

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO *Penicillium echinulatum* EMPREGANDO RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE NABO FORRAGEIRO

Loiva Zukovski

Caxias do Sul, 2014

Loiva Zukovski

PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO *Penicillium echinulatum* EMPREGANDO RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE NABO FORRAGEIRO

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologia, com a orientação do Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon e co-orientação da Prof^a. Dra. Marli Camassola.

Caxias do Sul, 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

Z94p Zukovski, Loiva, 1970-
Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum*
empregando resíduos da extração de lipídios de nabo forrageiro / Loiva
Zukovski. – 2014.
111 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologia, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon ; Coorientadora: Profa. Dra.
Marli Camassola.

1. Biocombustíveis. 2. Energia - Fontes alternativas. 3. Enzimas. 4.
Crucífera - Nabo forrageiro. 5. Fungos. I. Título.

CDU 2.ed.: 620.91

Índice para o catálogo sistemático:

1.Biocombustíveis	620.91
2.Energia - Fontes alternativas	620.92
3.Enzimas	577.15
4.Crucífera	582.683.2
5.Fungos	582.28

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730


"PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES PELO FUNGO *PENICILIUM*
ECHINULATUM EMPREGANDO RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS
DE NABO FORRAGEIRO."

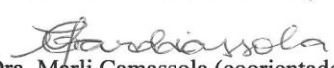
Loiva Zukovski

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

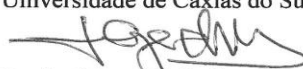
Caxias do Sul, 24 de Setembro de 2014.


Banca Examinadora:

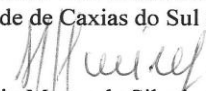

Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (orientador)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dra. Márlis Camassola (coorientadora)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dra. Aline Dettmer
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
(CTBE)


Pós-doutoranda Fernanda Bettin
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dr. Mauricio Moura da Silveira
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

“Obstáculos são aquilo que vemos quando afastamos nossos olhos do objetivo.”

Henry Ford

“... cada um sabe a alegria e a dor que traz no coração...”

Sérgio Britto

Dedico este trabalho a minha
querida filha Carolina e a todas
as pessoas que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus. Sem fé não teria superado os obstáculos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon e à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Marli Camassola pela orientação e conhecimentos compartilhados.

À Dr^a. Roselei Claudete Fontana pela ajuda muito especial.

Aos professores da banca de acompanhamento Prof^a. Dr^a. Aline Dettmer, Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira e Dr^a. Fernanda Bettin.

Ao Prof. Dr. Ademir J. Zattera, pelo apoio.

À minha querida e amada filha Carolina e ao meu marido.

À minha mãe Regina que cuidou da Carolina quando eu não podia.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologia (PGEPROTEC).

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas e PGEPROTEC.

Ao apoio financeiro da UCS, CAPES, CNPq, FINEP e FAPERGS.

À minha família e aos meus amigos, pelo apoio.

Aos demais funcionários da UCS e amigos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Energias renováveis.....	18
3.2 Enzimas lignocelulósicas	22
3.2.1 Celulases	23
3.2.2 Xilanases	25
3.3 Produção de celulases e xilanases	26
3.3.1 Microrganismos produtores de celulases	26
3.3.2 Condições de cultivo e de controle.....	28
3.3.3 Processos de cultivos sólidos e líquidos para produção de enzimas	32
3.4 Hidrólise e pré-tratamentos.....	34
3.5 Processos de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Microrganismo	41
4.2 Meios de cultivo	41
4.3 Procedimentos.....	43
4.3.1 Crescimento e manutenção de linhagens	43
4.3.2 Produção de celulases e xilanases em cultivos em estado sólido	43
4.3.3 Produção de celulases e xilanases em cultivos submersos	43
4.3.4 Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos	44
4.4 Métodos analíticos.....	44
4.4.1 Determinação de FPA (atividade enzimática sobre papel filtro)	44
4.4.2 Determinação de endoglicanase	45
4.4.3 Determinação de β -glicosidase.....	46
4.4.4 Determinação de xilanase	46
4.4.5 Determinação de açúcares redutores	47
4.4.6 Determinação de sacarose.....	47
4.4.7 Determinação indireta da concentração da massa miscelial	48
4.4.8 Zimogramas.....	49
4.4.9 Determinação da concentração de açúcares, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol	50
4.4.10 Análise química do resíduo de nabo forrageiro	50
4.4.11 Determinação do teor de cinzas do resíduo de nabo forrageiro	51
4.4.12 Determinação de extraíveis do resíduo de nabo forrageiro	51
4.4.13 Determinação da massa seca do resíduo de nabo forrageiro	52
4.4.14 Determinação de proteínas do resíduo de nabo forrageiro	52
4.4.15 Dosagem de proteínas nos caldos enzimáticos	52
4.4.16 Análise dos resultados	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Composição quantitativa básica do resíduo de nabo forrageiro	53
5.2 Produção de celulases, β -glicosidasas e xilanases em cultivos em estado sólido.....	53
5.2.1 Atividades enzimáticas sobre papel filtro, endoglicanasas, β -glicosidasas e xilanases em cultivos em estado sólido	54
5.2.2 Determinação da massa micelial em cultivos em estado sólido	57

5.2.3 Liberação de açúcares redutores durante o cultivo em cultivos em estado sólido..	58
5.2.4 Variações de pH durante o cultivo em cultivos em estado sólido.....	59
5.3 Produção de celulases, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos	60
5.3.1 Atividades enzimáticas sobre papel filtro, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos.....	61
5.3.2 Determinação da massa micelial em cultivos submersos e concentração de açúcares redutores	65
5.3.3 Variações de pH durante os cultivos submersos	67
5.4 Produção de celulases, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos contendo resíduos de nabo forrageiro, com e sem acréscimo de sacarose.....	68
5.5 Hidrólise enzimática.....	76
5.5.1 Produção das enzimas para a hidrólise	77
5.5.2 Hidrólise com caldos enzimáticos de <i>Penicillium echinulatum</i>	79
5.5.3 Análises de componentes liberados após a hidrólise.....	83
5.5.4 Zimogramas para atividade de β -glicosidase, endoglicanase e xilanase nos diferentes cultivos	89
6 CONCLUSÕES	92
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química geral do farelo de soja.	19
Tabela 2. Composição geral do farelo de trigo.	20
Tabela 3. Atividade celulolítica e xilanásica em <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> e em cultura mista com os dois microrganismos crescidos em cultivo em estado sólido, após 96 horas de fermentação (BRIJWANI <i>et al.</i> , 2010).	29
Tabela 4. Composição dos meios de cultivo em estado sólido empregados para a produção de celulasas e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i>	42
Tabela 5. Composição dos meios de cultivo empregados para a produção de celulasas e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i> em cultivo submerso.	42
Tabela 6. Composição quantitativa média do resíduo de nabo forrageiro (RNF) após a extração de óleo (torta).	53
Tabela 7. Atividade enzimáticas para diferentes microrganismos crescidos em substratos diversos, em cultivo em estado sólido.	56
Tabela 8. Atividades enzimáticas para diferentes microrganismos crescidos em substratos diversos, crescidos em cultivo submersos.	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura básica da biomassa lignocelulósica (SANTOS *et al.*, 2012). 21
- Figura 2.** Representação da atuação das enzimas celulasas sobre a matriz celulósica (SILVA, 2012).
..... 24
- Figura 3.** Representação da atuação das enzimas hemicelulasas sobre a matriz hemicelulósica. Sequência simplificada com ênfase na degradação da xilana (SILVA, 2012). 26
- Figura 4.** Representação esquemática do efeito do pré-tratamento em material lignocelulósico (MOOD *et al.*, 2013). 36
- Figura 5.** Atividades de endoglicanases (A), β -glicosidases (B), FPA (C) e xilanases (D) em culturas em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. 55
- Figura 6.** Concentração de massa micelial em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. 58
- Figura 7.** Açúcares redutores liberados de cultivos em estado sólido pelo fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro e farelo de trigo em diferentes proporções. 59
- Figura 8.** Variação de potencial hidrogeniônico em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. 60
- Figura 9.** Atividades de endoglicanases (A), β -glicosidases (B), FPA (C) e xilanases (D) em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. 62
- Figura 10.** Concentração de massa micelial em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. 66
- Figura 11.** Concentração de açúcares redutores em cultivos submersos empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, em diferentes tempos. 66
- Figura 12.** Variação de pH em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. 67
- Figura 13.** Atividades de endoglicanases sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. 69
- Figura 14.** Atividades de β -glicosidases sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. 70

Figura 15. Atividades FPA sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato.	71
Figura 16. Atividades de xilanases sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato.	72
Figura 17. Concentração de massa micelial em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose.	73
Figura 18. Concentração de açúcares redutores em cultivos submersos empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose.	74
Figura 19. Variação de pH em cultivos submersos empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, sem adição (A) e com adição de 0,5 % (m/v) de sacarose (B).	75
Figura 20. Consumo de sacarose em cultivos submersos com adição de 0,5 % (m/v) de sacarose empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato.	76
Figura 21. Representação das atividades enzimáticas médias determinadas nos volumes de caldos enzimáticos utilizados durante a hidrólise. Utilizou-se como padrão o volume de enzima contendo 10 FPA/g de substrato. As atividades de FPA e β -glicosidade estão representadas dez vezes maiores que as utilizadas durante as hidrólises enzimáticas para possibilitar a sua visualização.	78
Figura 22. Teor médio de proteínas totais determinadas nos volumes de caldos enzimáticos utilizados durante a hidrólise enzimática.	78
Figura 23. Liberação de açúcares redutores durante hidrólise de celulose (A), Avicel [®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F) com caldos enzimáticos produzidos em cultivo em estado sólido e cultivo submerso utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, em comparação com enzima padrão produzida por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29.	81
Figura 24. Concentrações de glicose e xilose determinadas por HPLC após 24 horas da hidrólise enzimática de celulose (A), Avicel [®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F). As enzimas foram produzidos em cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS), utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato em comparação com um complexo enzimático padrão (EP) produzido por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, empregando-se o fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29.	85
Figura 25. Concentrações de celobiose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol determinados por HPLC após 24 horas da hidrólise enzimática de celulose (A), Avicel [®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F), com caldos produzidos em cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS) utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como	

substrato em comparação com enzima padrão (EP) produzida por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. 87

Figura 26. Perfis das atividades de β -glicosidase (A), endoglicanase (B) e xilanase (C) dos caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* S1M29 separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tipo de cultivo (CES – cultivo em estado sólido; CS – cultivo submerso; EP – enzima padrão) e M é o marcador de massa molecular, com bandas de 25 a 250 kDa. O valor da massa molecular de cada enzima está marcada sobre a banda. 90

ABREVIATURAS

AFEX: *ammonia fiber explosion*

AR: açúcares redutores

BG: β -glicosidase

CBH: celobiohidrolase

Cel: celulose

CES: cultivo em estado sólido

CMC: carboximetilcelulose

CS: cultivo submerso

DNS: ácido 3,5-dinitrossalicílico

EC: *Enzyme Comission*

EG: endoglicanase

FPA: atividade enzimática sobre papel filtro (atividade celulásica total)

HPLC: *high-performance liquid chromatografy* (cromatografia líquida de alta eficiência)

FS: farelo de soja

FT: farelo de trigo

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

p-NPG: p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo

RNF: resíduos de nabo forrageiro após a extração do óleo (torta)

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfonato de sódio

SHF: hidrólise e fermentação separadas

SM: soluções de sais minerais

SSF: sacarificação e fermentação simultâneas

RESUMO

A biomassa lignocelulósica pode ser considerada como uma fonte inesgotável de matéria-prima de baixo custo para a produção de biocombustíveis, que são alternativos aos combustíveis fósseis. Entretanto, a disponibilidade de enzimas eficientes e econômicas é um dos gargalos para se chegar a xaropes de glicose, etapa anterior à fermentação no desenvolvimento da tecnologia do etanol celulósico. O nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) é uma planta com grande potencial para a produção de biodiesel, pois apresenta elevado teor de óleo em suas sementes, comparativamente a outras oleaginosas. A obtenção de óleo do nabo forrageiro gera uma torta, considerada como resíduo (RNF), com elevada concentração de proteínas (em torno de 40%). Neste trabalho, avaliou-se a conveniência do emprego de RNF para a formulação de meios para a produção microbiana de celulases, visando à substituição total ou parcial de componentes, como o farelo de trigo e o farelo de soja. Como microrganismo para secreção das enzimas, utilizou-se o mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum*, considerado um bom produtor de celulases. A produção de celulases e xilanases foi estudada tanto em cultivo em estado sólido (CES) como em cultivo submerso (CS). Foi constatado o crescimento do fungo tanto em CES como em CS, contendo apenas RNF como principal fonte de carbono e nitrogênio ou nos meios com variações nas concentrações de RNF, em substituição aos farelos de trigo e de soja. Quando os meios foram constituídos somente com RNF, as atividades enzimáticas não foram satisfatórias, provavelmente devido às baixas concentrações de substratos indutores (celulose e xilose), à elevada concentração de proteínas ou ao óleo residual. No cultivo em estado sólido, verificou-se que é possível substituir parcialmente o farelo de trigo (FT) por RNF, permitindo a produção de β -glicosidases com títulos enzimáticos de 22,62 UI/g, endoglicanases com 210,5 UI/g e xilanases com 1.137,59 UI/g. Em cultivo submerso, a substituição parcial ou total de farelos de trigo e de soja por RNF permitiu títulos enzimáticos de β -glicosidases de 0,18 UI/ mL, endoglicanases de 8,3 UI/mL e xilanases de 14,3 UI/mL, que foram semelhantes ao meio controle que utiliza suplementação de farelo de trigo e farelo de soja. Os complexos enzimáticos produzidos nas duas condições, CES e CS, mostraram-se mais eficientes do que o complexo enzimático utilizado como controle quanto à capacidade de hidrólise em celulose, Avicel[®], bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante *in natura* e pré-tratados.

