1%

Componentes	Unidades	Concentração
Carboximetilcelulose	g.L ⁻¹	10
Ágar-ágar	g.L ⁻¹	20

Fonte: Nogueira & Cavalcanti, 1996; Tuncer, 1999

QUADRO 4

Meio de cultura basal

Componentes	Unidades	Concentração
KH ₂ PO ₄	g.L ⁻¹	2,0
(NH ₄)SO ₄	g.L ⁻¹	1,4
CaCL ₂ H ₂ O	g.L ⁻¹	0,3
MgSO ₄ 7H ₂ O	g.L ⁻¹	0,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	ml.L ⁻¹	5,0
MnSO ₄ H ₂ O	ml.L ⁻¹	1,6
ZnSO ₄ 7H ₂ O	ml.L ⁻¹	1,4
CoCL ₂	ml.L ⁻¹	2,0
Tween 80	ml.L ⁻¹	1,0
Peptona bacteriológica	g.L ⁻¹	1,0

Fonte: Mandels e Weber, 1969

As culturas puras dos fungos filamentosos isolados foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura CMC 1%, de forma pontual com auxílio de alça com ponta de agulha em quatro pontos equidistantes em cada placa de Petri, em duplicata (Figura 10). As placas inoculadas foram incubadas a 30°C durante o período de 7 dias.



FIGURA 10 – Fungo filamentoso, isolado de bagaço de cana de açúcar e inoculado de forma pontual em meio de cultura CMC.

Após o período de incubação, adicionou-se em cada placa 10mL de solução iodo (2,0 g KI e 1,0 g iodo em 300 mL de água destilada) e deixou agir por 3 minutos, em seguida a solução iodo foi descartada. As placas foram deixadas em repouso por 2 minutos (KASANA et al., 2008). Os fungos

filamentosos produtores de celulases foram selecionados pela formação de halo claro ao redor das colônias (HANKIN E ANAGNOSTAKIS,1975). O iodo forma um complexo com a carboximetilcelulose, desta forma é observado um halo ao redor da colônia correspondente ao halo de hidrólise da carboximetilcelulose (CARVALHO, 2013).

A relação entre o diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia, foi expresso como índice enzimático de atividade (IE), sendo determinado pela equação 1 (Hankin e Anagnostakis,1975).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro médio do halo de hidrolise}}{\text{Diâmetro médio da colônia}}$$

As medidas do diâmetro do halo produzido e da colônia crescida foram feitas com paquímetro em três dimensões distintas (CARVALHO, 2013).

4.8. Padronização do inóculo

As culturas isoladas que apresentaram resultado positivo (formação de halo) foram repicadas e estriadas em tubos de ensaio contendo ágar BDA inclinado, maior área de contato para crescimento dos fungos. Os tubos de ensaio inoculados foram incubados a 30°C durante 7 dias (JUNIOR, 2012). Após a incubação, os tubos de ensaio contendo a cultura crescida foram lavados com 10mL de água destilada estéril para obtenção da suspensão de esporos. A determinação da concentração de esporos foi realizada por meio de contagem direta em câmara de Neubauer (JUNIOR, 2012; SANTOS, 2011).

A suspensão de esporos foi homogeneizada e em seguida 0,1mL foi transferida para outro tubo de ensaio e adicionado 0,3mL de corante azul tripano 0,2 % obtendo-se a diluição 1/4. Novamente a suspensão foi homogeneizada e com auxílio de uma pipeta uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para lamínula preenchendo cuidadosamente a câmara de Neubauer de forma que a suspensão preenchesse apenas um lado da câmara não atingindo os canais laterais da área de contagem. Para a sedimentação das

células aguardou-se 2 minutos e logo em seguida foi focalizado com a objetiva de menor aumento a área demarcada da câmara de contagem. Posteriormente, foi realizada a contagem das células nas quatro áreas laterais sendo o valor dividido por quatro para obtenção da média multiplicando pelo fator de diluição quatro. O fator de diluição corresponde a razão do volume total pelo volume da amostra. Para obter o número de células.mL⁻¹, o valor da média corrigida foi multiplicado por 10.000 (VIEIRA & FERNANDES, 2012). Foi realizada diluição do inóculo quando a concentração de células na suspensão de esporos foi superior a desejada. Para adequação da diluição foi utilizada a equação 2 (VIEIRA & FERNANDES, 2012).

$$\text{Volume final} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células/mL da suspensão original} \times \text{volume original}}{\text{concentração desejada de células/mL}}$$

4.9. Seleção secundária

4.9.1. Fermentação submersa

Nesta etapa foram selecionados os fungos filamentosos mais promissores quanto a produção de celulasas em meio líquido (HARGREAVES, 2008). Os fungos filamentosos que apresentaram resultado positivo na seleção primária foram inoculados em meio líquido (fermentação submersa) para obtenção de preparado bruto enzimático e posterior dosagem da atividade enzimática celulolítica (JUNIOR, 2012).

A fermentação submersa foi realizada em duplicata em frascos de Erlenmeyers com capacidade de 125mL contendo 25 mL do meio de cultura basal proposto por Mandels e Weber (1969). Em cada frasco de Erlenmeyer contendo o meio de cultura basal foi adicionado, 2,5 g de celulose microcristalina. Cada erlenmeyer foi inoculado com 1ml de suspensão de esporos correspondente a uma concentração de 10⁷ esporos mL⁻¹. Os frascos foram incubados em incubadora orbital Tecnal TE-424 sob agitação de 150 rpm a 30 °C. Foram coletadas amostras, denominadas preparado bruto enzimático, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de fermentação, as mesmas foram centrifugadas a 5477 g durante 15 minutos e em seguida filtradas em bomba a vácuo utilizando papel filtro Whatman nº1 (JUNIOR, 2012). Os preparados

bruto enzimáticos obtidos foram acondicionados em tubos eppendorfs e armazenados sob temperatura de congelamento (inferior à menos 18 °C) para posteriores dosagens das atividades enzimáticas celulolíticas (SILVA, 2008).

4.9.2. Ensaio qualitativo: Difusão em gel

A atividade celulolítica nos preparados brutos enzimáticos foi primeiramente avaliada pela técnica de difusão em gel de ágar. Os ensaios foram realizados em meio de cultivo contendo apenas ágar bacteriológico e CMC 1% (Quadro 6) (HARGREAVES, 2008). Após a esterilização (121°C durante 15 minutos em autoclave) 25 mL do meio de cultivo foi distribuído placas de Petri (100 mm x 20 mm). Após a solidificação do meio de cultivo, em cada placa de Petri, foram perfurados 5 poços de 7 mm equidistantes com auxílio de cilindro de aço inox (COLEN, 2006).

QUADRO 5

Meio de cultivo utilizado na técnica de difusão em gel

Componentes	Unidade	Concentração
Ágar bacteriológico	g.L ⁻¹	20
CMC	g.L ⁻¹	10

Fonte: Hargreaves, 2008

Em cada poço foi dispensado 50 µl do preparado bruto enzimático, e as placas foram incubadas a 30 °C por um período de 24 horas. (DINGLE, REID & SALOMONS,1953). Após o período de incubação as placas foram inundadas com 10mL de solução iodo (2,0 g KI e 1,0 g iodo em 300 mL de água destilada) por um período de 3 minutos, em seguida a solução iodo foi descartada. As placas foram deixadas em repouso por 2 minutos (KASANA et al., 2008). Os resultados positivos foram baseados na formação de halo claro ao redor dos poços (Figura 11) (CARVALHO, 2013; DINGLE, REID & SALOMONS,1953). Os ensaios foram realizados em triplicata.

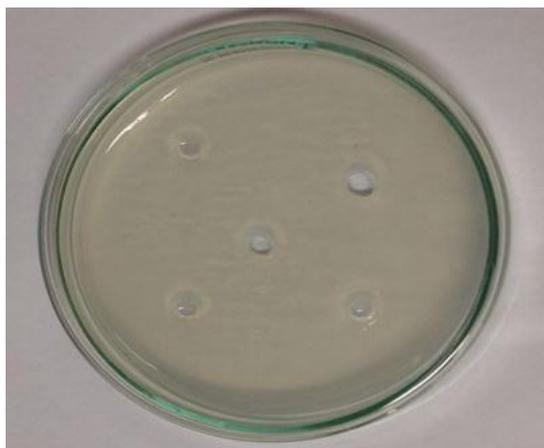


FIGURA 11 - Técnica de difusão em gel – Fotografia de inoculação de preparado bruto enzimático em poços de placa de Petri contendo ágar bacteriológico 2% e carboximetilcelulose 1%.

4.9.3. Ensaios de quantificação: Determinação da atividade celulolítica total

A análise do complexo celulolítico foi baseada no protocolo de XIAO et al. (2004), modificado. Tradicionalmente o método de atividade celulolítica total sobre papel de filtro (FPase) utiliza uma tira de papel de filtro Whatman nº1 de 1,0 x 6,0 cm de papel filtro, como substrato padrão, sendo a liberação de açúcares redutores ocasionada pela ação das celulases (preparado bruto enzimático) sobre o papel de filtro, medida pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico – DNS. A unidade internacional utilizada é FPU que é definida como um micromol de glicose liberado por minuto nas condições do ensaio. O ácido 3,5 dinitrosalicílico quando puro apresenta coloração alaranjada quando reduzido por açúcares redutores torna-se ácido 3-amino-5-nitro salicílico e apresenta coloração acastanhada. Desta forma, ao se medir a absorbância no comprimento de onda 540 nm estima-se a concentração de glicose na amostra.

4.9.3.1. Preparo das soluções

4.9.3.1.1. Reativo DNS

A solução DNS foi preparada conforme metodologia de Ghose (1987). Quatro gramas de NaOH foi diluído em 50mL de água destilada esta solução foi denominada de solução A. Em seguida 2,5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico foi

misturado á solução A sendo esta nova solução denominada de solução B. Logo, após 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos sob agitação constante em 125mL de água destilada. Esta solução foi denominada de solução C. Posteriormente a solução B foi homogeneizada na solução C sob aquecimento até completa solubilização. Após o resfriamento o volume foi ajustado com água destilada em balão volumétrico de 250 mL. A solução foi armazenada em temperatura ambiente em frasco âmbar (NASCIMENTO, 2015).