Palavras-chave: nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), celulases, hidrólise enzimática, *Penicillium echinulatum*.

ABSTRACT

The lignocellulosic biomass can be considered as an inexhaustible source of raw material of low cost for the production of biofuels, which are alternatives to fossil fuels. However, the availability of efficient and low cost enzymes is one of the bottlenecks to obtain glucose syrups step prior to fermentation in the development of the technology for cellulosic ethanol. The fodder radish (*Raphanus sativus* L.) is a plant with great potential for the production of biodiesel, because it presents, high oil content in their seed, compared to other crops. The obtaining of oil of fodder radish seed generates a cake, considered as residue (FRC), with a high concentration of protein (around 40 %). In this study, was evaluated the convenience of use of FRC for the formulation of cellulases production medium, or even the total or partial replacement of components, such as the wheat bran and soybean meal. As microorganism for secretion of enzymes it was used the mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum*, considered a good producer of cellulases. The production of cellulases and xylanases was studied both in solid-state cultivation (SSC) and submerged cultivation (SC). It was noted the growth of the fungus in both SSC as in SC, containing only FRC as the main source of carbon and nitrogen, or in the medium with different concentrations of FRC, in replacement of the wheat bran and soybean meal. When the medium were formed only with FRC, enzyme activities were not satisfactory, probably due to the low concentrations of substrates inductors (cellulose and xylose), the high concentration of proteins or of residual oil. In SSC, it was found that it is possible to replace partially the wheat bran by FRC, enabling the production of β -glucosidases with titles enzymatic of 22.62 IU/g, endoglucanases with 210.5 IU/g and xylanases with 1,137.59 IU/g. In SC, total or partial replacement of soybean meal and wheat bran by FRC allowed β -glucosidases titles of 0.18 IU/mL, endoglucanases of 8.3 IU/mL and xylanases of 14.3 IU/mL, which were similar to control, which uses supplementation of wheat bran and soybean meal. The enzymatic complexes produced in two conditions, SSC and SC, shown to be more efficient than the enzymatic complex used as a control for the ability of hydrolysis of cellulose, Avicel[®], sugar cane bagasse and elephant grass *in natura* or pre-treated.

Keywords: fodder radish (*Raphanus sativus* L.), cellulases, enzymatic hydrolysis, *Penicillium echinulatum*.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia advinda do elevado crescimento populacional e econômico, a insegurança com relação aos recursos petrolíferos e as preocupações ambientais associadas ao uso de combustíveis fósseis têm priorizado o desenvolvimento de combustíveis alternativos, através da otimização de processos e desenvolvimento de novas tecnologias.

A biomassa lignocelulósica pode fornecer matérias-primas de baixo custo para a produção de biocombustíveis, oferecendo, assim, vantagens econômicas e ambientais. Os materiais lignocelulósicos que contêm, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina, são fontes atrativas para a produção de biocombustíveis, pois são abundantes, renováveis e não competem com o consumo humano e animal, em muitos casos. Podem ser citados como exemplos: palha, serragens, cavacos de madeira, gramíneas de rápido crescimento, resíduos agrícolas e de papéis, entre outros.

A utilização de óleos vegetais como fonte de energia e matéria-prima na produção de produtos biodegradáveis torna-se, também, uma alternativa para a diminuição da dependência do petróleo, o que tem estimulado a busca por plantas ricas em óleo. Entre essas plantas, o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) torna-se uma alternativa.

O nabo forrageiro é uma espécie vegetal da família das Crucíferas, das mais antigas espécies anuais utilizadas como fonte de óleo, cultivada principalmente na Ásia Oriental e em países europeus como Romênia, Alemanha e Espanha. Esta cultura foi introduzida no Brasil na década de 80 como fonte de matéria orgânica para cobertura do solo e alimentação animal, vindo a se tornar uma importante espécie de adubo verde, tendo a capacidade de recuperar a fertilidade e a estrutura do solo. Além disso, apresenta resistência moderada ao frio e ciclo curto, sendo empregada no inverno antes do plantio de culturas de verão, como soja e milho, no Rio Grande do Sul.

O nabo forrageiro apresenta ampla produtividade de grãos (500 a 2000 kg/ha), com teor de óleo na semente de 20 a 40% e adapta-se ao plantio de entressafra da soja. O ciclo médio de 130 dias, apresentado entre a semeadura e a colheita, é menor do que o de outras espécies alternativas para a fabricação de biocombustível.

O teor de óleo extraído registra uma média de 35% em relação à massa da semente, inferior ao de outras culturas. No entanto, esse óleo vegetal se destaca pela sua baixa viscosidade, o que garante melhor desempenho do motor. O óleo do nabo forrageiro apresenta elevada presença de triglicerídeos e baixa concentração de ácidos graxos livres, substâncias que, quando em contato com catalisadores, transforma-se em sabão, que dificulta o processo e

reduzem a qualidade do biodiesel. Assim, verifica-se que o nabo forrageiro é uma cultura promissora para a produção de biodiesel. Para cada tonelada de grãos, há a extração de 350 litros de óleo, resultando do processo a sobra de resíduos ricos em proteínas e fibras, que podem ser utilizados como substitutos de farelo de trigo para a produção de enzimas celulases e xilanases.

Celulases e xilanases são enzimas que apresentam aplicações em diversos segmentos industriais, como na alimentação animal, alimentos, têxteis, detergentes e na indústria de papel, mas destaca-se o seu potencial para serem empregadas na hidrólise de lignocelulósicos visando à produção de etanol de segunda geração. Entretanto, nesse processo, o custo das enzimas ainda é um gargalo.

A hidrólise da celulose e da hemicelulose, polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica, pode ocorrer com emprego de ácidos ou enzimas para que haja liberação de açúcares fermentáveis.

A tecnologia enzimática emprega, entre outras enzimas, três tipos principais: celobiohidrolases, endoglicanases e β -D-glicosidades. Essas enzimas agem de forma cooperativa e sinérgica.

As enzimas celulolíticas são produzidas de forma extracelular por alguns fungos filamentosos e algumas bactérias. Atualmente, a maior quantidade de enzimas utilizadas provém de *Trichoderma* e *Aspergillus*, sendo *Trichoderma reesei* o microrganismo mais explorado. Podem ser citados, também, outros fungos celulolíticos como *Trichoderma koningii*, as espécies *Penicillium* spp., *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete* e *Rhizopus*.

Entre as espécies de *Penicillium*, *Penicillium echinulatum* tem mostrado um elevado potencial produtor de enzimas celulolíticas, cujo complexo celulolítico apresenta estabilidade térmica a 50 °C e sua atividade de β -glicosidase e FPA é balanceada, permitindo a hidrólise completa de celulose.

Linhagens de *P. echinulatum* produzem celulases tanto em cultivos em estado sólido como em cultivos submersos, sendo que esforços vêm sendo empregados para aumentar a produtividade de enzimas, bem como a redução dos custos com a formulação de meios de cultivo, visando o emprego de suas celulases na produção de etanol de segunda geração e outros produtos como xilitol, 2,3-butanodiol e n-butanol.

Tendo em vista a formulação de meios de menor custo para a produção de celulases com *P. echinulatum*, estudou-se neste trabalho o emprego de resíduos de nabo forrageiro após a extração de óleo (torta) como fonte alternativa de carbono e nitrogênio para a produção de celulases e xilanases.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a produção de celulases e xilanases em cultivos submersos e no estado sólido, utilizando resíduos de nabo forrageiro, obtidos após a extração de óleo, como fonte de carbono e nitrogênio, empregando o fungo celulolítico *Penicillium echinulatum* S1M29, visando à obtenção de preparações enzimáticas para serem empregadas na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o emprego de diferentes proporções de resíduos de nabo forrageiro obtidos após a extração de óleo e farelo de trigo em formulações para cultivos no estado sólido.
- Avaliar a produção de celulases e xilanases em cultivos submersos com diferentes formulações de meios, empregando resíduos de nabo forrageiro obtidos após a extração de óleo, em frascos mantidos sob agitação recíproca.
- Analisar o potencial hidrolítico dos complexos enzimáticos obtidos em cultivos em estado sólido e em cultivos submersos empregando resíduos de nabo forrageiro obtidos após a extração de óleo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energias renováveis

Com o rápido desenvolvimento da economia global, o consumo de energia tem aumentado, especialmente em países emergentes. A constatação de que os combustíveis fósseis estão se tornando escassos e que as mudanças climáticas estão relacionadas com a emissão de carbono para a atmosfera têm aumentado o interesse em economia de energia e proteção ambiental (BAÑOS *et al.*, 2011).

Apesar de o Brasil, historicamente, empregar elevadas quantidades de energias renováveis em sua oferta total de energia, o rápido crescimento econômico e a industrialização nas últimas décadas têm implicado uma crescente dependência de combustíveis fósseis não renováveis e, como consequência, em aumento de emissão de CO₂ (SZKLO *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de energia renovável é a abordagem eficaz para tratar de segurança energética e mudanças climáticas. Países como Estados Unidos, Japão, Brasil e outros têm, no desenvolvimento de energias renováveis, uma importante estratégia para o futuro (ZHANG *et al.*, 2011).

Entre as energias consideradas renováveis, encontram-se as energias eólica, hídrica, fotovoltaica, geotérmica e bioenergia (BAÑOS *et al.*, 2011; MONONO *et al.*, 2013). Bioenergia é energia renovável produzida a partir de materiais derivados de fontes biológicas.

Muitas fontes de energia renovável têm sido identificadas para diminuir a emissão de CO₂, sendo o etanol produzido pela fermentação de açúcares a principal alternativa de combustível líquido. Açúcares simples, para serem fermentados, podem ser obtidos a partir de biomassa e amido (MONONO *et al.*, 2013). A biomassa, uma fonte de energia renovável, advém de material biológico, incluindo plantas e animais. Qualquer tipo de combustível gerado de biomassa é chamado de biocombustível. A biomassa pode ser convertida em gás metano, etanol e biodiesel (JOHN *et al.*, 2011).

O processo de produção de etanol de primeira geração é baseado em técnicas tradicionais de fermentação, empregando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando açúcares como a sacarose de cana-de-açúcar e a glicose do milho. No processo de produção de etanol de segunda geração, por sua vez, ocorre fermentação de açúcares derivados da hidrólise da fração lignocelulósica de biomassa (TAYLOR *et al.*, 2009). Entre as biomassas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

utilizadas nesse processo, pode-se citar bagaço de cana-de-açúcar, palhas de trigo, de milho e de arroz (KADAM & McMILLAN, 2003; SARKAR *et al.*, 2012). Também, pode-se citar palha da cana-de-açúcar, de soja e de aveia, capim elefante, casca de arroz, sabugo de milho e restos de madeira. Uma composição geral do farelo de soja pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química geral do farelo de soja.

Análise	%
	(m/m) em base seca
Matéria seca	88,05
Proteína bruta	44,00
Extrato etéreo	1,92
Fibra bruta	5,60
Matéria mineral	6,05
Cálcio	0,33
Fósforo	0,52

Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2008) e Henz *et al.* (2009).

Devido ao seu elevado teor de amido e polissacarídeos, conforme pode ser observado na Tabela 2, o farelo de trigo pode ser usado para a produção de etanol. Embora o amido possa ser hidrolisado enzimaticamente por amilases à glicose, a hemicelulose e a celulose não são completamente degradadas por tratamentos enzimáticos. Assim, há a necessidade de processos físico-químicos adicionais, como tratamentos térmicos e hidrólise ácida. Também, o farelo de trigo hidrolisado pode ser utilizado como meio de fermentação para a produção combinada de acetona, butanol e etanol com a utilização de linhagens mesófilas de *Clostridium* spp (APPRICH *et al.*, 2014).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2. Composição geral do farelo de trigo.

Análise	% (m/m) em base seca
Água	12,1
Proteína	13,2-18,4
Gordura	3,5-3,9
Carboidratos totais	56,8
Amido	13,8-24,9
Celulose	11,0
Glicose (total)	25,4
Xilose (total)	20,3
Arabinose (total)	9,3
Galactose (total)	1,9
Lignina Klason	8,0
Cinzas	3,4-8,1

Fonte: Adaptado de Apprich *et al.* (2014) e Reisinger *et al.* (2014).

Os biocombustíveis de terceira geração podem ser considerados uma fonte alternativa viável de energia (NIGAM *et al.*, 2011). A biomassa de algas marinhas pode ser usada como matéria-prima para biocombustíveis de terceira geração. Além de ser uma biomassa potencial para bioetanol, as algas podem, também, ser usadas para produção de biodiesel, combustíveis de aviação, bioplásticos, entre outros. As algas, com sua fina camada de celulose, têm uma composição rica em carboidratos com capacidade de produzir 60 vezes mais etanol do que a soja por hectare de terra, além de dez vezes mais etanol do que o milho por área de cultivo. Não competem diretamente com os alimentos e consomem uma taxa elevada de CO₂ durante o crescimento, o que a torna ambientalmente correta (LIMAYEM *et al.*, 2012).

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são a celulose, hemicelulose e a lignina (Figura 1). Celulose é um polímero linear de unidades de anidroglicopiranos, com ligações β -(1-4)-glicosídicas, que se dispõem paralelamente mantidas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. A celulose geralmente está presente como uma forma cristalina e pequenas quantidades de cadeias não organizadas de forma amorfa. Hemiceluloses são polímeros constituídos de unidades principalmente de pentoses, como a D-xilose e L-arabinose, mas também hexoses como a D-glicose, D-galactose, D-manose, diferindo da celulose por serem estruturas menores e amorfas (SÁNCHEZ, 2009; CARRIER *et al.*, 2011). A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose são as ramificações laterais curtas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

consistindo de diversos açúcares da hemicelulose e os oligômeros facilmente hidrolisáveis da celulose. A lignina é uma substância complexa, de estrutura tridimensional formada por unidades diferentes de fenilpropano. Esses compostos fenólicos podem atuar como inibidores da hidrólise ou da fermentação de açúcares. A lignina forma uma vedação física na parede celular da planta (SÁNCHEZ, 2009; MABEE *et al.*, 2011).

Os extrativos são encontrados na biomassa, em pequenas quantidades, e incluem gomas, resinas, breu, ceras, esteróis, flavonoides, taninos, terpenos, quinonas, açúcares não estruturais, clorofila e outros compostos (ANG *et al.*, 2013). Também, pectina, proteínas, cinzas e ácidos graxos (LIN *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2013).

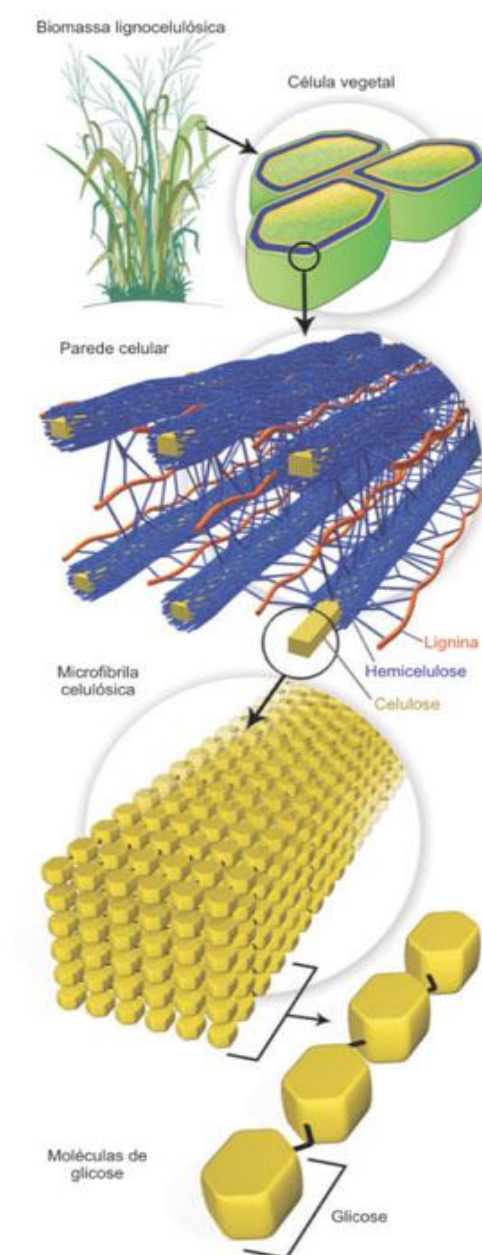


Figura 1. Estrutura básica da biomassa lignocelulósica (SANTOS *et al.*, 2012).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As fontes de biomassa podem ser divididas em quatro grupos: resíduos agrícolas, resíduos de madeira, culturas energéticas e resíduos sólidos municipais (ABNISA *et al.*, 2011).

Nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) é uma oleaginosa que pertence à família Brassicaceae (ou Cruciferae). É herbácea e cresce verticalmente, atingindo até 1,8 m e fica pronta para a colheita em quatro meses. O nabo forrageiro é usado como adubo verde e para fornecer néctar para as abelhas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. As sementes oleaginosas contêm de 40 a 54 % de sua massa em óleo (DOMINGOS *et al.*, 2008).

A torta resultante do processo de prensagem mecânica, com 93,53% de matéria seca, apresenta composição de 39,01% de proteína bruta; 4,98% de matéria mineral; 13,15% de extratos etéreos (gorduras) (ÁVILA & SODRÉ, 2012; BRASI *et al.*, 2013).

As características do nabo forrageiro como matéria-prima para o biodiesel ainda não foram extensivamente analisadas, mas o óleo extraído apresenta estabilidade à oxidação, baixa degradação e baixa polimerização indicando potencial para a produção de biodiesel (ÁVILA & SODRÉ, 2012).

3.2 Enzimas lignocelulósicas

A conversão biotecnológica de celulose em açúcares fermentáveis pode requerer a ação cooperativa de celulasas e hemicelulasas. Também, são necessárias para expor as microfibrilas de celulose cobertas por hemiceluloses enzimas acessórias, como acetil-xilano esterases, arabinofuranosidades e, em alguns casos, esterases fenólicas (ZHANG *et al.*, 2012). Outras proteínas também podem participar, como *swollenins* e *expansins*, que são produzidas, respectivamente, por fungos ou plantas, e afetam a sacarificação de materiais celulósicos, mas não apresentam comportamento hidrolítico (SILVEIRA *et al.*, 2012). Świątek *et al.* (2014) citam β -mananase, amiloglicosidase, α -arabinosidase e α -glicoronidase como enzimas acessórias.

Celulasas são utilizadas para degradar as cadeias de polissacarídeos da biomassa à glicose. No entanto, para que as celulasas tenham acesso à cadeia dos polissacarídeos o suficiente para haver a ligação em um sulco do sítio ativo, a mesma deve estar livre do estado cristalino. Também, as celulasas são enzimas relativamente lentas, sendo utilizadas em elevadas concentrações. Recentemente, foi demonstrado que as enzimas oxidativas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

monoxigenases de polissacarídeos (PMOs), também conhecidas como enzimas GH61, as quais são dependentes do cobre, podem aumentar a eficiência das celulases em até duas vezes. A ação sinérgica de PMOs decorre de sua capacidade de se ligar à celulose e de sua capacidade oxidativa de clivagem das ligações glicosídicas, aumentando, assim, a acessibilidade das celulases ao substrato (WILMOT, 2012; WESTERENG *et al.*, 2013).

Celulases, xilanases e pectinases contribuem, atualmente, com quase 20% do mercado mundial de enzimas. O alto custo e o baixo rendimento de produção são o gargalo para aplicações industriais de enzimas. Portanto, métodos alternativos de produção de enzimas usando substratos mais econômicos, com maior rendimento, é objetivo dos estudos nesse segmento (ANG *et al.*, 2013).

3.2.1 Celulases

As celulases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de celulose e celooligosacarídeos. São compostas de uma mistura complexa de proteínas enzimáticas com especificidades diferentes para hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídicas. A ação sinérgica da hidrólise enzimática ocorre com a ação de pelo menos três grupos de enzimas: endo-(1,4)- β -D-glicanase (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- β -D-glicanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As exoglicanases (celobiohidrolases - CBH) agem nas extremidades da cadeia de celulose, liberando β -celobiose, como produto final; as endoglicanases (EG) atuam randomicamente atacando ligações *O*-glicosídicas internas, resultando em cadeias de glicanos de diferentes tamanhos; as β -glicosidases (BGL) agem especificamente na β -celobiose liberando glicose (DILLON, 2004; SÁNCHEZ, 2009; KUHAD *et al.*, 2011; NARRA *et al.*, 2012; VALENCIA & CHAMBERGO, 2013). Na Figura 2, está representada a estrutura lignocelulósica e a atuação das celulases.

As celulases são enzimas altamente específicas. O processo de ação dessas enzimas ocorre em três estágios sucessivos: adsorção da celulase na superfície celulósica, hidrólise da celulose à glicose e dessorção da celulase da superfície do substrato (ŚWIĄTEK *et al.*, 2014).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

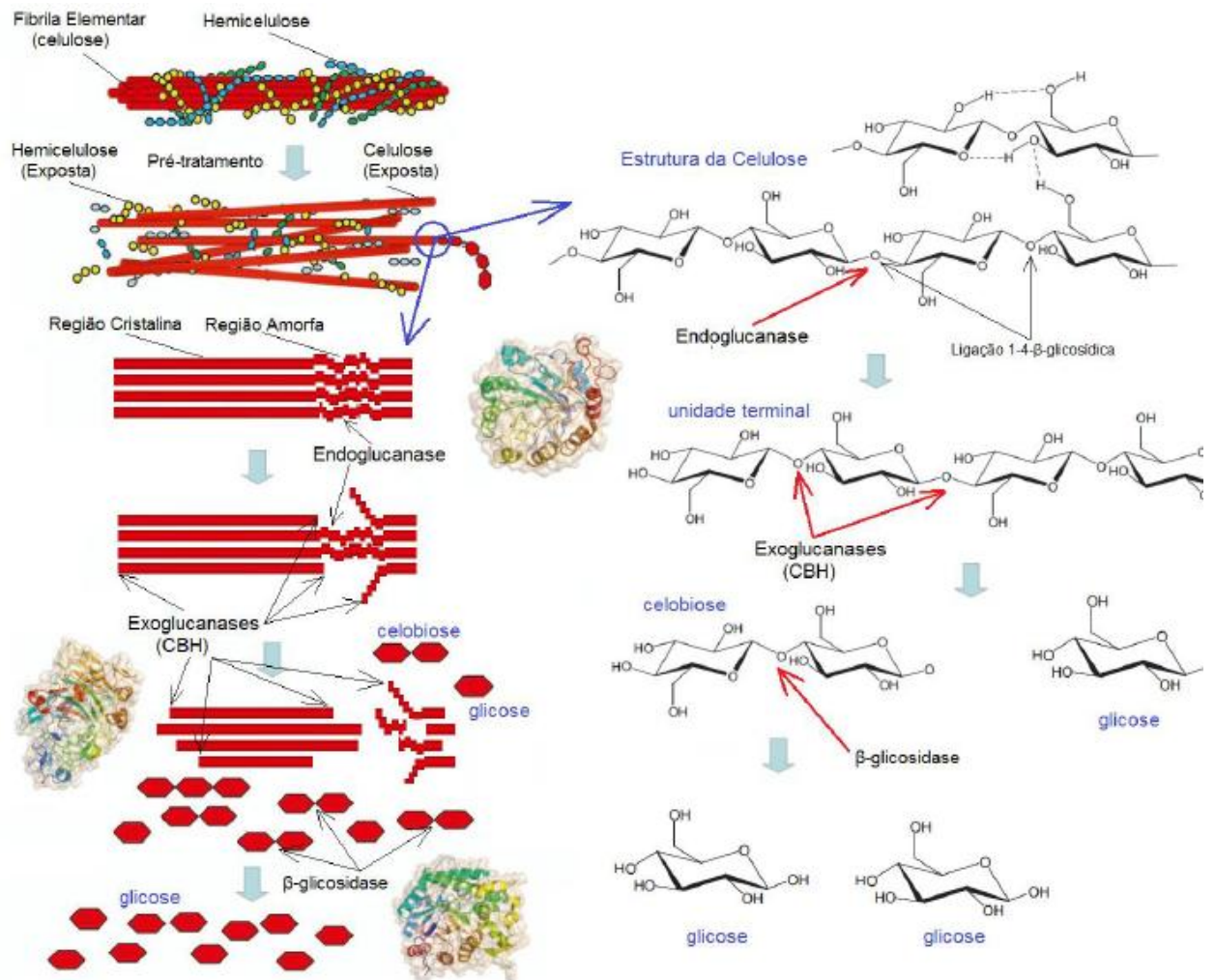


Figura 2. Representação da atuação das enzimas celulases sobre a matriz celulósica (SILVA, 2012).

Assim, as celulases são responsáveis pela bioconversão de celulose em açúcares solúveis, sendo a bioconversão de biomassa celulósica empregando celulases para produção de etanol uma das mais importantes aplicações destas enzimas (LI *et al.*, 2007; SINGHANIA *et al.*, 2010; MELLO-DE-SOUZA, 2011). Desempenham, também, papel importante em outras aplicações comerciais especializadas, como detergentes, modificação de tecidos, de papel, na indústria de polpa de papel e na indústria alimentar (LI *et al.*, 2007).

As celulases têm sido usadas na indústria têxtil devido a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de maneira controlada, melhorando a qualidade dos tecidos. O tratamento de tecidos de algodão é uma maneira ecológica de melhorar a propriedade dos tecidos (PAZARLIOĞLU *et al.*, 2005).

As celulases, juntamente com as xilanases, são utilizadas, também, na extração de óleos vegetais, essências, alcaloides, produtos para pele e como adjuvantes para o malte da cerveja, clarificação de sucos e produção de vinhos (BHAT, 2000; MELLO-DE-SOUZA *et al.*, 2011).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2.2 Xilanases

As xilanases microbianas (1,4- β -D-xilano-hidrolase) são catalisadores da hidrólise de xilana (Figura 3). Essas enzimas são produzidas por inúmeros organismos como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. A maior parte dos fungos e bactérias secretam xilanases extracelulares que atuam sobre o material hemicelulósico (KULKARNI *et al.*, 1999).

Da degradação das hemiceluloses participam várias enzimas, como endo-1,4- β -xilanaase, β -xilosidase, α -glicuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilxilano esterase, que agem em diferentes heteropolímeros. Para a degradação de glicomananos, participam β -manosidasases (KUMAR *et al.*, 2008). Na Figura 3 são representados os sítios de ação das xilanases.

Xilanases são usadas comercialmente nas indústrias de papel, alimentos e ração animal (LIAB *et al.*, 2000). Na indústria de papel e celulose, as xilanases melhoram o branqueamento da polpa, diminuindo a quantidade de compostos de cloro no processo e, conseqüentemente, diminuem a emissão de organoclorados no efluente.