4.9.3.2. Soluções estoque: metabissulfito de sódio e fenol

As soluções estoque de metabissulfito de sódio 35% e fenol 50% foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração. Ambas soluções estoque foram adicionadas a solução do reativo DNS apenas no momento que a reação da atividade enzimática foi realizada. Para 50 mL de solução reativo DNS foi utilizado 533 µl de solução estoque de metabissulfito de sódio 35% e 506 µl de solução estoque de fenol 50% (NASCIMENTO, 2015).

4.9.3.3. Solução tampão acetato de sódio 50 mM

O tampão acetato de sódio foi preparado conforme metodologia de Xiao et al. (2004). Foi pesado em balança analítica 4,1 g de acetato de sódio e diluído em água destilada em balão volumétrico para um volume final de 1000 mL. O pH desta solução foi ajustado para 4,8 utilizando NaOH. A solução foi acondicionada em frasco âmbar e armazenada em temperatura ambiente.

4.9.4. Determinação da atividade celulotítica total (FPase)

A atividade *filter paper cellulase* (FPase) avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas endogluconases, exoglucanases e β-glicosidases sobre um substrato celulósico cristalino (papel de filtro Whatman nº1) (GHOSE, 1987).

Nos poços da microplaca de PCR? foram adicionados a mistura da reação constituída de: um disco de 5 mm de papel Whatman nº 1, 40 µl de

tampão acetato de sódio 0,5M, pH 4,8 e 20 µl de preparado bruto enzimático. A microplaca foi então incubada a 50° C durante 60 minutos em Termobloco Eppendorf modelo SMAR. Em seguida, as amostras foram transferidas para outra microplaca contendo 120 µl de DNS em cada poço, com o objetivo de retirar os discos de papel. O branco da amostra foi constituído de 40 µl de tampão acetato de sódio 0,5M, pH 4,8 e 20 µl de preparado bruto enzimático e 120 µl de DNS. A microplaca contendo as amostras foi novamente incubada a 95°C durante 5 minutos em Termobloco Eppendorf modelo SMAR e em seguida resfriada a 4°C (em banho de gelo) durante 15 minutos. A absorbância das amostras na microplaca foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas Varioskan Flash 4.00.53 software Skanit versão 2.4.5.9. (XIAO et al., 2004). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.5. Curva analítica padrão de glicose

O método define que a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto no período do ensaio corresponde a uma unidade internacional de atividade celulolítica total (FPU.mL⁻¹). Portanto, para calcular a quantidade de enzima foi elaborada uma curva analítica padrão de glicose, em microplaca (XIAO et al., 2004).

A curva analítica padrão de glicose foi construída com as leituras das absorbâncias a 540 nm das soluções de glicose de zero a x g.L⁻¹, em leitor de microplacas Varioskan Flash 4.00.53 software Skanit versão 2.4.5.9. O valor de absorbância do branco foi subtraído do valor da absorbância de cada amostra (XIAO et al., 2004). A equação relacionando-se os valores de absorbância com as concentrações de glicose foi obtida por regressão linear ($y = 0,5524x$, $R^2 = 0,9861$).

4.9.6. Cálculo da atividade enzimática celulolítica total (FPase)

O valor obtido da absorbância do branco da amostra foi subtraído de cada um dos valores das absorbâncias das amostras nos ensaios de determinação da atividade celulolítica. A média dos valores obtidos foram

comparados com a curva padrão de glicose, sendo a atividade celulolítica total calculada conforme equação 3.

$$\text{FPU.mL}^{-1} = \frac{(\text{absorbância da amostra})}{y \text{ da curva padrão de glicose}} \times F \times T$$

Onde F = Fator de diluição (volume da amostra + volume do tampão) / volume da amostra; T = Tempo de reação ((XIAO et al., 2004).

4.10. Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). O corante coomassie azul brilhante, presente no reagente de Bradford, fica azul ao se ligar à arginina e aminoácidos aromáticos das proteínas passando de absorvância de 465 nm para 595 nm. Essa interação entre o corante e a proteína estabiliza a forma aniônica do corante causando uma visível mudança na coloração, inicialmente de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração de proteínas. Dessa forma, ao se medir a absorvância no comprimento de onda de 595 nm estima-se a concentração total de proteínas na amostra.

A reação foi realizada em eppendorf contendo 150 µL de Reagente de Bradford Sigma, contendo corante coomassie azul brilhante G-250 a temperatura ambiente e 50 µl de preparado bruto enzimático. Após a homogeneização aguardou-se 5 minutos para transferência de 100 µl para a microplaca. Em seguida foi realizada a leitura a 595 nm em Varioskan Flash 4.00.53 software Skanit versão 2.4.5.9. Para o branco reacional foi utilizada 150 µl do Reagente de Bradford Sigma e 50 µl de água destilada.

4.10.1. Curva analítica padrão de proteína

Para calcular a concentração de proteína no preparado bruto enzimático foi construída uma curva analítica padrão de proteína, em microplaca de PCR utilizando albumina bovina - BSA na concentração 0,1 a

1 mg.mL⁻¹. Os valores das absorbâncias foram determinados a 595 nm em Varioskan Flash 4.00.53 software Skanit versão 2.4.5.9. A absorbância do branco da amostra foi subtraída da absorbância das amostras. A equação da reta da curva padrão foi obtida por regressão linear dos dados ($y = 0,5897x$, $R^2 = 0,9938$). A concentração de proteínas foi expressa em mg de proteína.mL⁻¹ de preparado bruto enzimático.

4.11. Determinação da atividade específica (AE)

A atividade específica de FPase foi expressa pela unidade internacional FPU.mg⁻¹ de proteína, sendo, obtida pela razão entre FPU.mL⁻¹ e a quantidade de proteínas total (mg.mL⁻¹) determinada através da curva padrão de proteína conforme equação 4 (HARGREAVES, 2008).

$$\text{FPU.mg}^{-1} \text{ de proteína.} = \frac{\text{FPU.mL}^{-1}}{\text{Proteína total (mg.mL}^{-1}\text{)}}$$

4.12. Descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias

Os fungos filamentosos que produziram halo claro ao redor da colônia na seleção primária foram submetidos à descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias. Os fungos foram cultivados em duplicata em meio de cultura BDA conforme descrito no item 4.3. Após o período de incubação as colônias foram observadas a olho nú quanto às características morfológicas macroscópicas tais como: cor, aspecto, borda anverso e reverso.

4.13. Identificação convencional dos fungos filamentosos por microcultivo

Os fungos filamentosos produtores de celulases foram identificados quanto ao gênero pela observação das características morfológicas microscópicas conforme a técnica de microcultivo de Ridell (1950). As placas de Petri de microcultivo foram montadas em duplicata utilizando uma lâmina apoiada em um bastão de vidro em U. As placas de Petri de microcultivo também continham uma pequena porção de algodão umedecido com água destilada estéril. Sobre a lâmina foi adicionado um bloco de ágar saboraund contendo clorofenicol de cerca de 1cm x 1cm. Os fungos filamentosos produtores de celulases foram inoculados nas bordas do ágar saboraund com auxílio de alça de repique estéril. Sobre os quadrados de ágar saboraund foi depositada uma lamínula (Figura 12). As placas de microcultivo foram incubadas em estufa por um período de 5 dias a temperatura de 30°C. Após o período de incubação as lamínulas foram transferidas cuidadosamente para novas lâminas contendo uma gota de azul de lactofenol. Em seguida para conservação das lâminas, lamínula e lâmina, foram seladas utilizando cola superbonder e base para unhas. As lâminas foram observadas em microscópio óptico para a identificação dos gêneros (NAIME, 2009).

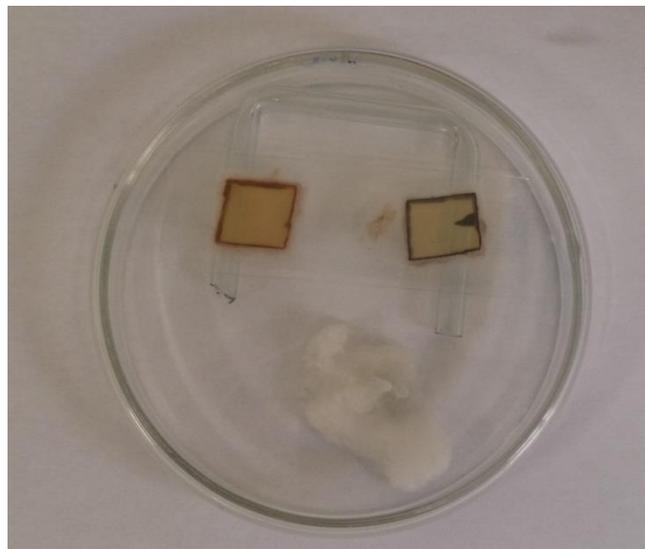


FIGURA 12 - Fotografia de placa de Petri de microcultivo (técnica de Ridell)

4.14. Análises estatísticas

Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado para os valores do índice enzimático e o delineamento estatístico fatorial 2^2 para os valores da atividade celulolítica total e atividade específica. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa estatístico ASSISTAT versão 7,7 beta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de fungos filamentosos de resíduos agroindustriais

Foram isolados 28 fungos filamentosos dos resíduos agroindustriais: casca de coco, casca de amendoim e bagaço de cana de açúcar seco. Sendo oito (28,6%) isolados de casca de coco, sete (25,0%) isolados de casca de amendoim e 13 (46,4%) isolados de bagaço de cana de açúcar seco (Figura

13).

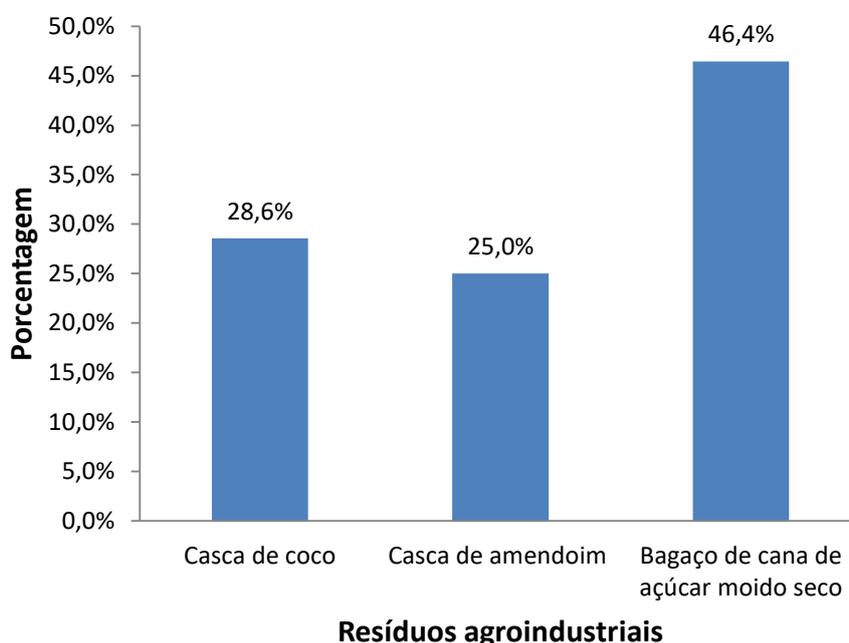
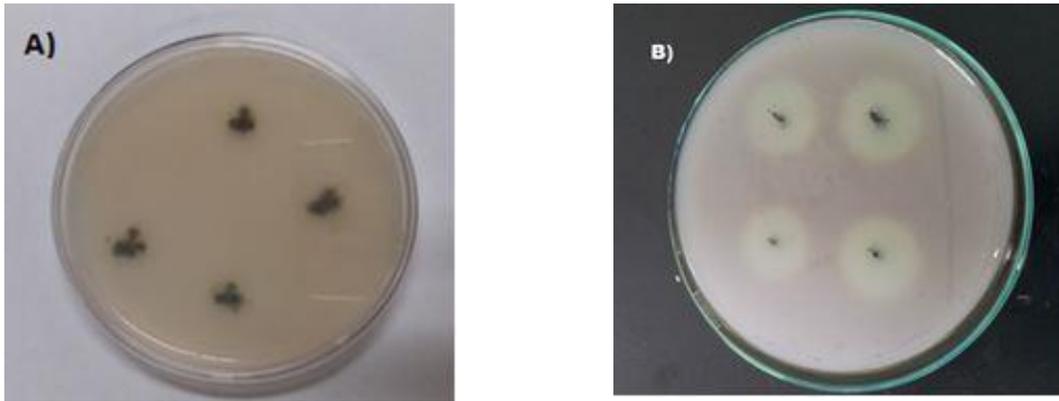


FIGURA 13 - Porcentagem de fungos filamentosos isolados dos resíduos agroindustriais

5.2. Ensaio qualitativo: Seleção primária em meio sólido

Todos os fungos filamentosos isolados dos resíduos agroindustriais foram avaliados quanto ao potencial produção de enzimas com atividade celulolítica total. Os resultados positivos foram evidenciados pela formação de halos claros ao redor das colônias (Figura 14)



- A) Crescimento da cultura pura do fungo filamentoso isolado de bagaço de cana seco inoculado de forma pontual em meio de cultura CMC, após 7 dias de crescimento
- B) Colônia de fungo filamentoso isolado de bagaço de cana seco em placa de Petri com halo de hidrólise evidenciado após coloração com solução iodo.

FIGURA 14 - Seleção primária dos fungos filamentosos potencialmente produtores de celulases

Do total de 28 fungos isolados, sete (25%) isolados apresentaram resultados positivos para a produção de enzimas com atividade celulolítica total utilizando carboximetilcelulose como substrato (Figura 16). Herculano et al.. (2011), isolaram 189 fungos de resíduos de mamonas, sendo 56 fungos produtores de enzimas com atividade celulolítica total representando 30% dos isolados.

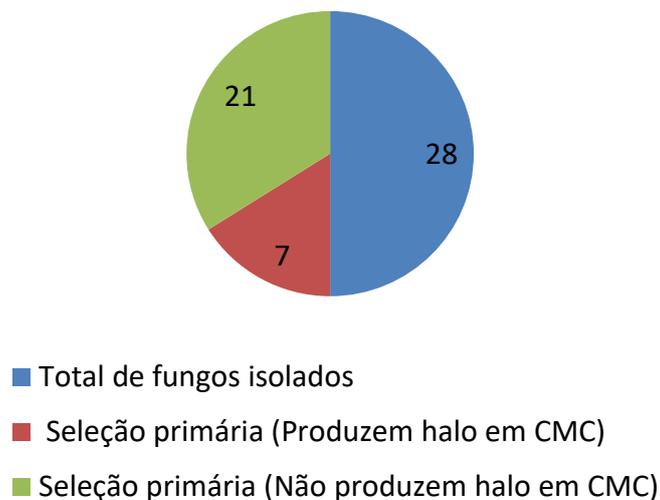


FIGURA 15 – Quantidade de fungos filamentosos com potencial celulolítico na seleção primária

Para a visualização dos halos de hidrólise ao redor das colônias dos fungos, foram testados os corantes vermelho Congo e iodo. Entretanto, não foi possível visualizar a presença de halos de hidrólise com a utilização do corante vermelho Congo (dados não mostrados), enquanto, com a utilização do corante de iodo os halos de hidrólise foram nítidos. O método de seleção facilitada em ágar sólido utilizando substratos cromogênicos é um método simples para a detecção específica de microrganismos que degradam polissacarídeos (RUEGGER & TAUKE-TORNISELO, 2004). Estudos realizados por Kasana et al. (2008) demonstraram que o corante iodo tem forte interação com polissacarídeos com ligações β -1,4 – Dglucopiranosil. Desta forma, a interação do polissacarídeo com o iodo proporciona halos claros de hidrólise da carboximetilcelulose. Nesse mesmo estudo Kasana et al. (2008) realizaram seleção e a identificação de microrganismos produtores de celulasas em placas de Petri com ágar e CMC e testaram diferentes métodos de seleção através da coloração das placas com três corantes: vermelho Congo, iodo e brometo de hexadeciltrimetilamônio. Os melhores resultados obtidos foram com iodo de Gram, devido a melhor visualização da zona de hidrólise do substrato. O estudo ressalta que a utilização de iodo tem a vantagem de detecção mais rápida do que a utilização de corante vermelho Congo, e também ressalta que o iodo não é tóxico em detrimento do corante vermelho Congo.

Segundo Colen (2006) fungos inferiores possuem grandes hifas e zona periférica de crescimento abrangente, por isso crescem e espalham-se rapidamente por toda a placa de Petri podendo dificultar a detecção dos halos de hidrólise. O mesmo autor relata que os sais biliares possuem efeito inibitório no crescimento dos fungos favorecendo assim a detecção do halo de hidrólise da carboximetilcelulose e que os sais biliares afeta de algum modo às taxas de fluxo protoplasmático no ápice das hifas. Desse modo, foi necessária a adição de 0,2% de sais biliares no meio de cultura ágar carboximetilcelulose 1% para evitar o crescimento das colônias em toda a placa e favorecer a visualização dos halos de hidrólise, o que pode ser visualizado na Figura 17.

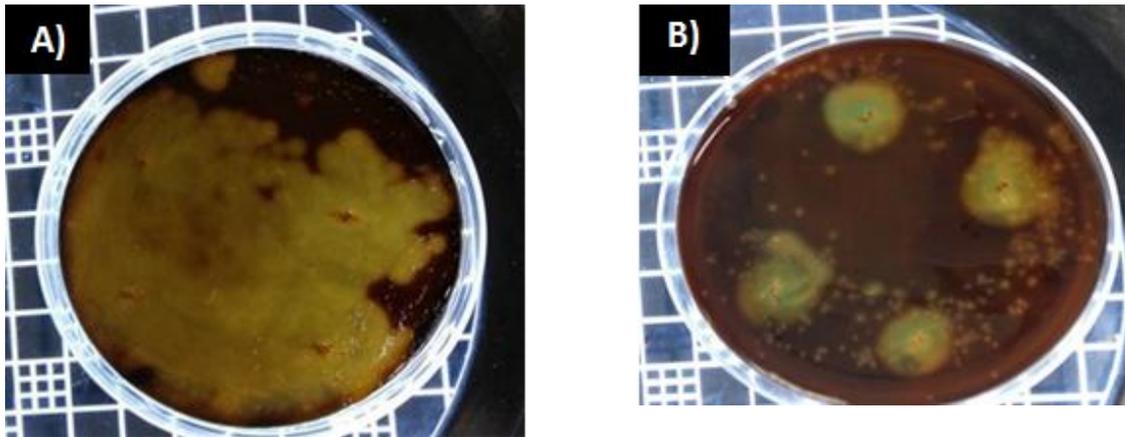


FIGURA 16 – A) Crescimento espalhado de fungo filamentoso dificultando a visualização de halos em ágar sem sais biliares. B) Halos claros ao redor da colônia (resultados positivos) em meio de cultura ágar CMC 1% acrescido 0,2% de sais biliares de após sete dias de incubação a 30°C seguido de revelação com solução iodo

Os resultados dos valores dos índices enzimáticos (IE) dos fungos filamentosos estão apresentados na Figura 18. Dentre os isolados o índice enzimático variou de 1,92 a 8,54. Destes, apenas o isolado BP3, com IE 1,92, apresentou IE inferior a 2. Já o isolado CA28 apresentou o maior IE, 8,54. (Figura 18).