O interesse nas xilanases com outras propriedades bioquímicas aumentaram devido à aplicabilidade na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Nesse processo, os materiais lignocelulósicos são, usualmente, pré-tratados em meio ácido e, depois, a hidrólise enzimática é realizada para hidrolisar a celulose remanescente e as xilanases hidrolisam a hemicelulose a açúcares monoméricos (PARACHIN *et al.*, 2009).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

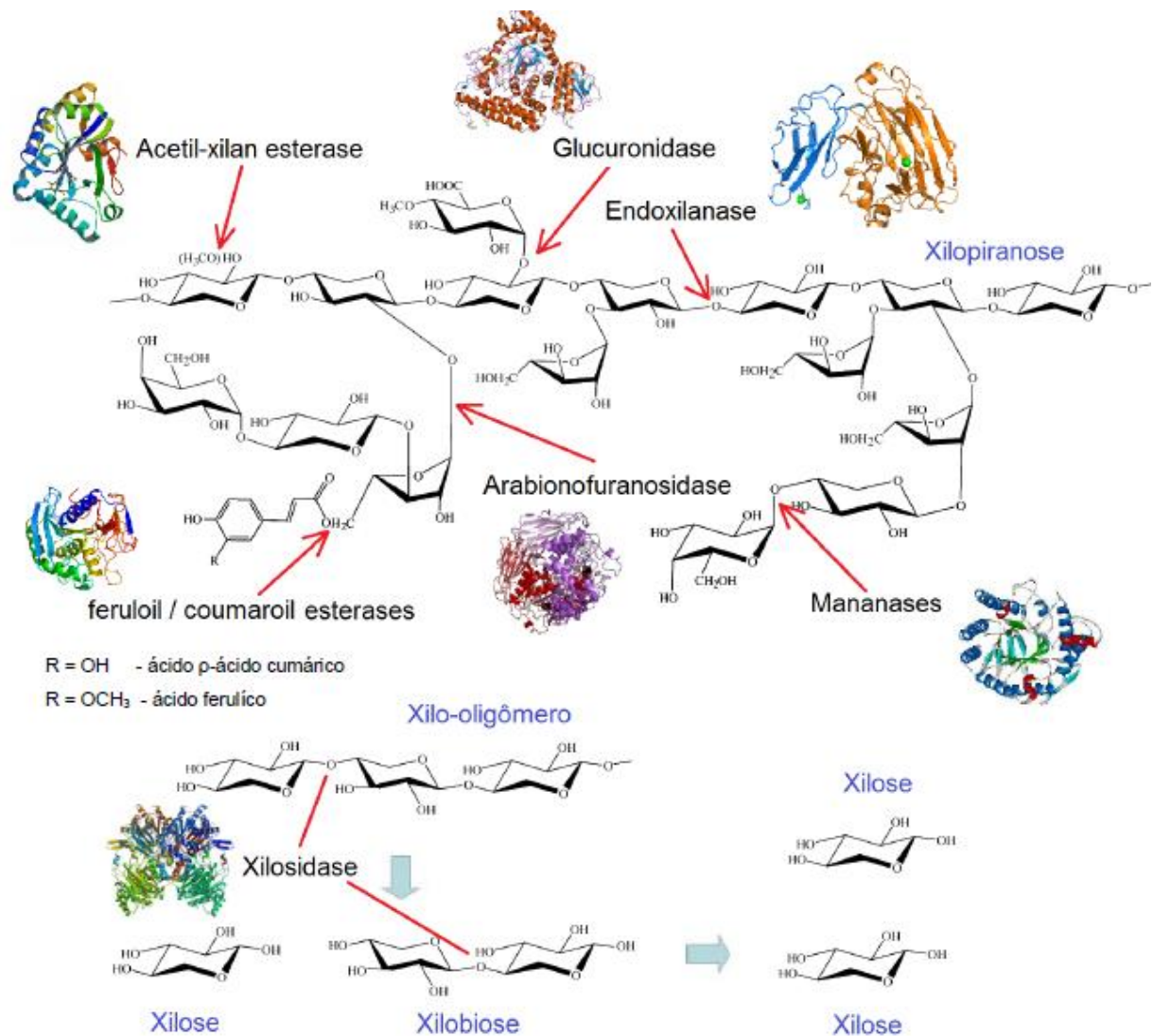


Figura 3. Representação da atuação das enzimas hemicelulases sobre a matriz hemicelulósica. Sequência simplificada com ênfase na degradação da xilana (SILVA, 2012).

3.3 Produção de celulases e xilanases

3.3.1 Microrganismos produtores de celulases

Os fungos são os microrganismos mais estudados para a produção de celulases e, entre estes, destacam-se *Trichoderma reesei*, a forma anamórfica de *Hypocrea jecorina* (KUBICEK *et al.*, 2009), cuja linhagem selvagem foi inicialmente estudada pelo Dr. Reese e Dr.^a Mandels, nos laboratórios de Natick-USA e, posteriormente, utilizada em vários programas de melhoramento genético, como o que resultou na linhagem RUT C30, que é um mutante desreprimido à glicose (PETERSON & NEVALAINEN, 2012).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Podem ser citadas, também, linhagens de *Aspergillus* produtoras de celulases, como o *A. japonico* (HERCULANO *et al.*, 2011) e *A. niger* (DHILLON *et al.*, 2012). Outra espécie também estudada para a produção de celulases é *Humicola insolens* (KARLSSON *et al.*, 2002).

No gênero *Penicillium*, existem várias espécies que apresentam potencial para a produção de celulases, como *Penicillium decumbens* (LIU *et al.*, 2011), *Penicillium echinulatum* (DILLON *et al.*, 2006; DILLON *et al.*, 2011), *Penicillium funiculosum* (CASTRO *et al.*, 2010), *Penicillium janthinellum* (SINGHVI *et al.*, 2011).

Embora a produção comercial atual de celulases seja de origem fúngica, as celulases bacterianas têm sido estudadas e têm grande interesse devido à alta taxa de crescimento, termoestabilidade e propriedades alcalinas (SADHU & MAITI, 2013). Entre as celulases de bactérias, o complexo denominado celulosoma, tal como o encontrado na bactéria termofílica *Clostridium thermocellulam*, tem despertado interesse (ZHANG & LYND, 2004). Trata-se, o celulosoma, de um complexo de enzimas especializado na adesão e degradação de celulose que se localiza como protuberâncias na superfície bacteriana, apresentando uma porção central não catalítica (*scaffoldin*) que contém um domínio de ligação à celulose e vários sítios (*cohesins*) onde se ligam as regiões (*dockerin*) pertencentes às subunidades enzimáticas que portam seus domínios catalíticos (SADHU & MAITI, 2013).

Como nas celulases fúngicas, as celulases bacterianas, como as que estão presentes em *Fibrobacter succinogenes* (MCGAVIN & FORSBERG, 1989) e *Runinococcus albus* (MORRISON & MIRON, 2000) apresentam regiões de ligação à celulose.

Entre as bactérias celulolíticas, tem despertado interesse *Anoxybacillus* sp. (LIANG *et al.*, 2010), *Bacillus subtilis* (DEKA *et al.*, 2013), *Bacillus amyoliquefaciens* (LEE *et al.*, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (BEKARE *et al.*, 2005), *Nocardiopsis* sp. (SARATALE & OH, 2011).

Entre as linhagens que têm um sistema de enzima celulolítica baseada na alta atividade sobre papel filtro (FPA), encontra-se *P. echinulatum* 9A02S1 (DILLON *et al.*, 2006). Esse mutante foi obtido por tratamento com H₂O₂ (um agente mutagênico), 2-deoxiglicose e por aplicação de uma metodologia baseada no trabalho de Montenecourt & Eveleigh (1977).

O mutante 9A02S1 mostra estabilidade a 50 °C (CAMASSOLA *et al.*, 2004) e altos níveis de produção enzimática (CAMASSOLA & DILLON, 2007 a, b; 2009). O sistema enzimático de 9A02S1 mostra uma alta proporção de β-glicosidase quando comparada com *T. reesei* (MARTINS *et al.*, 2008). Também, *P. echinulatum* tem a habilidade de crescer em

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

sacarose, sendo um meio de baixo custo e solúvel, diferentemente do que foi observado para *T. reesei* (DRUZHININA *et al.*, 2006).

A partir do mutante 9A02S1 foi isolada uma nova linhagem variante genética por mutagênese com H₂O₂ e dois passos de triagem, suplementado com 2-deoxiglicose e microfermentação em cultivo submerso. O mutante obtido, S1M29, proporcionou maior atividade sobre papel filtro (FPA) e endoglicanase, alcançando mais rapidamente os picos para essas enzimas do que a linhagem parental (DILLON *et al.*, 2011).

3.3.2 Condições de cultivo e de controle

Sob cultivo submerso, diversos fatores influenciam a produção de celulasas e xilanases, como a qualidade e a concentração do substrato, nutrientes, aeração, temperatura e pH (BAILEY & TAHTIHARJU, 2003; HAKI & RAKSHIT, 2003; DELABONA *et al.*, 2012).

Para a produção de celulasas capazes de hidrolisar a biomassa a um custo reduzido, é essencial a seleção de linhagens de fungos que possuam elevadas capacidades de expressão e uma diversidade de enzimas celulolíticas com elevada atividade específica (DELABONA *et al.*, 2012).

Algumas formas de celulose ou seus derivados induzem a maioria das enzimas celulolíticas e, portanto, desempenham um papel importante na produção (OLSSON *et al.*, 2003; JØRGENSEN *et al.*, 2005; JUHÁSZ *et al.*, 2005). A celulose é considerada uma das mais importantes fontes de carbono (NIRANJANE *et al.*, 2007) e muitas celulosas têm sido usadas como fonte de carbono para produção de celulasas, como, por exemplo, Avicel[®] e Solka Floc[®]. No entanto, essas substâncias têm um custo elevado, encarecendo processos em grande escala. Fontes de material lignocelulósico são mais econômicas, tais como a palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos da agricultura (LIMING & XUELIANG, 2004).

Delabona *et al.* (2012) utilizaram sacarose, lactose, glicerol e fruto-oligossacarídeo como fonte de carbono para produção de celulasas e xilanases utilizando *Trichoderma harzianum*. Foram alcançadas atividades enzimáticas de 1,21 FPU/mL de celulase, 80,00 UI/mL de xilanase e 17,32 UI/mL de β-glicosidase com a utilização de bagaço pré-tratado com vapor seguido por deslignificação com NaOH mais sacarose em biorreator.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Brijwani *et al.* (2010) apresentam, na Tabela 3, uma comparação entre *T. reesei*, *A. oryzae* e a cultura mista contendo os dois microrganismos, após 96 horas de cultivo em estado sólido, utilizando o substrato farelo de soja suplementado com farelo de trigo.

Tabela 3. Atividade celulolítica e xilanásica em *Trichoderma reesei*, *Aspergillus oryzae* e em cultura mista com os dois microrganismos crescidos em cultivo em estado sólido, após 96 horas de fermentação (BRIJWANI *et al.*, 2010).

Cultura	Celulase total (FPU/g)	β -glicosidase (UI/g)	Endoglicanase (UI/g)	Xilanase (UI/g)
<i>T. reesei</i>	6,55	6,30	60,17	515,90
<i>A. oryzae</i>	6,70	9,45	68,36	512,16
Mista	10,78	10,71	100,67	504,98

Os mutantes de *P. echinulatum* secretam celulases (medidas como FPA) acima de 2,0 UI/mL quando se utiliza 1 % (m/v) de celulose como fonte de carbono em cultivo submerso (DILLON *et al.*, 2006; DILLON *et al.*, 2011). Em cultivo em estado sólido (CES), com o emprego de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, foram observados títulos de FPA de 45,82 U/gdm em cultura com seis partes de bagaço para quatro partes de farelo de trigo, após três dias (CAMASSOLA & DILLON, 2010).

Hideno *et al.* (2011) utilizaram palha de arroz pré-tratada e celulose comercial como fonte de carbono para a produção de celulase, em cultivo submerso, pelo fungo *Acremonium cellulolyticus*. Foram obtidos 0,58 U/mg de FPase, 1,25 U/mg de β -glicosidade e 19,73 U/mg de CMCCase com a utilização de palha de arroz liofilizada após moagem úmida em disco.

A produção do complexo celulásico de *A. niger* NS-2 em CES no período de 96 horas, utilizando-se diferentes resíduos agrícolas e domésticos sem pré-tratamento, resultou em $310,6 \pm 3,0$ U/gds de CMCCase, $16,8 \pm 0,15$ U/gds de FPA e $33,0 \pm 1,2$ U/gds de β -glicosidade com farelo de trigo. Com a utilização de bagaço de cana-de-açúcar, as atividades obtidas foram $5,0 \pm 0,1$ U/gds de CMCCase, $1,5 \pm 0,005$ U/gds de FPA e $3,0 \pm 0,03$ U/gds de β -glicosidade. Com o uso de cascas de batatas como substrato, o valor de $31,3 \pm 0,3$ U/gds de CMCCase, $5,9 \pm 0,17$ U/gds de FPA e $18,3 \pm 0,43$ U/gds de β -glicosidade (BANSAL *et al.*, 2012).

Prévot *et al.* (2013) observaram que o complexo enzimático produzido em CES com *T. reesei* Rut-C30, utilizando como fonte de carbono farelo de trigo, mostrou maior eficiência

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

da ação de celobiohidrolase e melhor capacidade de conversão com farelo de trigo, provavelmente devido à presença de enzimas acessórias. Observaram concentrações de 103,0 U/g para endoglicanase e 38,1 U/g para β -glicosidase. Concluíram que o CES pode ser uma tecnologia promissora para hidrolisar biomassas e baixar o custo do processo.

Tem-se sugerido que a produção de enzimas em plantas comerciais de etanol seja feita com a utilização do material lignocelulósico disponível como fonte de carbono, pois o custo é menor, há menos processamento a jusante e o tempo de armazenamento é reduzido. Também, têm-se sugerido que o cultivo de fungos em material lignocelulósico específico pode produzir enzimas diferentes e com composição especialmente adequada para a hidrólise deste material em particular (JØRGENSEN & OLSSON, 2006).