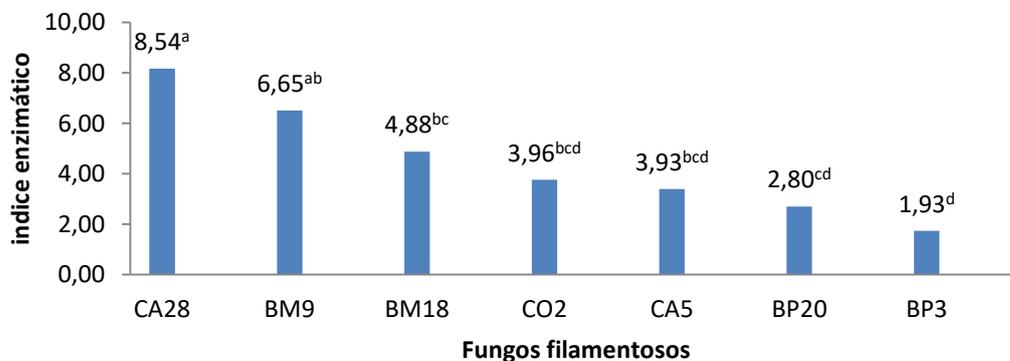


FIGURA 17 - Índice enzimático (IE) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade

Fernandes (2009), testou 24 fungos isolados de diversas fontes, potencialmente produtores de celulasas, destes, 6 apresentaram IE maior do que 2, entretanto, o maior valor relatado foi 5,83. Pereira (2012), em um estudo sobre avaliação do potencial de produção de celulasas de fungos filamentosos

obteve IE 1,6 para *Penicillium* EPAMIG/FA10, IE 2,0 para *Aspergillus* EPAMIG/FA12, IE 2,1 para *Penicillium* EPAMIG/FA2, IE 2,1 para *Penicillium* EPAMIG/FA9, IE 2,5 para *Penicillium* EPAMIG/FA8, IE 3,0 para *Aspergillus* UFLA/FN17, IE 3,7 para *Fusarium* UFLA/FN18, IE 4,3 para *Trichoderma* EPAMIG/FA13, IE 5,3 para *Penicillium* UFLA/FN20, IE 5,7 para *Penicillium* UFLA/FN9, IE 7,2 para *Penicillium* EPAMIG/FA11, IE 7,7 para *Aspergillus* EPAMIG/FA4, IE 11,0 para *Aspergillus* UFLA/FN15, IE 14,3 para *Penicillium* UFLA/FN19 e IE 28,3 para *Aspergillus* EPAMIG/FA14.

De acordo com o teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade os isolados BM9 e BP20, com IE respectivamente 6,65 e 2,80 apresentaram diferença significativa entre si, assim como os fungos isolados BM18 e BP3 com IE respectivamente, 4,88 e 1,92 . Já os fungos isolados CA28 e BM9 com IE respectivamente 8,54 e 6,65 não apresentaram diferença significativa entre si, assim como os fungos isolados BM18, CO2 e CA5, com IE respectivamente 4,88, 3,96 e 3,93 (Figura 18).

A detecção do halo claro ao redor da colônia depende do crescimento do fungo, produção e liberação de enzimas, atividade e especificidade da enzima pelo substrato utilizado no ensaio e da sensibilidade da técnica de detecção de atividade enzimática. Além disso, depende da composição do meio de cultura, pois, algumas substâncias químicas contidas no meio de cultura podem inibir a ligação do corante aos polissacarídeos ou provocar precipitação do corante causando resultados falso-positivos (COLEN, 2006; RUEGGER & TAUK-TORNISELO, 2004)

De acordo com Ruegger & Tauk-Torniselo (2004) o valor do índice enzimático não é um parâmetro adequado de avaliação de atividades enzimática entre diferentes linhagens de fungos. Entretanto, o índice enzimático pode ser utilizado como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido.

5.1. Seleção secundária em meio líquido (Fermentação submersa)

Os fungos previamente selecionados na etapa anterior, ou seja que produziram halo de hidrólise em meio sólido CMC 1% foram submetidos ao processo de fermentação submersa, em meio contendo celulose microcristalina. Os preparados brutos enzimáticos obtidos foram avaliados qualitativamente (difusão em gel) e quantitativamente (determinação de atividade celulolítica total - FPase).

5.1.1. Ensaio qualitativo: difusão de gel

Os resultados do ensaio de difusão de gel de ágar em placa foram interpretados qualitativamente, ou seja, foi avaliada a presença ou ausência de enzimas com atividade celulolítica total nos preparados brutos enzimáticos (Quadro 7). Todos os fungos filamentosos testados excretaram celulasas no caldo fermentado (preparado bruto enzimático). Isso foi constatado pela formação de halos claros ao redor dos poços, ou seja, ocorreu a degradação do substrato carboximetilcelulose (Figura 19).

QUADRO 6

Resultado dos ensaios de difusão em gel dos preparados brutos enzimáticos obtidos com os isolados produtores de celulasas em diferentes tempo de fermentação

Preparados brutos enzimáticos	Tempos de fermentação (horas)			
	24h	48h	72h	96h
CA28	+	+	+	+
BM9	+	+	+	+
BM18	+	+	+	+
CO2	+	+	+	+
CA5	+	+	+	+
BP20	+	+	+	+
BP3	+	+	+	+

(+) presença de halo claro ao redor do poço

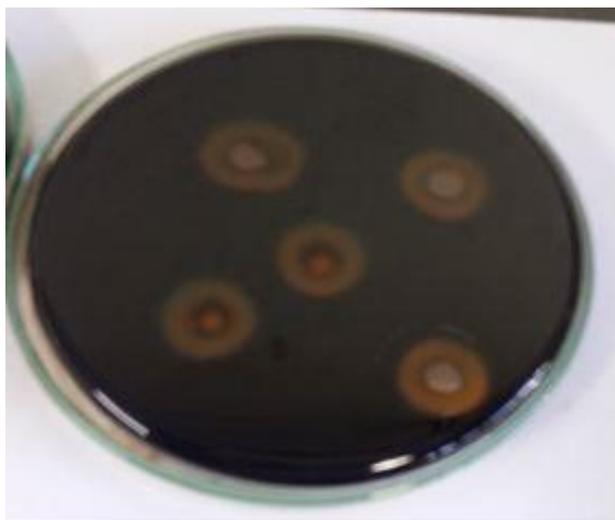
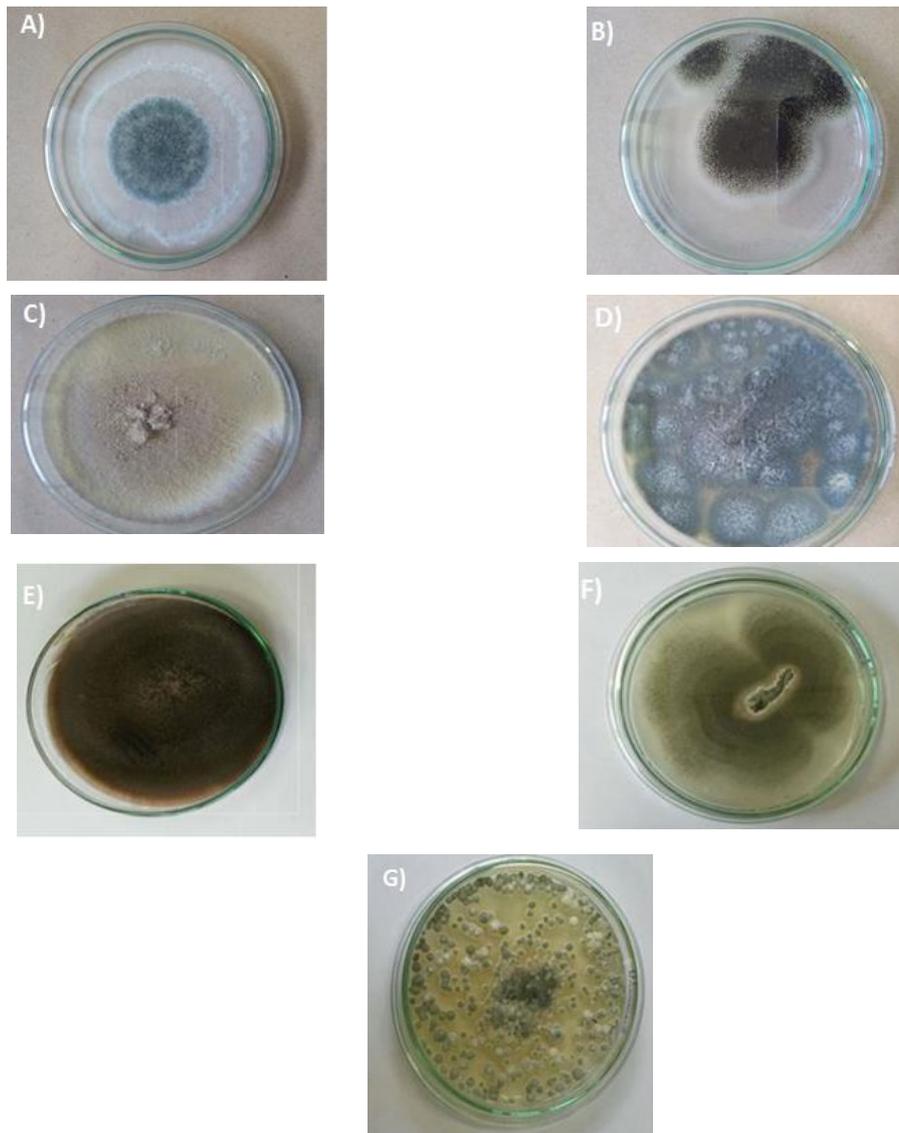


FIGURA 18 - Formação de halos claros em torno dos poços pela técnica de difusão em gel, após revelação com iodo.

Hargreaves (2008), em um estudo de bioprospecção de novas celulases provenientes de fungos da floresta amazônica utilizando a técnica de difusão em gel evidenciou que 100% dos fungos que produziram halos claros ao redor das colônias em meio CMC na seleção primária, também produziram halos claros ao redor dos poços contendo o preparado bruto enzimático proveniente de fermentação submersa. Hargreaves (2008). ainda avalia o diâmetro dos halos e o grau de transparência dos halos claros ao redor dos poços, evidenciando que tais variações são influenciadas pelos fatores relatados anteriormente por Shelley et al. (1987), Giongo et al. (2006) e Gonçalves et al. (2007).

5.2. Descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias.

Os fungos filamentosos que produziram halo claro ao redor da colônia na seleção primária foram submetidos à descrição das características morfológicas macroscópicas das colônias (Figura 20).



- A) BM18: Colônia filamentosa, algodonofo, anverso centro verde escuro circular, anverso borda branca e reverso branco. .
- B) CA28: Colônia filamentosa, anverso granuloso negro e reverso pregueado branco.
- C) BM9: Colônia filamentosa, pulverulenta, anverso bege e reverso creme.
- D) CA5: Colônia filamentosa, pulverulento, anverso verde acinzentado e reverso branco.
- E) BP20: Colônia filamentosa, anverso centro aveludado cinza, anverso borda pregueada marrom, reverso centro preto e borda marrom.
- F) BP3: Colônia filamentosa. anverso aveludado, verde com fundo bege reverso bege
- G) CO2: Colônia filamentosa, anverso verde com bordas circular branca e amarela, reverso bege.

FIGURA 19 - Fotografias dos fungos filamentosos selecionados evidenciando as características morfológicas macroscópicas das colônias.

5.3. Identificação convencional dos fungos filamentosos por microcultivo

Todos os preparados brutos enzimáticos obtidos na fermentação submersa com os fungos filamentosos que formaram halo claro ao redor dos poços na seleção secundária foram submetidos à identificação dos gêneros utilizando a técnica de microcultivo e estão apresentados no Quadro 8.

QUADRO 7

Identificação convencional de fungos filamentosos produtores de celulases, isolados de resíduos agroindustriais.

Isolado	Gênero identificado	Origem do resíduo agroindustrial
BM18	Não identificado	Bagaço de cana de açúcar seco moído
BP3	<i>Aspergillus</i> sp.	Bagaço de cana de açúcar seco pedaços
CA28	<i>Aspergillus</i> sp.	Casca de amendoim
BM9	<i>Penicillium</i> sp.	Bagaço de cana de açúcar seco moído
CA5	<i>Aspergillus</i> sp.	Casca de amendoim
CO2	<i>Aspergillus</i> sp.	Casca de coco seca
BP20	<i>Curvularia</i> sp.	Bagaço de cana de açúcar seco pedaços

Não foi possível determinar o gênero do isolado BM18 utilizando a técnica de identificação convencional. Estudos futuros poderam ser realizados para a identificação molecular do isolado BM18 assim como a identificação ao nível de espécie dos demais isolados.

5.3.1. Ensaio quantitativo: Determinação da atividade celulolítica total (Fpase)

A atividade celulolítica total foi determinada pela ação sinérgica dos três grupos de enzimas (exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases) (ASTOLFI, 2014). Os resultados de atividade enzimática celulolítica total (FPase) no presente trabalho considerou 1 unidade internacional (UI) equivalente a 1 μ mol de glicose liberada por minuto, que corresponde a 0,18 mg de glicose por minuto, sendo, portanto, a atividade enzimática celulolítica

total expressa pela unidade internacional FPU.mL⁻¹. Conforme apresentado no Quadro 8, todos os isolados que apresentaram resultado positivo na seleção primária apresentaram atividade celulolítica total no preparado bruto enzimático obtido na fermentação submersa.

Conforme mostrado na Figura 21 os fungos *Aspergillus* sp.CA28 e *Aspergillus* sp.CA5 apresentaram os maiores valores de atividade celulolítica total com 24 horas de fermentação, enquanto os fungos *Aspergillus* sp.BP3 e *Aspergillus* sp.C02 obtiveram os maiores valores de atividade com 72 horas de fermentação. Entre todos os fungos avaliados o *Aspergillus* sp.CO2 apresentou o maior valor de atividade celulolítica (0,05013 FPU.mL⁻¹), com 72 horas de fermentação, no entanto este valor não diferiu significativamente dos valores de atividade encontrados para os fungos *Aspergillus* sp.CA5 e *Aspergillus* sp.CA28 com 24 horas de fermentação (Figura 27) (Tabela 10 APÊNDICE A).

Resultados semelhantes ao presente estudo também foram obtidos por Junior (2012), em estudo sobre a produção de celulases por fermentação submersa utilizando fungos prospectados de coleções de culturas nacionais. Neste estudo os resultados de atividade celulolítica total obtidos foram 0,0006 FPU.mL⁻¹, 0,029 FPU.mL⁻¹, 0,038 FPU.mL⁻¹, 0,028 FPU.mL⁻¹, 0,009 FPU.mL⁻¹ e 0,0016 FPU.mL⁻¹, respectivamente com os fungos *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT040, *Trichoderma* sp. LCB79, *Trichoderma* sp. INPA666, *Trichoderma* sp. INPA1014, *Trichoderma* sp. INPA1218.

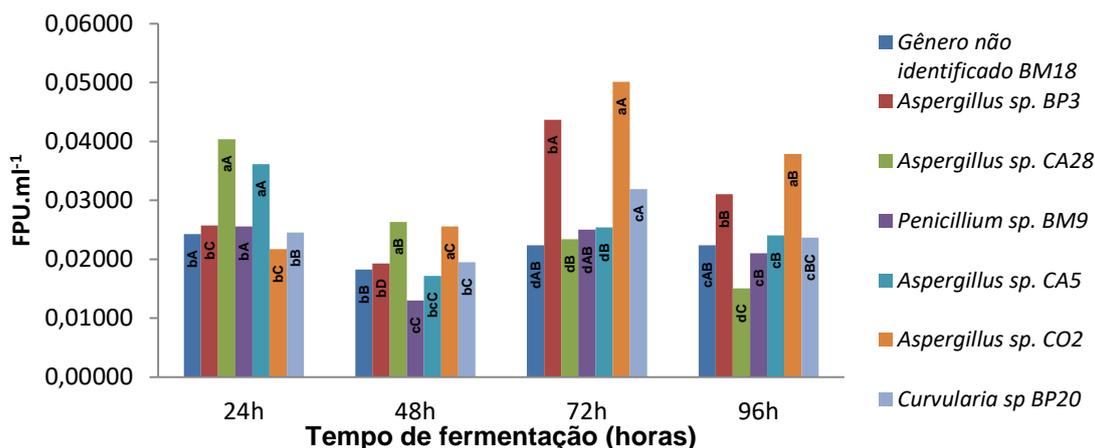


FIGURA 20- Atividade celulolítica total (FPU.mL⁻¹) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Martins et al. (2008), relataram atividade enzimática celulolítica total do preparado bruto enzimático de 0,27 FPU.mL⁻¹ após 192 horas de fermentação submersa contendo celulose microcristalina a temperatura de 37°C proveniente do fungo *Penicillium echinulatum*. Já Zanchetta (2012), em um estudo também utilizando celulose microcristalina relatou atividade celulolítica total de 0,4 FPU.mL⁻¹ após 48 horas de fermentação submersa e 0,9 FPU.mL⁻¹ após 72 horas de fermentação submersa, ambas as fermentações a temperatura de 45°C, para os fungos *Humicola grisea*, *Chaetomium* sp. N13, respectivamente. Valores superiores encontrados no presente estudo.

Além de fermentações submersas utilizando substratos purificados como celulose microcristalina diversos estudos têm investigado a produção de enzimas celulasas utilizando para a fermentação submersa ou em estado semi-sólido materiais lignocelulósicos tais como palha de arroz, farelo de trigo, cevada entre outros. Singhvi et al.. (2011), em um estudo de produção de celulasas relataram a combinação de celulose microcristalina e farelo de trigo utilizando *Penicillium janthinellum* NCIM 1171, o estudo demonstrou atividade enzimática celulolítica de 1,21 FPU.mL⁻¹ e 11,1 FPU.g⁻¹ para fermentação submersa e em estado solido respectivamente. Em mesmo estudo utilizando como substrato para fermentação a combinação de tiras de papel e farelo de

trigo o autor relatou atividade enzimática celulolítica de 0,40 FPU.mL⁻¹ e 7,40 FPU.g⁻¹ para fermentação submersa e em estado solido respectivamente.

Zanchetta (2012), relatou atividade celulolítica total de 0,7 FPU.mL⁻¹ após 48 horas fermentação submersa utilizando palha de arroz e farelo de trigo, 0,4 FPU.mL⁻¹ após 72 horas de fermentação submersa utilizando bagaço de cana e farelo de trigo e 0,7 FPU.mL⁻¹ após 48 horas fermentação submersa utilizando cevada e farelo de trigo, respectivamente para os fungos *Chaetomium* sp. N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. No entanto, a comparação dos estudos é dificultada já que os autores citados trabalharam com fungos de diferentes espécies e em diferentes condições de fermentação em relação ao presente estudo.

Embora a produção da maioria das celulasas de origem microbiana seja induzida por celulose, a exclusividade deste indutor pode não ser suficiente para a produção de celulasas, considerando que a molécula de celulose é insolúvel. Desta forma, diversos estudos relatam a utilização de substratos tais como: carboximetilcelulose, celobiose, sorbitol, glicose, sacarose, lactose, xilose como indutores combinados ou isolados (ANDRADE, 2015; HARGREAVES, 2008; JUNIOR, 2012).

Nascimento (2013), em um estudo que avaliou a atividade enzimática celulolítica total de fungos isolados do fruto da macaúba utilizando fermentação submersa contendo carboximetilcelulose, evidenciou atividade enzimática celulolítica total de 0,015 FPU.mL⁻¹ após 96h de fermentação submersa para o preparado bruto enzimático do fungo *Penicillium* sp. e 0,017 FPU.mL⁻¹ após 72h de fermentação submersa para o preparado bruto enzimático do fungo *Fusarium* sp. Resultados inferiores aos do presente estudo.

Junior (2012) em estudo investigando a produção de celulasas utilizando quatro tipos de açúcares solúveis: glicose, sacarose, lactose e xilose combinados com celulose em fermentação submersa utilizando fungos de coleções de culturas nacionais obteve melhores resultados para a linhagem de *Trichoderma* sp. INPA 666 (0,046 FPU.mL⁻¹) após 72 horas de fermentação

submersa utilizando celulose microcristalina e sacarose. Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

Vale ressaltar, que nas fermentações submersas do presente estudo o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 4,8. Na literatura consultada é relatado que este pH é o mais indicado para uma melhor produção de celulasas (CARVALHO, 2010; CUNHA et al., 2012; JUNIOR, 2012; SINGH et al., 2009). Sternberg et al. (1976), em um estudo investigando a estabilidade de celulasas utilizando *Trichoderma viride* demonstrou que a faixa de pH entre 3,0 e 4,0 é deletéria para atividade de β -glicosidases e a faixa de pH inferior a 3,0 é deletéria para Fpase (exoglucanases) e CMCase (endoglucanases). Sendo, portanto, a faixa de pH mais adequada para a produção de enzimas celulolíticas a faixa de pH entre 5,0 e 6,0.