A repressão pela glicose para síntese de celulases constitui-se em uma característica que está distribuída nos microrganismos celulolíticos e várias tentativas têm sido feitas para o desenvolvimento de mutantes resistentes à repressão catabólica (MONTENECOUT & EVELEIGH, 1981; DILLON *et al.*, 2006; SINGHANIA *et al.*, 2010; DILLON *et al.*, 2011; RAGHUWANSHI *et al.*, 2014).

Tanto a natureza quanto a quantidade de nitrogênio disponível também exercem grande influência sobre a produção de enzimas celulolíticas extracelulares (LEVIN *et al.*, 2010). Garcia-Martinez *et al.* (1980) testaram, com *Clostridium thermocellum*, várias fontes de nitrogênio para crescimento e produção de celulases em comparação com sulfato de amônio. Foram testados nitrato de amônio, nitrato de potássio, ureia e valina. O nitrato e o sulfato de amônio suportam altos níveis de crescimento, mas a ureia proporciona altos títulos de β -glicosidases.

Doppelbauer *et al.* (1987) suplementaram a solução mineral básica (MANDELS & REESE, 1957) com 0,05 a 2,0 % (m/v) de peptona. Quando houve aumento de 0,05 para 2,0 % (m/v) de peptona no meio com polpa sulfitada, houve duplicação de produção de β -glicosidase. Não houve um efeito mensurável para produção de FPA.

O uso de surfactantes (p. ex. Tween-80[®], Tween-60[®] e Tween-20[®]), além das condições do processo e uso de indutores, são necessárias para aumentar a atividade de celulases e xilanases por *T. reesei* e *Trichoderma viride* (CALLOW & JU, 2012).

A adição de surfactantes não iônicos, como o Tween 80[®], em culturas fúngicas, resultou em aumento da produção de enzimas (REESE & MAGUIRE, 1969). O efeito positivo do Tween 80[®] é geralmente aceito e a maioria dos pesquisadores usam concentrações de 0,1 a 0,2% (m/v) em culturas de frascos sob agitação (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A síntese e secreção de enzimas por fungos são reguladas por diversos fatores ambientais. O mais importante é o pH extracelular, que atua como um sinal essencial para o crescimento, diferenciação e virulência de fungos patogênicos. Assim, os fungos desenvolveram mecanismos eficientes para sentir e responder a alterações no pH do ambiente (RAMIREZ-COUTIÑO *et al.*, 2010). Sendo observado que as maiores produções de xilanases em pH 6,0 (em torno de 95 UI/mL) e de celulases em pH 4,5 (em torno de 4,3 UI/mL) por *T. reesei* Rut C-30 são favorecidas (XIONG *et al.*, 2004). Valores de pH entre 5 e 6 parecem ser favoráveis à produção de enzimas por *T. harzianum*. Mantendo-se o pH em 5,0 para *T. harzianum* ocorre diminuição da contaminação microbiana (DELABONA *et al.*, 2012).

Amônia é consumida durante o crescimento de microrganismos e o pH cai, podendo interferir na produção enzimática, assim como na ação de enzimas (STERNBERG & DORVAL, 1979). Em frascos sob agitação, há grande dificuldade de regular o pH, assim soluções tampões são utilizadas (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1980; ESTERBAUER *et al.*, 1991).

T. reesei Rut C-30 é conhecido por produzir maior atividade de celulases em pH 4,5 e para a produção de xilanase, enquanto para o crescimento o pH ótimo é 6,0 (CALLOW & JU, 2012). Para *P. echinulatum* S1M29, as maiores atividades de xilanases (18,5 IU/mL), endoglicanases (8,2 UI/mL) e FPA (0,9 UI/mL) foram obtidas em pH inicial entre 6,0 e 7,0, em frascos sob agitação. Em biorreator, as maiores atividades para essas enzimas foram obtidas em pH entre 5,5 e 6,5 (REIS *et al.*, 2014). O maior crescimento de *Clostridium thermocellum* (~ 0,7 mg/mL) foi observado em pH inicial de 7. A atividade de endo- β -glicanase (~ 1,20 UI/mL) ocorreu a um pH inicial de 7,4 (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1980).

Assim como o pH é um importante parâmetro de cultivo para obtenção da máxima produção de enzimas celulases, a temperatura também é crítica (JUHÁSZ *et al.*, 2005; SOHAIL *et al.*, 2009). A temperatura ótima para a produção de celulases em frascos sob agitação em *T. reesei* é de 25 a 28 °C e para o crescimento do microrganismo é de 30 °C (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

Foram produzidas atividades de celulases (FPA = 8,3 UI/mL; endoglicanases = 37,3 UI/mL) e xilanases (177 UI/mL) por *P. echinulatum* S1M29 em culturas em batelada alimentada com temperatura mantida em 28 °C e pH mantido em 6,0. Nesse experimento, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima de 30 % e a frequência dos agitadores

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

entre 270 e 750 rpm (REIS *et al.*, 2013). Delabona *et al.* (2012) ajustaram o nível de O₂ dissolvido para que não ficasse abaixo de 30% da saturação do ar.

Outro fator importante é a formação de espuma, que pode ser controlada no meio pela adição de agentes antiespumantes, como por exemplo, polipropileno glicol em concentrações de 1 mL/L (DELABONA *et al.* 2012). Também, silicone pode ser adicionado ao meio como agente antiespumante (DOPPELBAUER *et al.*, 1987).

3.3.3 Processos de cultivos sólidos e líquidos para produção de enzimas

Sistemas de cultivos sólidos e líquidos têm sido usados para produção de enzimas, mas o primeiro apresenta vantagens adicionais, pois tem um custo mais baixo, menor consumo de energia, um meio de fermentação simples, tem produtividade superior, não requer um controle rigoroso de parâmetros de fermentação e produz pouco efluente líquido (BANSAL *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2012).

Cultivo em estado sólido (CES) ou fermentação em estado sólido (*solid-state fermentation*) pode ser definido como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência ou quase ausência de água livre. Crescimento de fungos em CES é diferente quando comparado com o crescimento em cultivos submersos (CS) por causa de diferentes fenômenos de superfície, umidade e composição química do substrato. Vários estudos têm registrado maior atividade enzimática em CES do que em CS, quando se comparam a mesma linhagem e meio de cultivo (WINQUIST *et al.*, 2008; SINGHANIA *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2012; PRÉVOT *et al.*, 2013).

O CES para produção de celulasas tem despertando o interesse como uma tecnologia de custo eficaz, pois produz títulos relativamente elevados de celulase, devido às condições de cultivo, que apresentam semelhança com o ambiente natural. O CES pode ser considerado como uma tecnologia de futuro para produção comercial de celulasas, considerando o baixo custo inicial e a capacidade de utilizar fontes naturalmente disponíveis de celulose como substrato. CES oferece muitas vantagens sobre CS, incluindo maiores atividades enzimáticas, maior concentração de produtos, menor geração de efluentes e repressão catabólica baixa (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Comercialmente, a maior parte das celulasas e xilanases são produzidas em CS, pois se tem considerado que os fatores de produção são mais fáceis de controlar e manter. No entanto, o método pode ser complexo, pois envolve mistura, aeração, controle e

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

monitoramento de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, entre outros fatores. Também, os fungos filamentosos, que são considerados como fortes excretadores de celulases e xilanases, apresentam melhor desempenho utilizando CES, pois o meio sólido simula o *habitat* natural dos fungos. Além disso, CES é mais vantajoso, uma vez que apresenta maiores atividades enzimáticas, maior estabilidade do produto, baixo risco de contaminação e custos instrumentais menores. Outra vantagem é o uso de resíduos agro-lignocelulósicos sólidos de baixo custo que atuam como fonte de carbono e energia, diminuindo ainda mais a necessidade de meio nutritivo dispendioso (LEVER *et al.*, 2010; ANG *et al.*, 2013), pois o substrato utilizado é fator determinante no processo para redução de custos de produção de enzimas. Vários substratos celulósicos têm sido utilizados, como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, farelo de trigo, farelo de soja, entre outros.

Cultivo submerso (CS), ou fermentação submersa (*submerged fermentation*), é definido como o cultivo na presença de excesso de água (SINGHANIA *et al.*, 2010; PRÉVOT *et al.*, 2013). Quase todas as instalações produtoras de enzimas em grande escala estão usando a tecnologia de CS, devido a um melhor monitoramento e facilidade de manuseio (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Para cultivos com fungos, a maioria dos modelos citados na literatura descreve o CS em meios homogêneos, onde a morfologia dos fungos pode ser de micélios livres ou *pellets*, ou uma combinação dos dois (KOUTINAS *et al.*, 2003).

O CS gera produtos mais diluídos, mas uma vantagem dos sistemas homogêneos submersos são as técnicas de controle e monitoramento do biorreator já serem bem estabelecidas (CUNHA *et al.*, 2012). Os CS têm inconvenientes como as enzimas produzidas terem estabilidade menor em relação à temperatura, pH e íons metálicos. Algumas enzimas não são secretadas para o meio como em CES (LI *et al.*, 2013).

Celulases e xilanases podem ser produzidas por CS em frascos sob agitação ou em biorreatores. Os processos em biorreatores podem ser operados de três modos: em batelada, contínuo ou em batelada alimentada. Em operações em batelada, todos os nutrientes devem estar presentes no início do processo, antes da inoculação. Em um processo de cultivo contínuo, há uma entrada e uma saída no meio para que o volume e a concentração de nutrientes mantenham-se constantes. Nos processos em batelada alimentada, um ou mais nutrientes são fornecidos ao meio, mas não há fluxo de saída durante o experimento (MINIHANE & BROWN, 1986; JOHNSON, 1987; REIS *et al.*, 2013).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Embora a maioria dos processos utilizados seja em batelada, há tentativas de se produzir celulases em batelada alimentada com maior produção de enzimas ou em modo contínuo, que supostamente pode ajudar na repressão causada pelo acúmulo de açúcares redutores no meio (HENDY *et al.*, 1984; JOHNSON, 1987; SZABÓ *et al.*, 1996; SINGHANIA *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2013).

No cultivo descontínuo alimentado, um ou mais nutrientes são fornecidos enquanto as células e os produtos permanecem no biorreator até o fim da operação. Este processo é, geralmente, superior ao processamento em batelada quando as concentrações de nutrientes afetam a produtividade e o rendimento do produto final (MINIHANE & BROWN, 1986; LEE *et al.*, 1999).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a concentração de nutrientes num intervalo ótimo de tempo. Esse controle não é simples, uma vez que faltam modelos precisos para descrever o crescimento celular e a formação de produto, a natureza do bioprocessamento não é linear, o processo apresenta resposta lenta e faltam sensores seguros para controles dos parâmetros *on-line* (LEE *et al.*, 1999).

A fim de controlar o processo, vários parâmetros são usados e podem ser classificados como variáveis medidas ou manipuladas. Variáveis medidas diretamente incluem a temperatura, o pH, oxigênio dissolvido (OD), concentração do substrato, pressão e composição do gás na saída. Esses parâmetros podem ser medidos diretamente por oxímetros, pHmetros, termômetros, espectrofotômetros, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), analisadores de glicose, cromatógrafos a gás e espectrômetros de massa. As variáveis indiretamente determinadas (manipuladas) podem ser a taxa de crescimento específico (μ), concentração de células (x), taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa de transferência de oxigênio (OTR), taxa de evolução de dióxido de carbono (CER) e quociente respiratório (RQ). As variáveis manipuladas incluem a velocidade de agitação e a taxa de alimentação de substrato (MINIHANE & BROWN, 1986; JOHNSON, 1987; SZABÓ *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1999; VALENTINOTTI *et al.*, 2003).

3.4 Hidrólise e pré-tratamentos

O processo para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos requer uma etapa de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentáveis, podendo ser hidrólise ácida ou enzimática. As condições para a hidrólise ácida são severas, tais como temperaturas elevadas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

e pH baixo. Assim, para essas condições, são necessários equipamentos de custo elevado, resistentes à corrosão. Também, há a exigência de neutralização antes da fermentação. Outro fator é a produção de inibidores como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural. Em contrapartida, a hidrólise enzimática é realizada em condições mais brandas e tem potencial para total conversão de biomassa em glicose, devido à alta especificidade das reações enzimáticas (KHAWLA *et al.*, 2014).

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos através de enzimas celulásicas é um dos caminhos mais promissores para a obtenção de combustíveis e produtos químicos alternativos (ADSUL *et al.*, 2005; KHAWLA *et al.*, 2014).

A hidrólise enzimática da celulose ocorre através de um sistema complexo de reações envolvendo várias etapas: transferência de enzimas da fase aquosa até a superfície das partículas celulósicas; adsorção da enzima e formação do complexo enzima-substrato (considerada a etapa crítica do processo); hidrólise da celulose; transferência de celodextrinas, glicose e celobiose da superfície das partículas celulósicas até a fase aquosa; hidrólise das celodextrinas e celobiose à glicose na fase aquosa (WALKER & WILSON, 1991).

O rendimento da hidrólise enzimática depende do tipo do material e de outros fatores, podendo-se citar o conteúdo e, principalmente, a acessibilidade da celulose na matriz, eficiência das enzimas utilizadas, modo de interação entre as celulasas e a fibra celulósica, o grau de ruptura mecânica, fatores físico-químicos (temperatura, pH, duração de exposição, concentração inicial de enzimas, presença de inibidores, concentração de substrato, natureza das celulasas empregadas, entre outros fatores) (WALKER & WILSON, 1991; SINGHANIA *et al.*, 2010; BRUMMER *et al.*, 2014; RAGHUWANSHI *et al.*, 2014).

Muitas características específicas são desejadas em celulasas para conversão de biomassa, tais como alta eficiência catalítica sobre substratos celulósicos insolúveis, maior estabilidade a temperaturas elevadas e em um determinado pH e elevada tolerância à inibição do produto final. A maioria dos fungos filamentosos, tais como *T. reesei* e *A. niger* produzem celulasas ácidas, que são adequadas para a hidrólise da biomassa. Normalmente, a temperatura de 50 ° C é utilizada para a hidrólise por celulase (CAMASSOLA *et al.*, 2004; SINGHANIA *et al.*, 2010).