Conforme já amplamente descrito na literatura, o índice enzimático não é um parâmetro adequado para avaliar quantitativamente a atividade enzimática. Neste estudo o fungo CA28 apresentou IE de 8,54 sendo este valor superior ao IE do fungo CO2 3,97 ($p < 0,05$). Entretanto, a atividade celulolítica total do fungo CA28 foi inferior à atividade celulolítica total do fungo CO2 ($p < 0,05$), Sendo a atividade celulolítica total de $0,04034 \text{ FPU.mL}^{-1}$ (24h) e $0,05013 \text{ FPU.mL}^{-1}$ (72h), respectivamente para os fungos CA28 e CO2 (Figura 27).

Resultado semelhante ocorreu com o fungo BP3 que apresentou IE de 1,74 sendo este valor inferior ao IE do fungo BM9 6,65 ($p < 0,05$). Entretanto, a atividade celulolítica total do fungo BP3 foi superior à atividade celulolítica total do fungo BM9 ($p < 0,05$), Sendo a atividade celulolítica total de $0,04367 \text{ FPU.mL}^{-1}$ (72h) e $0,02502 \text{ FPU.mL}^{-1}$ (72h), respectivamente para os fungos BP3 e BM9 (Figura 27).

Embora o parâmetro utilizado neste estudo para quantificar a atividade celulolítica tenha sido FPase, ou seja, atividade celulolítica total, vale ressaltar a importância da quantificação de CMCase (endoglucanases) e β -glicosidases já que os fungos produzem diferentes quantidades de enzimas do complexo celulolítico. Por exemplo, o sistema celulolítico do *T. reesei* é composto de até 80% de exoglucanases, 20 a 36% de endoglucanases e apenas 1% de β -

glicosidases. Portanto, é importante a investigação de endoglucanases e β -glicosidases em um estudo futuro possibilitando dados mais abrangentes.

As enzimas comerciais tais como: Celluclast FG®, Spezyme® e GC220 amplamente utilizadas possuem atividade enzimática celulolítica de 77,426 FPU.mL⁻¹, 11,714 FPU.mL⁻¹ e 10,370 FPU.mL⁻¹ respectivamente. Essas enzimas são na realidade preparados enzimáticos, ou seja, possuem mais de uma celulase em proporções adequadas que muitas vezes são obtidas provenientes de mais de um fungo em diversas condições de fermentação (CARVALHO, 2007; HARGREAVES, 2008).

Oscilações na produção de enzimas com atividade celulolítica total foram observadas ao longo do tempo de fermentação submersa dos fungos (BM18, BP3, BM9, CA5, CO2 e BP20) ($p < 0,05$). Apenas o preparado bruto enzimático proveniente do fungo CA28 apresentou decréscimo da atividade celulolítica total sem oscilações ao longo dos tempos de fermentação submersa, apresentando 0,0403 FPU.mL⁻¹ (24h), 0,0263 FPU.mL⁻¹ (48h), 0,0234 FPU.mL⁻¹ (72h) e 0,0150 FPU.mL⁻¹ (96h), sendo ($p < 0,05$) nos tempos de 24h, 48h e 96h e ($p < 0,05$) para os tempos 48h e 72h (Figura 27), provavelmente devido a produção de proteases já que as proteases podem interferir nas taxas de produção da enzima de interesse do processo fermentativo, pois são responsáveis por catalisar a reação de hidrólise de ligações peptídicas de proteínas, ou seja, de enzimas (NASCIMENTO, 2013).

Os preparados brutos enzimáticos provenientes dos fungos (BM18, BP3, CA28, BM9, CA5, e BP20) apresentaram decréscimo de atividade celulolítica total nos intervalos de 24h e 48h ($p < 0,05$). Apenas o preparado bruto enzimático proveniente do fungo CO2 não apresentou oscilação ($p < 0,05$) no intervalo de 24h e 48h (Figura 27).

O preparado bruto enzimático proveniente do fungo BP3 apresentou um perfil de produção de enzimas com atividade celulolítica total de decréscimo e aumento em intervalos regulares ($p < 0,05$). Os valores de atividade celulolítica total observados foram 0,02572 FPU.mL⁻¹ (24h), 0,01929 FPU.mL⁻¹ (48h),

0,04367 FPU.mL⁻¹ (72h) e 0,0310 FPU.mL⁻¹ (96h) sendo (p<0,05) em todos os intervalos (Tabela 10 APÊNDICE A).

Zanchetta (2012), em estudo investigando a produção de celulases por fermentação submersa com fungos filamentosos, relatou oscilações significativas de atividade enzimática celulolítica de FPase, CMCase e β-glicosidases ao longo dos tempos de fermentação submersa. É importante ressaltar que as enzimas dos fungos filamentosos são secretadas pelas pontas das hifas, por isso os níveis de ramificação dos micélios estão diretamente relacionados com o número de extremidades de hifas potencialmente secretoras, portanto, é importante que em estudos futuros seja estimado o crescimento dos fungos (biomassa total) nos diferentes tempos de fermentação submersa (COLEN, 2006).

Assim como as condições fisiológicas do fungo, a composição química do meio de cultivo também pode afetar a indução e secreção das enzimas. Camassola & Dillon (2007), relataram que a produção das enzimas com atividade celulolítica é favorecida em meio de cultivo formulado com misturas de substratos, em detrimento de meios de cultivo com apenas um substrato. Portanto, é importante investigar em estudos futuros a utilização de diferentes substratos em uma mesma fermentação submersa.

5.4. Ensaio quantitativo: Determinação de proteínas totais

Os valores de proteínas totais variaram entre 0,03970 mg.mL⁻¹ (BM18 72h) e 0,49141 mg.mL⁻¹ (BP3 24h) (Quadro 9 APÊNDICE B). Ferreira et al., 2011, em um estudo sobre a produção de endoglucanase utilizando fermentação em estado sólido com resíduo de cajá sob ação do fungo *Aspergillus niger*, obteve valores de proteína total de 0,080 mg.mL⁻¹, 0,064 mg.mL⁻¹ após 96h de fermentação com umidades de 50% e 60% respectivamente.

As enzimas com atividade celulolítica são extracelulares, assim como as lipases, proteases, amilases entre outras. Uma mesma espécie de fungo filamentoso é capaz de secretar inúmeros tipos de enzimas extracelulares

(NASCIMENTO, 2015). *T. reesei* produz proteínas extracelulares incluindo celulasas naturalmente em grandes quantidades. Linhagens de *T. reesei* mutantes têm sido relatadas como produtoras de grandes quantidades de proteínas (acima de 40 mg.mL^{-1}) em meio de cultura em condições ótimas (MAEDA, 2010).

Vale ressaltar que a produção de proteases em fermentações por um determinado microrganismo pode afetar a ação de outras enzimas, como as celulasas, já que são responsáveis por catalisar a reação de hidrólise de ligações peptídicas de proteínas. Desta forma, as proteases podem interferir nas taxas de produção da enzima de interesse do processo fermentativo. Portanto, é recomendável que em estudos futuros seja avaliada a produção de proteases durante o cultivo com a verificação da possível associação entre a produção das mesmas e a diminuição de produção de celulasas (NASCIMENTO, 2013).

5.5. Ensaio quantitativo: Determinação da atividade específica

De modo geral, na literatura, existe uma tendência em expressar a atividade enzimática celulolítica apenas com a unidade internacional U.mL^{-1} (CARVALHO, 2013). No entanto, no presente estudo a atividade enzimática celulolítica total específica também foi calculada. A atividade enzimática específica do preparado bruto enzimático foi calculada pela razão entre a atividade celulolítica e o conteúdo de proteínas totais estimada pelo método de Bradford (1976).

Os parâmetros de comparação dos valores de atividade específica com a literatura ficam comprometidos pela ausência de padronização de uma unidade. Por isso, os resultados de atividade específica deste estudo foram expressos em $\text{FPU.}\mu\text{g}^{-1}$ de proteína, FPU.mg^{-1} de proteína e FPU.g^{-1} de proteína (Carvalho, 2013) (Tabela 10, 11, 12, 13 APÊNDICE A). Os valores de atividade específica variaram entre $0,04755 \text{ FPU.mg}^{-1}$ de proteína (CO2 24h) e $0,56407 \text{ FPU.mg}^{-1}$ de proteína (BM18 72h) ($p < 0,05$) (Figura 28).

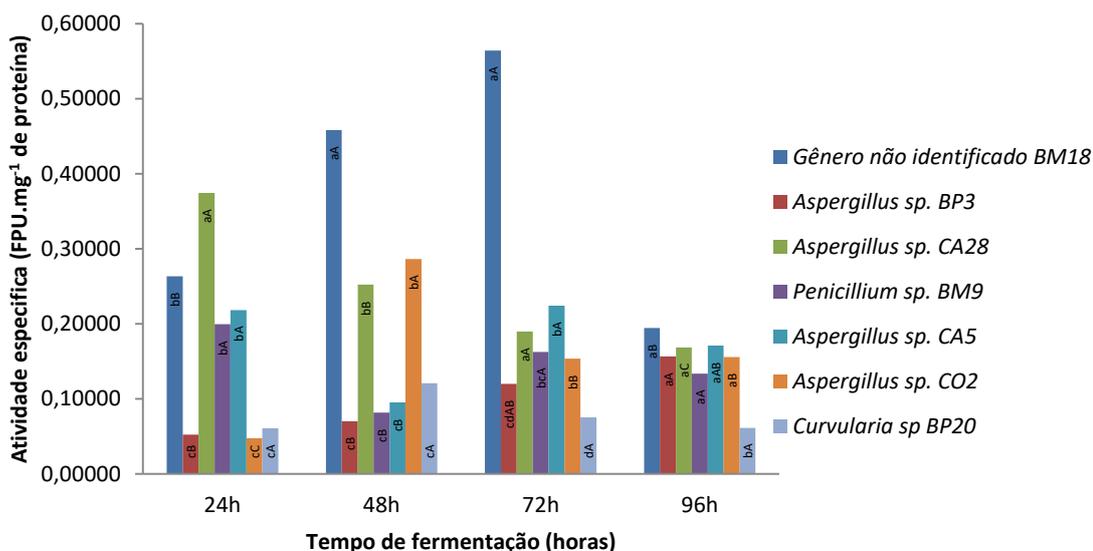


Figura 21 - Atividade específica (FPU.mg⁻¹ de proteína) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ferreira et al. (2011), em um estudo sobre a produção de endoglucanase por fermentação em estado sólido, em resíduo de cajá, com o fungo *Aspergillus niger*, obteve valores de atividade específica entre 0,578 FPU.mg.mL⁻¹ e 3,186 FPU.mg.mL⁻¹ após 24 horas em meio de cultivo com 70% de umidade e após 72 horas de fermentação em meio com 50% de umidade. Os valores obtidos por esses autores com 24 horas de fermentação foram semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Carvalho (2013) em estudo sobre produção de enzimas celulolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro, obteve atividade específica de endoglucanases de 0,014 Uμg⁻¹ de proteína, em fermentação submersa, utilizando farelo de trigo, com *Cryptococcus laurentii*. Os melhores resultados de atividade específica de β-glicosidases obtidos por esse mesmo autor, foram 0,983 Uμg⁻¹ e 0,916 Uμg⁻¹ de proteína com a linhagem UFLA CES-Y 519 em meio com bagaço de cana de açúcar e palha de milho, respectivamente. Carvalho (2013), em mesmo estudo também relata atividade específica de β-glicosidases de 0,080 Uμg⁻¹, 0,169 Uμg⁻¹, 0,184 Uμg⁻¹ e 0,608 Uμg⁻¹ de

proteína em fermentações submersas, utilizando a linhagem de levedura UFLA CES-Y 519, em meio de cultivo, contendo carboximetilcelulose, casca de cacau, palha de cana de açúcar, farelo de trigo, respectivamente.

Valores inferiores ao do presente trabalho foram relatados por Gasparotto (2014) em um estudo sobre a produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei*, em fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de cana de açúcar. Esse mesmo autor, relatou em escala laboratorial uma atividade específica celulolítica total de 1,4 FPU.g⁻¹ de proteína e um valor aproximadamente três vezes maior com o aumento de escala de produção em um biorreator de leito fixo com aeração forçada com capacidade para 70 g de substrato.

Já valores superiores foram relatados por Liu et al. (2011) e Zhao et al. (2010). Liu et al. (2011) em um estudo de produção de celulases por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus fumigatus* Z5 e palha de milho verificou uma atividade específica de 144,6 FPU.g⁻¹ de proteína em 30 horas de fermentação. Zhao et al. (2010), em um estudo de produção de celulases por fermentação em estado sólido utilizando *Trichoderma* sp. 3.2942 e farelo de trigo e casca de arroz (pré-tratados em micro-ondas), verificou uma atividade específica de 7,69 FPU.g⁻¹ de proteína em 48 horas de fermentação.

Os fungos selecionados no presente estudo apresentam potencial para a produção de celulases, no entanto são necessários estudos de otimização das condições de fermentação.

6. CONCLUSÃO

Foram selecionados um total de sete fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Curvularia* sp. com potencial de produção de celulases.

Todos os fungos filamentosos que apresentaram índice enzimático maior do que 1 apresentaram atividade celulolítica total nos preparados brutos enzimáticos, obtidos na fermentação submersa. Os resultados de atividade celulolítica total encontrados, confrontados com a literatura demonstram que existe potencial para obtenção de maior produção de celulases com os fungos selecionados, no entanto são necessários estudo de otimização das condições de fermentação.

Oscilações de produção de enzimas com atividade celulolítica total foram observadas ao longo do tempo de fermentação no processo submerso com os fungos (BM18, *Aspergillus* sp. BP3, *Penicillium* sp. BM9, *Aspergillus* sp. CA5, *Aspergillus* sp. CO2 e *Curvularia* sp BP20). Portanto, é importante que em estudos futuros seja estimado o crescimento dos fungos (biomassa) nos diferentes tempos de fermentação submersa e a produção de proteases.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a produção (fermentação submersa) de preparado bruto enzimático dos fungos selecionados utilizando outros substratos indutores como CMC, glicose, sacarose, lactose e diferentes fontes de celulose;
- Avaliar a produção de preparado bruto enzimático utilizando fermentação em estado semi-sólido;
- Utilizar para a fermentação em estado semi-sólido resíduos agroindustriais tais como: palha de arroz, bagaço de cana, casca de amendoim, casca de alho entre outros.
- Caracterizar a atividade celulolítica total do preparado bruto enzimático frente a diferentes temperaturas e pH;
- Otimizar as condições de fermentação para a obtenção de preparado bruto enzimático do fungo filamentososo BM18 que apresentou melhor atividade específica celulolítica total;
- Realizar a identificação do fungo BM18;
- Determinar a atividade enzimática celulolítica: endoglucanases e β -glicosidases;
- Após a otimização das condições de produção realizar um ensaio de fermentação em biorreator mecanicamente agitado;
- Caracterizar o preparado bruto enzimático;
- Purificar parcialmente as celulasas do preparado bruto enzimático;
- Desenvolver um estudo para a aplicação de celulase na área de tecnologia de alimentos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, Larissa, C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**, 2012, 119f, Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AGUIAR, C.L; MENEZES, T.J.B, Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar, **B CEPPA**, Curitiba, v. 18, n.1, p.57-70, jan-jun, 2000.

ALEXANDRINO, A.M, Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr), **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n, 2, p. 364-368, abr-jun, 2007

ASTOLFI, V, **Produção de celulases e hemicelulases por fermentação em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais**, 2014, 114f, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

BALSAN, G.A, **Caracterização de uma celulase comercial visando a hidrólise de resíduos agroindustriais**, 2011, 82f, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2011.

BASSO, T.P; GALLO, C.R; basso, I,c, Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição, **Pesq. agropec. bras**, v. 45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BEGUIN,P; AUBERT.J.P, The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 25-58, 1994

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

BHANU PRAKASH, G.V.S; PADMAJA,V; SIVA KIRAN,R.R, Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v. 99, p.1530–1537, 2008

BON, E. P. S, et al. Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado; Interciência, Rio de Janeiro, 2008, 506p.

BORTOLAZZO, Nara, G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**, 2011, 76f, Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros, Piracicaba, 2011.

BRADFORD, M.M, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, M.S, et al., Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.4, p.111-117, 2008.

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

CARVALHO, M.L, **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana de açúcar**, 2011, 102f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CARVALHO, F, P. **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro**, 2013, 118f, Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and hygiene**, 1939.

CASTRO, Aline, M. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais, **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CAVALCANTI, S,D,B, **Aplicações de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2010, 61f, Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

CUNHA, M.F, **Desenvolvimento de processo não-convencional para a produção de celulases por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**, 2011, 101f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DAROIT, D.J, **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***, 2007, 125f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

DELATORRE, A.B. **Produção de celulases por microrganismo termofílico *Bacillus sp* SMIA-2**, 2010, 55f, Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goitacazes, 2010.

- DIAS, Mariana, **Diversidade e produção de celulases por bactérias epifíticas de frutos típicos do cerrado mineiro**, 2012, 110f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- DINGLE, J; REID, W. W; SOLOMONS, G. L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup plate” assay to the estimation of enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 4, p. 149-155, 1953.
- DONATO, A. **Bioprospecção de fungos produtores de fitase em solo e serapilheira da floresta estacional semidecídua no bioma cerrado, Sete Lagoas – MG**, 2013, 59f, Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.
- ESTELLER, M.S; BORGES, R.A, Aplicação de enzimas celulolíticas em alimentos, **IT**, p, 50-53, 2008,
- FACCHINI, F.D,A, **Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes**, 2010, 164f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- FAGUNDES, N.S, et al., Enzimas na alimentação de ruminantes, **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 1, p. 498-503, janeiro-fevereiro, 2008.
- FARINAS, Cristiane, S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação, **Embrapa Instrumentação Documentos**, n, 54, dezembro, 2011.
- FERNANDES, A.P, **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**, 2009, 58 f, Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- FERREIRA, A,N, et al., Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá, **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr-jun. 2011.
- FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp***, 2011, 83f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- GAUTAM, S.P, et al., Optimization of the medium for the production of cellulose by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation, **International journal of environmental sciences**, v. 1, n.4, p. 656-665, 2010
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 39, p. 257-268, 1987.

- GIONGO, J.L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 2006, 81f. Dissertação (Mestrado Microbiologia agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- GONÇALVES, F. A. G, **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**, 2007. 66f, Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- GONG, C.S; TSAO, G.T, Cellulase and biosynthesis regulation, **Annual Reports on Fermentation Processes**, v, 3, 1979
- HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, S.L, The use of solid media for detection pf enzumes production by fungi, **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607.
- HARGREAVES, P. I, **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**, 2008, 75f, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- HERCULANO, P.N, et al., Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis L.*), **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 5, p. 1416-1422, may, 2011.
- HOLKER, U; LENZ, J, Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages?, **Current Opinion in Microbiology**, V, 5, n. 3, p. 301-306, 2005
- JUNIOR, Genilton, S, P. **Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais**, 2011, 76f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- LYND, L.R, et al., Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, **Microbiology and Molecular Biology Reviwes**, v. 66, n.3, p, 506-577, 2002.
- KASANA R.C, et al., A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine, **Curr Microbiol**, v. 57, p. 503–507, 2008
- KOCHER, G; KAIRA, K; BANTA, G, Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230, **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, 2007
- LI, N; ZONG, M.H, Lipase from de genus *Penicillium* production purification characterization and applications, **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic**, v.66, p. 43, 2010.

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

MACHADO, C.M.M, **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**, 1. ed, Brasília, Editora técnica Embrapa, 2013, 319 p.

MAEDA, R.N, **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração**, 2010, 197 f, Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v.95, p. 391-414, 1969.

MARCO, Évillin, G. **Produção e caracterização de celulases por isolado de *Bacillus sp***, 2012, 87f, Dissertação (Mestrado em Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MARTINS, L. F, et al., Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p.1417–1424, 2008.

MARTINS, L.F, **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***, 2005, 121f, Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

MUCURI, L.N.M, **Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria**, 2012, 95f, Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

NAIME, M.F, **Isolamento de fungos com atividade nematofágica em solo paranaense**, 2009, 63f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NASCIMENTO, C, S. **Otimização da produção de lipase e celulase por fermentação submersa utilizando a torta da polpa e fungos isolados do fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**, 2015, 137f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

NOGUEIRA, E.B.S; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

OLIVEIRA, S.L.R, **Aproveitamento da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) para a produção de celulases**, 2010, 67f, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, S.L.R, **Otimização da produção de celulases de *Melanoporia* sp. por fermentação submersa**, 2014, 112f, Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n.2, p. 81-84, mar, 2003.