Tem-se mostrado frequentemente que o percentual e a extensão da hidrólise celulósica são influenciados pela estrutura do substrato celulósico. Os dois itens considerados mais importantes são a área superficial e a cristalinidade. A celulose é um substrato poroso heterogêneo com superfície externa e interna. As fibras celulósicas contêm regiões amorfas e

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

crystalinas. As regiões cristalinas são consideradas de maior dificuldade para degradação. Assim, têm sido desenvolvidos pré-tratamentos para reduzir a cristalinidade e aumentar a área superficial da celulose, através da remoção da lignina e hemicelulose (Figura 5). Os pré-tratamentos podem ser físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos (WALKER & WILSON, 1991; SUN & CHENG, 2002; MAEDA *et al.*, 2011; MOOD *et al.*, 2013).

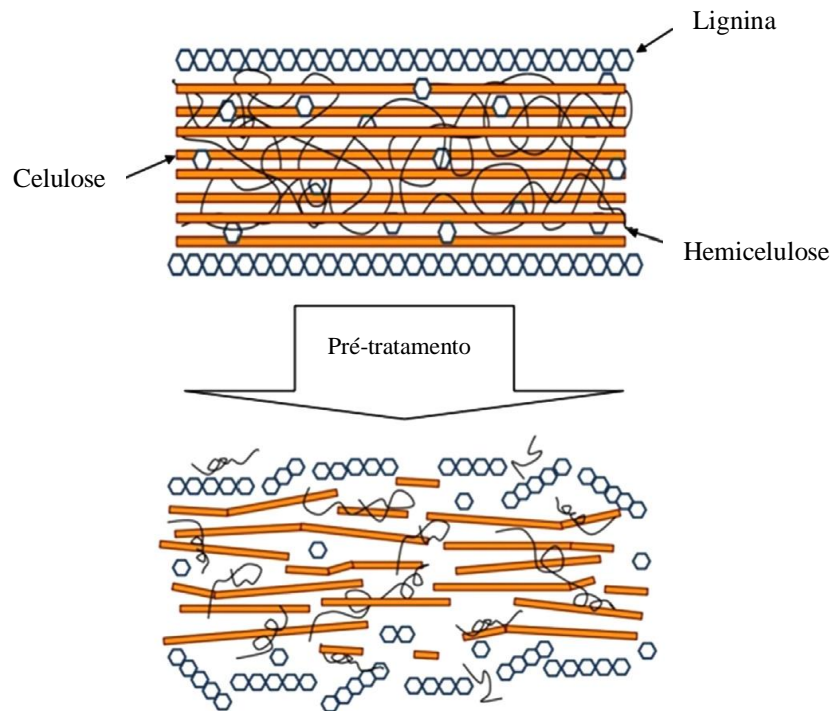


Figura 4. Representação esquemática do efeito do pré-tratamento em material lignocelulósico (MOOD *et al.*, 2013).

Entre os pré-tratamentos físicos, podem ser citados a trituração mecânica, moagem (moinho de bolas, moagem de dois rolos, moagem por martelo, moagem coloidal e moagem a disco são os processos mais utilizados), extrusão, congelamento, radiação por micro-ondas, entre outros. O objetivo desses processos é reduzir o tamanho das partículas de materiais lignocelulósicos e, também, diminuir o grau de polimerização e conduzir à descristalização da matéria-prima. Em muitos casos, combinações de pré-tratamentos físicos e outros pré-tratamentos são utilizadas (SUN & CHENG, 2002; ALVIRA *et al.*, 2010; MOOD *et al.*, 2013).

Como pré-tratamentos físico-químicos, são utilizados a explosão a vapor, a explosão de fibra com amônia (AFEX – *ammonia fiber explosion*) e a explosão com CO₂. A explosão a vapor é o método mais comumente utilizado. Neste método, lascas de biomassa são tratadas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

com vapor saturado de alta pressão e, em seguida, a pressão é reduzida rapidamente, o que faz com que os materiais sejam submetidos a uma descompressão explosiva. Esse processo normalmente é iniciado a uma temperatura de 160-260 °C (correspondendo à pressão de 0,69-48,83 MPa), durante alguns segundos a alguns minutos antes que o material seja exposto à pressão atmosférica. Esse processo provoca a degradação da hemicelulose e lignina devido à alta temperatura, aumentando o potencial de hidrólise. No processo AFEX, os materiais lignocelulósicos são expostos a amoníaco líquido à temperatura e pressão elevadas durante um período de tempo e, em seguida, a pressão é reduzida rapidamente. Esse processo pode melhorar significativamente as taxas de sacarificação de várias culturas herbáceas e gramíneas. Também, pode ser usado para o pré-tratamento de palhas, farelos e outros materiais lignocelulósicos. O processo de explosão com CO₂ é semelhante aos processos de explosão a vapor e AFEX. Postula-se que o CO₂ formaria ácido carbônico, aumentando a taxa de hidrólise (SUN & CHENG, 2002; MOOD *et al.*, 2013).

Os pré-tratamentos químicos descritos para lignocelulósicos são a ozonólise, a hidrólise ácida, a hidrólise alcalina, a delignificação oxidativa e o processo com solventes orgânicos (SUN & CHENG, 2002). Também, podem ser citados os pré-tratamentos com líquidos iônicos (MOOD *et al.*, 2013).

Na ozonólise, o ozônio é usado para degradar a lignina e a hemicelulose. Tem como vantagens a remoção eficaz da lignina, não produz efluente tóxico, as reações são realizadas em temperatura e pressão ambientes. O inconveniente é que há a necessidade de quantidades elevadas de ozônio, tornando o custo do processo elevado. Na hidrólise ácida, ácidos sulfúrico e clorídrico concentrados são usados para tratar os materiais lignocelulósicos. São agentes poderosos para a hidrólise da celulose, mas são tóxicos, corrosivos, perigosos e necessitam de reatores resistentes à corrosão. Ainda, o ácido concentrado deve ser recuperado após a hidrólise, para que o processo seja viável economicamente. O processo de hidrólise alcalina pode utilizar algumas bases como hidróxido de sódio e amoníaco. O tratamento de materiais lignocelulósicos com NaOH diluído causa intumescimento no material, levando a um aumento da área superficial interna, diminuição do grau de polimerização, decréscimo da cristalinidade, separação das ligações estruturais entre a lignina e hidratos de carbono e ruptura da estrutura da lignina. No processo de delignificação oxidativa, a biodegradação da lignina pode ser catalisada pela enzima peroxidase na presença de H₂O₂. O processo com solventes (*organosolv*) utiliza solventes orgânicos ou solventes orgânicos aquosos juntamente com catalisadores ácidos inorgânicos (HCl ou H₂SO₄) para quebrar as ligações internas de

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

lignina e hemicelulose. Podem ser utilizados solventes como metanol, etanol e acetona (SUN & CHENG, 2002; MOOD *et al.*, 2013). O pré-tratamento com líquidos iônicos (LIs) pode dissolver carboidratos e lignina simultaneamente. São usados sais orgânicos compostos de cátions e íons, normalmente grandes cátions orgânicos e pequenos íons inorgânicos. A celulose pode ser dissolvida por LIs contendo cloreto, formato, acetato ou íons alquilfosfonatos. Ligações de hidrogênio são formadas entre os íons não hidratados de LIs e os prótons hidroxila dos açúcares que conduzem à degradação da rede complexa de celulose, hemicelulose e lignina (MOOD *et al.*, 2013).

Nos processos de pré-tratamento biológico, microrganismos como fungos da podridão, são usados para degradar a lignina e a hemicelulose. Os fungos da podridão marrom atacam principalmente celulose e os fungos da podridão branca e mole atacam tanto celulose quanto lignina. Os fungos da podridão branca são os basidiomicetos mais eficazes para o pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos (SUN & CHENG, 2002; MOOD *et al.*, 2013).

A adição de agentes tensoativos durante a hidrólise é capaz de modificar as propriedades de superfície da celulose e minimizar a ligação irreversível da celulase com a celulose. Os surfactantes não iônicos utilizados na hidrólise enzimática incluem Tween 20[®], 80[®], polioxietileno glicol, Tween 81[®], Emulgen 147[®], anfotérico Anhitole 20BS[®], e os catiônicos Q-86W[®], ramnolipido e bacitracina. Os efeitos inibitórios foram observados com catiônico Q-86W[®] em concentração elevada e com o surfactante aniônico Neopelex F-25[®]. Assim, acredita-se que os surfactantes não iônicos são mais apropriados para aumentar a hidrólise da celulose (SUN & CHENG, 2002).

3.5 Processos de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

A biomassa sacarificada é utilizada para a fermentação. No entanto, a utilização industrial de lignoceluloses para produção de bioetanol é dificultada pela falta de microrganismos que possam fermentar, de forma eficiente, pentoses e hexoses. Um microrganismo ideal deve desencadear ampla utilização do substrato, ter alto rendimento e alta produtividade, resistir a altas concentrações de etanol e altas temperaturas, deve ser tolerante aos inibidores presentes no hidrolisado e ter atividade celulolítica para que a produção do etanol seja viável. Assim, vêm sendo estudados microrganismos geneticamente modificados para obter a total utilização dos açúcares presentes no hidrolisado (TALEBNIA *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os microrganismos mais conhecidos para a produção de etanol a partir de hexoses são a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, que apresentam altos rendimentos em etanol (90-97 % do valor teórico) e tolerância elevada ao etanol no meio de fermentação. A incapacidade de utilizar xilose, o principal açúcar C5 derivado da hemicelulose, é a principal desvantagem das linhagens nativas de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* (TALEBNIA *et al.*, 2010).

Os processos estudados para fermentação de hidrolisado lignocelulósico são sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e hidrólise e fermentação separadas (SHF). O processo SHF tem sido o mais usado, mas SSF é superior para a produção de etanol, uma vez que pode aumentar o rendimento, removendo a inibição do produto final e eliminando a necessidade de reatores separados, mas a diferença nas condições de temperatura ideal da enzima para a hidrólise e o desenvolvimento da fermentação é um limitante. Pode-se diminuir a desvantagem de SSF pela utilização de microrganismos termotolerantes, como *Kluyveromyces marxianus*, que podem suportar temperaturas mais elevadas, necessárias para a hidrólise enzimática (BINOD *et al.*, 2010; TALEBNIA *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012).

Além de SSF ou SHF, as alternativas disponíveis são bioprocessamento consolidado – CBP - (BINOD *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012) e sacarificação com cofermentação simultânea – SSCF - (SARKAR *et al.*, 2012). No CBP, a hidrólise da biomassa, a produção de celulases e a fermentação do etanol são realizados juntos em um único reator. O processo também é conhecido como conversão microbiana direta – DMC - (TALEBNIA *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012). Mono ou cocultura de microrganismos são geralmente utilizadas para fermentar celulose diretamente a etanol.

Nos hidrolisados lignocelulósicos, a glicose e a xilose são os açúcares em maior concentração. A principal dificuldade de utilizar dois microrganismos para a cofermentação destes dois tipos de açúcares é a incapacidade de fornecer as condições ambientais ótimas para as duas linhagens de forma simultânea. Muitos estudos relatam que, enquanto a fermentação de glicose na mistura de açúcar prosseguiu de forma eficiente com uma levedura de fermentação de glicose tradicional, a fermentação da xilose foi frequentemente lenta e de baixa eficiência, devido ao conflito de requisitos de oxigênio entre as duas leveduras e/ou à repressão catabólica na assimilação da xilose causada pela glicose (BINOD *et al.*, 2010).

O CBP, no entanto, não é um processo eficiente por causa do baixo rendimento na produção de etanol e períodos longos de fermentação (3-12 dias). Em SSCF, os

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

microrganismos da cofermentação precisam ser compatíveis em termos de pH e temperatura de operação. Uma combinação de *Candida shehatae* e *S. cerevisiae* foi relatada como sendo adequada para o processo SSCF. Fermentação sequencial com dois microrganismos diferentes em diferentes períodos do processo de fermentação para a melhor utilização do açúcar também tem sido empregada com *S. cerevisiae* na primeira fase para a utilização de hexoses e *C. shehatae* na segunda fase para a utilização das pentoses, mas os rendimentos de etanol atingidos não são elevados (SARKAR *et al.*, 2012).

Alternativamente, a engenharia genética tem sido empregada para desenvolver em um único microrganismo a capacidade de fermentar concomitantemente a glicose e a frutose (BINOD *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012).

Diante desse contexto, este trabalho visou à produção de celulasas e xilanases com a substituição parcial ou total de farelo de trigo e/ou de soja por resíduos de nabo forrageiro, em cultivos em estado sólido e submerso, aumentando, assim, os conhecimentos em processos já existentes. Também, visou auxiliar a obtenção de uma nova aplicação para o resíduo de nabo forrageiro (torta).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*, obtida a partir da linhagem de 9A02S1, após etapas de mutagênese com H₂O₂ (DILLON *et al.*, 2011). A linhagem utilizada pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

4.2 Meios de cultivo

Meio sólido para crescimento e manutenção da linhagem de *P. echinulatum* S1M29: para preparar 100 mL do meio, utilizou-se 10 mL de SM, 0,1 g de proteose peptona, 40 mL da suspensão de 2,5 % (m/v) de celulose intumescida, 2 g de ágar e 50 mL de água destilada.

A solução mineral (SM) baseou-se na formulação de Mandels & Reese (1957) e foi composta por: KH₂PO₄ (2,0 g); (NH₄)₂SO₄ (1,3 g); CO(NH₂)₂ (0,3 g); MgSO₄.7H₂O (0,3 g); CaCl₂ (0,3 g); FeSO₄.7H₂O (5,0 mg); MnSO₄.H₂O (1,56 mg); ZnSO₄.7 H₂O (1,4 mg); CoCl₂.6 H₂O (2,0 mg). Estes sais foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada, sendo a solução autoclavada e armazenada a 4 °C.