PARK, Y.K, et al., Biotransformação de isoflavonas de soja: Aplicação da biotecnologia enzimática na conversão de isoflavonas com maior atividade biológica, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 12-14, maio-junho, 2001

PEREIRA, L.L.S, et al. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto, **Rev. bras. plantas med**, v. 12, n. 4, oct-dec, 2010

PEREIRA, V.M, **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização de produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**, 2012, 111f, Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Universidade Fderal de Lavras, Lavras, 2012.

PEREIRA, P, E, Douglas. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013, 84f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

RAMANI, G. et al., Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1, **Appl Biochem Biotechnol**, v. 167, p. 959–972, 2012.

RIDELL, R.W, Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture, **Mycologia**, v.42, p. 265-270, 1950.

ROCHA, N.R.A.F, **Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para a produção de etanol**, 2011, 89f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RUEGGER, M.J.S; TAUKE-TORNISIELO, S.M, Cellulase activity of fungi isolated from soil of the ecological station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil, **Revista Brasileira de botânica**, São Paulo, v. 27, n, 2, p. 205-211, mar-abr, 2004

SANTANA, M.L, **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***, 2010, 64f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

SANTOS, D.B, **Bioprospecção de micro-organismos produtores de celulase de resíduo de sisal**, 2010, 53f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

SANTOS, Alex. S. **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante**, 2011, 77f, Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

SANTOS, Flávia, R, S. **Produção, caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerado sul-mato-grossense**, 2014, 69f, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SHELLY, A.W; DETH, H.C; MACRAE, I.C, Review of methods of enumeration detection and isolation of lipolytic, microorganisms with special reference to dairy applications, **J.Microbiol. Methods**, v.6, p. 127-137, 1987

SILVA, Lucas, A, D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***, 2008, 105f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas e Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SINGHANIA, R.R et al., Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINGHVI, M.S; ADSUL, M.G; GOKHALE, D.V, Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p.6569-6572, 2011

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of chemical pretreated rice straw by *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphous*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 69, p. 232-237, 2010.

SOUZA, A.C, **Utilização de celulases de leveduras para a produção de etanol de segunda geração**, 2011, 89f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

STERNEBERG, D, β -glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccarification of cellulose, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 648-654, 1976.

SUTO, M; TOMITA, F, Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305-311, 2001.

TONELOTTO, M. **Produção de celulases, purificação e caracterização bioquímico-cinética da B galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica**, 2012, 175f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

TUNCER, M, et al., Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25, **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p. 38-47, 1999.

TOLAN, J.K; FOODY, B. Cellulase from submerged fermentation, **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p.41-67, 1999.

VALADARES, F.L, **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermodinâmico**, 2013, 122f, Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

VIEIRA, D.A.P; FERNANDES, N.C.A.Q, **Microbiologia aplicada**, Inhumas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2012, p.17-19.

XIAO, Z; et al. Microplate-based assay to measure total cellulase activity, **Bioengineering and Biotechnology**, v.88, p.832-837, 2004.

ZANCHETTA, Ariane. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica**, 2012, 88f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.

ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G.; LIU, D. Microwave Pretreatment of substrates for Cellulase Production by Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 160, p. 1557-1571, 2010.

ZUNIGA, U.F.R, **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva de etanol de segunda geração**, 2010, 197f, Tese (Doutorado em Ciências de Engenharia Ambiental) – Universidade de São Paulo, 2010.

WILSON, D.C, Cellulases and biofuels, **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n.3, p. 295-299, jun, 2009

WOOD, T.M; MCCRAE, S.I, Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose, **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 181, p. 181-209, 1979.

WOLFROM, M.L; THOMPSON, A; BROWNSTEIN, A.M, Structures of Isomaltose and Gentiobiose, **Journal. American Chemistry Social**, v.80, n.8, p.2015-2018, 1958.

APÊNDICE A

TABELA 1

Atividade celulolítica total (FPU.mL⁻¹) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa

Tempo de fermentação submersa (horas)	Gênero não identificado BM18	<i>Aspergillus</i> sp. BP3	<i>Aspergillus</i> sp. CA28	<i>Penicillium</i> sp. BM9	<i>Aspergillus</i> sp. CA5	<i>Aspergillus</i> sp. CO2	<i>Curvularia</i> sp. BP20
24h	0,02427 ^{bA}	0,02572 ^{bC}	0,04034 ^{Aa}	0,02555 ^{bA}	0,03615 ^{aA}	0,02175 ^{bC}	0,02452 ^{bB}
48h	0,01828 ^{bB}	0,01929 ^{bD}	0,02633 ^{aB}	0,01299 ^{cC}	0,01715 ^{bcC}	0,02555 ^{aC}	0,01952 ^{bC}
72h	0,02239 ^{dAB}	0,04367 ^{bA}	0,02341 ^{dB}	0,02502 ^{dAB}	0,02541 ^{dB}	0,05013 ^{aA}	0,03192 ^{cA}
96h	0,02236 ^{cAB}	0,03106 ^{bB}	0,01506 ^{dC}	0,02103 ^{cB}	0,02405 ^{cB}	0,03789 ^{aB}	0,02367 ^{cBC}

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2

Valores de proteína total ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.

Tempo de fermentação submersa (horas)	Genero não identificado BM18	<i>Aspergillus</i> sp. BP3	<i>Aspergillus</i> sp. CA28	<i>Penicillium</i> sp. BM9	<i>Aspergillus</i> sp. CA5	<i>Aspergillus</i> sp. CO2	<i>Curvularia</i> sp BP20.
24h	0,09217 ^{dA}	0,49141 ^{aA}	0,10774 ^{dA}	0,12823 ^{cdA}	0,16570 ^{cAB}	0,45742 ^{aA}	0,40356 ^{bAB}
48h	0,03988 ^{dB}	0,27422 ^{aC}	0,10445 ^{cA}	0,15926 ^{ba}	0,18010 ^{ba}	0,08922 ^{cd}	0,16190 ^{bC}
72h	0,03970 ^{dB}	0,36470 ^{bB}	0,12344 ^{cA}	0,15384 ^{cA}	0,11337 ^{cc}	0,32671 ^{bb}	0,42352 ^{aA}
96h	0,1150 ^{deA}	0,19831 ^{cd}	0,08951 ^{eA}	0,15744 ^{cdA}	0,14062 ^{dbc}	0,24316 ^{bc}	0,38567 ^{aB}

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3

Atividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.

Tempo de fermentação submersa (horas)	Gênero não identificado BM18			<i>Aspergillus</i> sp. BP3		
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.mL^{-1}	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.mL^{-1}
24h	2,63E-04 ^{bB}	0,2633 ^{bB}	263,3178 ^{bB}	5,23E-05 ^{cB}	0,0523 ^{cB}	52,3392 ^{cB}
48h	4,58E-04 ^{aA}	0,4584 ^{aA}	458,3751 ^{aA}	7,03E-05 ^{cB}	0,0703 ^{cB}	70,3450 ^{cB}
72h	5,64E-04 ^{aA}	0,5640 ^{aA}	563,9798 ^{aA}	1,20E-04 ^{cdAB}	0,1197 ^{cdAB}	119,7423 ^{cdAB}
96h	1,94E-04 ^{aB}	0,1944 ^{aB}	194,4348 ^{aB}	1,57E-04 ^{aA}	0,1566 ^{aA}	156,6235 ^{aA}

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 12

Atividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação

Tempo de fermentação submersa (horas)	<i>Aspergillus</i> sp. CA28			<i>Penicillium</i> sp. BM9		
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.mL^{-1}	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.mL^{-1}
24h	3,74E-04 ^{aA}	0,3744 ^{aA}	374,4199 ^{aA}	1,99E-04 ^{bA}	0,1993 ^{bA}	199,2513 ^{bA}
48h	2,52E-04 ^{bB}	0,2521 ^{bB}	252,0823 ^{bB}	8,16E-05 ^{cB}	0,0816 ^{cB}	81,5647 ^{cB}
72h	1,90E-04 ^{aA}	0,1896 ^{aA}	189,6468 ^{aA}	1,63E-04 ^{bcA}	0,1626 ^{bcA}	162,6365 ^{bcA}
96h	1,68E-04 ^{aC}	0,1682 ^{aC}	168,2494 ^{aC}	1,34E-04 ^{aA}	0,1336 ^{aA}	133,5747 ^{aA}

submersa.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 13

Atividade específica dos fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais de acordo com o tempo de fermentação submersa.

Tempo de fermentação submersa (horas)	<i>Aspergillus</i> sp. CA5			<i>Aspergillus</i> sp. CO2			<i>Curvularia</i> sp BP20.		
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.ml^{-1}	$\mu\text{g/mL}^{-1}$	mg.ml^{-1}	g.ml^{-1}	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	mg.mL^{-1}	g.mL^{-1}
24h	2,18E-04 ^{bA}	0,2182 ^{bA}	218,1654 ^{bA}	4,75E-05 ^{cC}	0,0475 ^{cC}	47,5493 ^{cC}	6,08E-05 ^{cA}	0,0608 ^{cA}	60,7592 ^{cA}
48h	9,52E-05 ^{cB}	0,0952 ^{cB}	95,2249 ^{cB}	2,86E-04 ^{bA}	0,2864 ^{bA}	286,3708 ^{bA}	1,21E-04 ^{cA}	0,1206 ^{cA}	120,5683 ^{cA}
72h	2,24E-04 ^{bA}	0,2241 ^{bA}	224,1334 ^{bA}	1,53E-04 ^{bB}	0,1534 ^{bB}	153,4388 ^{bB}	7,54E-05 ^{dA}	0,0754 ^{dA}	75,3683 ^{dA}
96h	1,71E-04 ^{aAB}	0,1710 ^{aAB}	171,0283 ^{aAB}	1,56E-04 ^{aB}	0,1558 ^{aB}	155,8233 ^{aB}	6,14E-05 ^{bA}	0,0614 ^{bA}	61,3737 ^{bA}

As médias seguidas pela mesma letra minúscula no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si.

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula em tempos diferentes não diferem estatisticamente entre si

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.