Meio controle para produção de celulases em cultivos em estado sólido (CES): o meio controle de CES foi constituído de 1,0 g de farelo de trigo e 1,0 mL de SM. Foi avaliada a variação da composição do meio controle utilizando-se resíduo de nabo forrageiro (Tabela 4).

A torta de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) resultante da extração do óleo foi cedida pelo professor Gabriel Pauleti, do Curso de Agronomia da Universidade de Caxias do Sul. Essa torta foi designada como resíduo de nabo forrageiro (RNF). Para retirar o óleo excedente ainda presente na torta, foi realizado processo de extração em extrator Tecnal TE-044, durante 2 horas, com álcool etílico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 4. Composição dos meios de cultivo em estado sólido empregados para a produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum*.

	FT (g)	RNF (g)
Meio 1 (controle)	1,0	-
Meio 2	-	1,0
Meio 3	0,5	0,5
Meio 4	0,75	0,25
Meio 5	0,25	0,75

FT – farelo de trigo; RNF - resíduo de nabo forrageiro após a extração do óleo.

Meio líquido controle de crescimento e produção de celulases em cultivos submersos: utilizou-se, para cada 100 mL do meio, 10 mL de SM, 0,5 g de farelo de trigo, 0,2 g de farelo de soja, 1 g de celulose, 0,1 mL de Tween 80[®], 90 mL de água destilada. Após a autoclavagem, adicionou-se 0,16 mL de solução de ciprofloxacino (dissolução de um comprimido de cloridrato de ciprofloxacino *Proflox*[®]- EMS S/A correspondendo a uma quantidade de 500 mg de ciprofloxacino em 40 mL de água destilada esterilizada. Para cada 100 mL de meio de cultivo, acrescentou-se 0,16 mL da solução de antibiótica para atingir uma concentração final mínima de 0,02 mg/mL).

Foi avaliada a possibilidade de utilizar o resíduo de nabo forrageiro em substituição ao farelo de soja, farelo de trigo e celulose ou combinações dos mesmos, como descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Composição dos meios de cultivo empregados para a produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em cultivo submerso.

	Celulose (g/100 mL)	Farelo de trigo (g/100 mL)	Farelo de soja (g/100 mL)	RNF (g/100 mL)
Meio 1 (controle)	1,0	0,5	0,2	-
Meio 2	1,0	-	-	0,7
Meio 3	-	-	-	1,7
Meio 4	1,0	-	0,2	0,5

RNF - resíduo de nabo forrageiro após a extração do óleo

Todos os meios de cultivo preparados para este trabalho foram autoclavados a 1 atm durante 15 minutos.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Crescimento e manutenção de linhagens

As culturas foram crescidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento e manutenção, incubadas durante sete (07) dias a 28°C até a formação de conídios. Os tubos foram armazenados a 4°C até a serem utilizados para a preparação das suspensões de conídios.

4.3.2 Produção de celulasas e xilanases em cultivos em estado sólido

Para CES conduzidos em bancada, foram utilizados frascos de vidro de 12 cm de altura por 4 cm de diâmetro, contendo 1 grama de substrato embebido com 1 mL de SM, conforme Mandels & Reese (1957). Os ensaios foram realizados em quadriplicatas. Os frascos foram autoclavados a 1 atm durante 15 minutos. Após, os meios foram inoculados com 1 mL de uma suspensão 1×10^6 conídios/mL. Os frascos foram mantidos em câmara com umidade relativa em torno de 95 % e temperatura de 28 a 30 °C, durante seis (06) dias. As coletas foram realizadas em 48, 72, 96, 120 e 144 horas. As amostras coletadas não retornaram à câmara úmida.

O meio foi homogeneizado e, após, foram adicionados 10 mL de água destilada e o pH foi determinado (pHtex[®] PHS-3B). Em seguida, 17 mL de tampão citrato 0,05 mol/L com pH ajustado em 4,8 foram acrescentados a cada frasco visando à extração da enzima. Os frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm) durante 30 minutos. Após, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 4000 rpm, à temperatura de 4 °C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação de açúcares redutores e atividades enzimáticas.

4.3.3 Produção de celulasas e xilanases em cultivos submersos

Frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL do meio líquido para a produção de celulasas, foram inoculados com uma suspensão de conídios para possibilitar 1×10^7 conídios/mL. Os ensaios foram realizados em quadriplicatas. Os frascos foram mantidos a 28 °C e agitação recíproca (180 rpm), durante cinco dias. As amostras foram coletadas a cada 24

horas para a realização das dosagens enzimáticas e não retornaram ao agitador. Após a coleta das amostras, foi determinado o pH e as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, à temperatura de 4 °C, durante 30 minutos.

4.3.4 Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos

A avaliação do potencial hidrolítico do complexo enzimático produzido na presença de resíduo de extração de óleo de nabo forrageiro foi realizada de acordo com Adsul *et al.* (2005), com algumas modificações. Foi avaliado o potencial hidrolítico sobre diferentes substratos: capim elefante, capim elefante pré-tratado por explosão a vapor, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Também, empregou-se celulose Celufloc E[®] (Celuflok Celulose e Amidos Ltda.) e Avicel[®] (celulose microcristalina Fluka).

Em frascos de 50 mL, foram adicionados 1 g de diferentes substratos celulósicos. Esse processo foi realizado em triplicata. Foram utilizadas 10,0 UI de FPA/g de substrato, proveniente de extratos enzimáticos obtidos em diferentes cultivos: CES (50 % RNF + 50 % FT), CS (41,18% RNF + 58,82 % Cel) e EP (Enzima Padrão) produzida em CES (50 % bagaço de cana-de-açúcar + 50% de farelo de trigo). Completou-se o volume para 50 mL com tampão citrato (pH 4,8; 50 mmol/L) e foi adicionada azida sódica para obtenção de concentração final de 0,02 % (m/v). Esta mistura colocada em banho-maria a 50 °C - condição ótima para atividade enzimática de *P. echinulatum*, conforme Camassola *et al.* (2004) - com agitação mantida a 150 rpm. Volumes de 1 mL foram coletados em 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas para análise de açúcares.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação de FPA (atividade enzimática sobre papel filtro)

Para a dosagem de celulases totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), adaptada de Mandels *et al.* (1976), descrita em Camassola & Dillon (2012).

Foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume de 1,5 mL em cada poço). Em cada poço da placa, foram adicionados 50 µL de solução enzimática e 100 µL de

tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. A placa foi colocada em banho a 50 °C, durante 10 minutos, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima e o tampão citrato de sódio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima.

Em seguida, foram adicionados em cada poço 5 mg de papel filtro (*Whatman* nº 1) em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50 °C. Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução do reagente DNS. A solução para dosagens de açúcares redutores (DNS) que foi utilizada foi descrita por Miller (1959), sendo composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (2,12 g), hidróxido de sódio (3,92 g), tartarato de sódio e potássio (61,20 g), fenol (1,52 g), metabissulfito de sódio (1,66 g) e água destilada (283,3 mL).

. De acordo com esse método, o DNS sofre redução de um de seus grupos nitro ao reagir com os carboidratos, formando um composto que apresenta forte absorção em 545 nm. A placa foi colocada em banho a 100 °C, por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionados 200 µL de água destilada, sendo a absorbância medida em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra Max 190) a 545 nm.

A determinação das atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foram determinadas por meio de curva de calibração construída com soluções de glicose em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 com concentrações de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.mL⁻¹, por meio de regressão linear.

A unidade de FPA foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol/L de açúcar redutor por minuto.

4.4.2 Determinação de endoglicanase

A determinação da atividade de endoglicanase, segundo Ghose (1987) com modificações (CAMASSOLA & DILLON, 2012), foi realizada empregando-se 10 µL da solução enzimática diluída em 40 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50 °C, por 5 minutos, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de ação dessa enzima. Em seguida, foram adicionados em cada poço 50 µL de solução de carboximetilcelulose a 2 % (m/v) (preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8, acrescida de 0,1 mL de solução de azida sódica a 0,5 % (m/v)) previamente aquecida a 50 °C, mantendo-se as placas por 30

minutos em banho a 50 °C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100 °C, por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionados 200 µL de água destilada, sendo a absorvância medida em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra Max 190) a 545 nm.

A determinação das atividades de endoglicanase presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 com concentrações de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.mL⁻¹, por meio de regressão linear.

A unidade de endoglicanase foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol/L de açúcar redutor por minuto.

4.4.3 Determinação de β-glicosidase

A determinação da atividade de β-glicosidase foi realizada empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional contendo 10 µL da amostra e 90 µL de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (p-NPG 4,0 g/L em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8) foi incubada a 50 °C por 30 minutos, sendo interrompida com a adição de 200 µL de uma solução de Na₂CO₃ a 10 % (m/v). A absorvância de β-glicosidase foi estimada espectralmente a 405 nm.

Uma unidade de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar por hidrólise 1 µmol de p-NPG por minuto nas condições do ensaio.

4.4.4 Determinação de xilanase

A determinação das atividades de xilanase foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 µL de caldo enzimático e 40 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 juntamente com 50 µL de uma solução de xilana de aveia a 1% (m/v) (preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 acrescido de 0,1 mL de solução de azida sódica a 0,5 % (m/v)) previamente aquecida a 50 °C. A placa foi mantida em banho a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 300 µL de DNS e a placa foi mantida em banho a 100 °C por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μL de amostra em placa de 96 poços e adicionados 200 μL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm.

As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01 mol/L em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, por meio de regressão linear.

Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de xilose por minuto.

4.4.5 Determinação de açúcares redutores

O teor de açúcares redutores (AR) presentes nos meios foi determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma mistura reacional contendo 100 μL da amostra (diluída, quando necessário) e 300 μL da solução do reagente DNS foi mantida em banho a 100 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriada em banho de gelo.

Após resfriamento, adicionou-se 100 μL da reação em placa tipo Elisa contendo 200 μL de água destilada e a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (545 nm).

As concentrações de AR presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose com concentrações de 0,0-2,0 mg/mL, por meio de regressão linear.

4.4.6 Determinação de sacarose

A determinação do consumo de sacarose foi realizada por hidrólise ácida de acordo com o método preconizado por Falcone & Marques (1965), com modificações. Para tanto, 0,5 mL da amostra, cujos valores de AR foram previamente determinados, foram hidrolisados com 0,5 mL de HCl 2 mol/L por 10 minutos a 65 °C. Após resfriamento das amostras, foram acrescentados 1,25 mL de NaOH 1 mol/L para a neutralização e 2,75 mL de água destilada para obter uma diluição final de 1:10. Em seguida, 0,25 mL da amostra hidrolisada e diluída, acrescida de 0,75 mL de DNS, foram fervidos por 5 minutos para reação com os açúcares redutores. Em seguida, foram acrescentados 4,0 mL de água destilada, para posterior leitura no espectrofotômetro a 545 nm. A concentração de sacarose foi determinada através de curva

de calibração construída com soluções de sacarose com concentrações de 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2,0 mg/mL, por meio de regressão linear.

4.4.7 Determinação indireta da concentração da massa miscelial

A massa fúngica (micelial) foi determinada indiretamente pela concentração de N-acetil-D-glicosamina pela hidrólise enzimática da quitina da parede celular (BITTENCOURT *et al.*, 2002). Para tal procedimento, 1 mL da amostra lavada foi mantida em estufa, em temperatura em torno de 40 °C, por 24 horas. Após, foram adicionados 3 mL de tampão citrato (pH 4,8, 0,05 mol/L) e as amostras foram tratadas em ultrassom por 60 min. Em cada amostra foram adicionados 2 mL de enzima a 30 % (Viscozyme L[®]) por 24 horas a 45 °C. Após este período, as amostras foram fervidas por 10 minutos para desativação da enzima. As amostras foram resfriadas e centrifugadas em centrífuga Eppendorf[®] a 4000 rpm, por 20 minutos.

Para a determinação da concentração de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia segundo Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada, foi adicionado 1 mL da solução de acetilacetona (0,75 mL de acetilacetona completandopara 25 mL com solução de carbonato de cálcio 1,25 N). As amostras foram fervidas por 20 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL de 4-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (3,2 g em 20 mL de etanol e 20 mL de HCl). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e a absorbância lida a 530 nm.

Para a conversão das concentrações de N-acetil-D-glicosamina presentes nas amostras de cultivo em estado sólido, foi construída uma curva com micélio (0 a 30 mg/mL) de *P. echinulatum* (S1M29) de cultivo líquido, afim de obter os teores de N-acetil-D-glicosamina no micélio. As absorbâncias resultantes das diferentes concentrações de micélio foram convertidas em N-acetil-D-glicosamina a partir de curva padrão construída com concentrações de N-acetil-D-glicosamina entre 0,5 a 1 mg/mL.

4.4.8 Zimogramas

Para a detecção da atividade de endoglicanases em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), a metodologia foi baseada em Sun *et al.* (2008). O gel separador a 12 % (m/v) foi preparado com adição de carboximetilcelulose (CMC) a 2 % (m/v) até concentração final de 0,2 % no gel (LAEMNLI, 1970).

A preparação das amostras, que foram solubilizadas em solução tampão, foi realizada em microtubos de 2 mL. Após, as amostras foram aplicadas nas canaletas do gel com subsequente corrida eletroforética a 200 V por 1 a 2 horas.

O gel foi lavado, para a remoção do SDS, durante 30 minutos em solução a 25 % (v/v) de isopropanol em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 minutos no mesmo tampão, sendo ambos os processos realizados sob agitação de 60 rpm e temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi incubado por 10 minutos a 40 °C em solução de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. O gel foi corado com solução de 0,1 % (m/v) de vermelho congo durante 30 minutos e revelado com solução de NaCl 1 mol/L. As bandas claras visualizadas no fundo vermelho indicaram a degradação do CMC.

Para a análise de xilanase, os procedimentos foram semelhantes aos utilizados para endoglicanase, sendo que o substrato da reação (CMC) foi substituído por solução aquosa de xilana a 1% (m/v).

A análise de β -glicosidase foi realizada em gel de poliacrilamida a 12 % (m/v), sendo a metodologia baseada em Schwarz *et al.* (1987).

A preparação da amostra foi realizada em microtubos de 2 mL. As amostras foram liofilizadas para obtenção do *pellet*. O *pellet* seco foi solubilizado em 25 μ L de tampão amostra e aplicado na canaleta do gel. A corrida eletroforética foi realizada tal qual para endoglicanase.

Para a remoção do SDS e renaturação das enzimas, o gel foi lavado durante 30 minutos em solução de isopropanol a 25 % (v/v) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 minutos no mesmo tampão. Em seguida, o gel foi imerso em solução de esculina a 0,2 % (m/v) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8 por 30 minutos. Os processos foram realizados sob agitação de 60 rpm e temperatura ambiente. Para a revelação, utilizou-se uma solução de 1 % (m/v) de FeCl₃. As bandas escuras em fundo claro indicam a atividade de β -glicosidase. Os géis foram fotografados nos primeiros 15 minutos da reação.

Para a obtenção dos zimogramas de EP, CES e CS foram utilizados os mesmos volumes de caldo enzimático que para a hidrólise, sendo completado o volume para 50 mL. Após, foram liofilizados 3 μL de cada amostra para o zimograma de endoglicanase e de xilanase e 100 μL para o de β -glicosidase.

4.4.9 Determinação da concentração de açúcares, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol

As amostras coletadas da hidrólise enzimática foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) para análise das concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol. Para a análise cromatográfica isocrática, foi utilizada uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm de diâmetro interno), operada a 60 °C e tendo como eluente uma solução 5 mmol.L^{-1} de ácido sulfúrico com fluxo de 0,6 mL.min^{-1} e um detector Shimadzu modelo RID-10A para índice de refração. A quantificação foi determinada com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado.

4.4.10 Análise química do resíduo de nabo forrageiro

A composição química do RNF foi realizada de acordo com o método “TAPPI T222 os-74” para a determinação de lignina de Klason.

Uma quantidade de amostra seca (100 mg) de RNF foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico a 72 % (v/v) a 25 °C pelo período de 1 hora, sob agitação constante. Após este período, a mistura foi diluída até uma concentração de 3 % (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão mantida em autoclave (1 atm) por 1 hora para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa a 90 °C até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra (GOMIDE & DEMUNER, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria, através da equação:

$$C \text{ (g/L)} = \frac{4,53 (A1 - A2)}{300},$$

300

onde A1 e A2 correspondem à absorvância em 210 e 280 nm, respectivamente (LIN &

DENCE, 1992).

A composição em carboidratos e grupos acetil dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante da determinação de Klason.

Alíquotas dos hidrolisados de Klason foram centrifugadas a 10.000 g, filtradas em filtros depolitetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural), levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidros. Os fatores referentes ao hidroximetilfurfural e furfural, que foram de 0,70 e 0,64, respectivamente, serviram para converter estes compostos em seus respectivos carboidratos de origem (glicose e xilose e arabinose, respectivamente). Os resultados obtidos para anidroglicose (computados glicose, celobiose e hidroximetilfurfural nesta operação), anidroxilose, anidroarabinose (computados 50 % do valor correspondente ao furfural para cada anidroaçúcar) e grupo acetil foram, então, expressos em relação ao peso seco do material original.

4.4.11 Determinação do teor de cinzas do resíduo de nabo forrageiro

Uma amostra de 200 mg de RNF foi acondicionada em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Após, a amostra foi calcinada em mufla a uma temperatura de 575 °C por 2 horas, segundo a norma “TAPPI T211 om-93”. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massas, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

4.4.12 Determinação de extraíveis do resíduo de nabo forrageiro

Uma amostra de 500 mg de RNF foi submetida a um processo de extração em

aparelho Soxhlet, utilizando como solvente etanol a 95 % (v/v), segundo a norma “TAPPI T204 om-88”. Após a extração, o solvente foi removido por roto-evaporação, em evaporador rotativo na temperatura de 50 °C e o resíduo foi seco em balão previamente tarado. Por diferença de massas, pôde-se obter o percentual do extrato em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

4.4.13 Determinação da massa seca do resíduo de nabo forrageiro

Uma amostra de 300 mg de RNF foi colocada em pesa filtro previamente pesado. Esse processo foi realizado em quadruplicata. Este material foi colocado em estufa a 105 °C por 2 horas para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador a vácuo, pesado e o peso seco foi calculado em relação à massa seca do material original.

4.4.14 Determinação de proteínas do resíduo de nabo forrageiro

A concentração de proteínas foi determinada pelo Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos - LAPA, Universidade de Caxias do Sul, segundo a AOAC *Official Method* 2001.11 adaptado.

4.4.15 Dosagem de proteínas nos caldos enzimáticos

Para a determinação das proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976). Foi construída uma curva de calibração, utilizando-se soluções-padrões de albumina bovina (fração V) com concentrações entre 2 e 30 mg/L. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 1 mL da amostra ou de uma diluição apropriada e 500 µL do reagente de Bradford, em triplicata. Depois de transcorridos 10 minutos, o complexo foi quantificado em espectrofotômetro a 595 nm.

4.4.16 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise da variância com o pós-teste de Tukey para um $p < 0,05$, utilizando-se o *software Prism Graph Pad* (GraphPad Software, Inc., USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição quantitativa básica do resíduo de nabo forrageiro

A composição quantitativa básica do RNF foi determinada conforme metodologias descritas no item Materiais e Métodos e está apresentada na Tabela 6. Verifica-se que o RNF contém elevado conteúdo de proteína, além da presença de celulose e hemicelulose em menores quantidades, sugerindo que este resíduo apresenta potencial para compor formulações de meios de cultivo para produção de enzimas, especialmente para produção de enzimas de degradação de parede celular. Também, foi verificada a presença de extraíveis, os quais apresentaram valores de 27,13%. Esta elevada concentração é devida à remoção de proteínas e lipídios ainda presentes na amostra.

Tabela 6. Composição quantitativa média do resíduo de nabo forrageiro (RNF) após a extração de óleo (torta).

Composição quantitativa do RNF	% (m/m) em base seca
Proteínas	42,51
Umidade	8,67
Celulose	13,81
Hemicelulose	15,37
Lignina solúvel	16,36
Lignina insolúvel	9,67
Cinzas	6,17

5.2 Produção de celulasas, β -glicosidases e xilanasas em cultivos em estado sólido

Neste trabalho, resíduos de nabo forrageiro (RNF) após extração do óleo (torta), foram inicialmente utilizados para produção de celulasas em cultivo em estado sólido, tendo como objetivo verificar a possibilidade de substituir o farelo de trigo, total ou parcialmente, como fonte de carbono e de indução de enzimas no meio de CES.

5.2.1 Atividades enzimáticas sobre papel filtro, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases em cultivos em estado sólido

Na Figura 5 A, referente aos dados de endoglicanases, verifica-se um incremento da atividade enzimática com o tempo em todos os cultivos, sendo que no cultivo com farelo de trigo ocorreu a indução mais precoce destas enzimas. Entretanto, atividades de $210,5 \pm 5,8$ UI/g foram alcançadas no meio 0,75 g FT + 0,25 g RNF, após 144 horas, que não diferiram do meio com farelo de trigo e com o meio 0,5 g FT + 0,5 g RNF. As atividades de endoglicanases, para os demais meios, foram menores e apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre si.

Para β -glicosidases (Figura 5 B), a substituição de FT por RNF, total ou parcialmente, parece não afetar a produção desta enzima. A maior atividade ocorreu em 96 horas, com atividades próximas a 22,62 UI/g, não havendo diferença estatística entre os meios com farelo de trigo (1,0 g FT, 0,75 g FT + 0,25 g RNF e 0,25 g FT + 0,75 g RNF), exceto o meio com 0,5 g FT + 0,5 g RNF, cuja atividade foi menor. Já para 120 e 144 horas, todos os meios apresentaram atividades estatisticamente semelhantes, sendo exceção que, em 144 horas, a atividade do meio somente com RNF foi menor.

Os dados de FPA (Figura 5 C), que representam a atividade das celulases como um todo, sugerem a conveniência do uso da mistura 0,75 g FT + 0,25 g RNF, pois em 120 horas apresentou a maior atividade ($21,5 \pm 1,4$ UI/g). Já para 144 horas de cultivo, as atividades enzimáticas dos meios 0,75 g FT + 0,25 g RNF, 1,0 g FT, 0 e 0,5 g FT + 0,5 g RNF foram estatisticamente semelhantes, sendo mais elevadas que em 120 horas. O perfil de FPA para o meio apenas com RNF sugere que este resíduo utilizado isoladamente não é conveniente para a produção de celulases, pois apresentou os menores valores de FPA.

Para a atividade de xilanases (Figura 5 D), a composição 0,75 g FT + 0,25 g RNF em 120 horas não se diferenciou do meio apenas com FT. Entretanto, a maior atividade para xilanases foi obtida no meio contendo somente FT, em 144 horas de cultivo ($1.137,59 \pm 4,76$ UI/g). Observa-se que o FT apresenta menores concentrações de lignina (Tabela 1) em relação ao RNF (Tabela 6), assim como apresenta menor teor de proteínas. Tal como para endoglicanase e FPA, a menor atividade também foi verificada no meio formulado com RNF, provavelmente devido ao teor de óleo ainda presente neste resíduo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

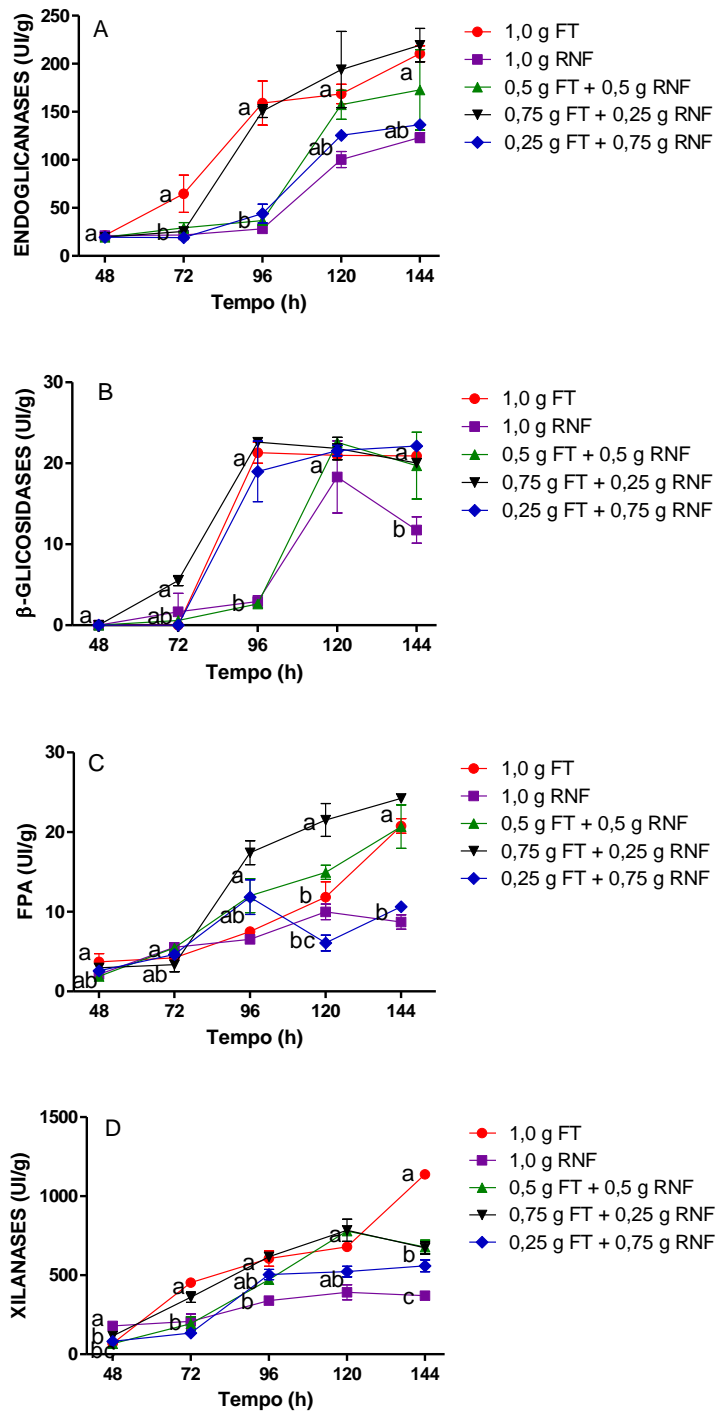


Figura 5. Atividades de endoglicanases (A), β-glicosidases (B), FPA (C) e xilanases (D) em culturas em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. Os tratamentos com as mesmas letras para o mesmo horário não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). FT – farelo de trigo; RNF – resíduo de nabo forrageiro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados permitiram verificar que meios constituídos somente com RNF não apresentaram atividades enzimáticas satisfatórias, com exceção da β -glicosidase. Esse fato pode ser devido à química do substrato, ou seja, à interação dos componentes do RNF, celulose, fontes de proteínas e lipídeos, com a produção das enzimas. Outro fato determinante pode ter sido o grau de empacotamento do meio, tal como sugerem Ang *et al.* (2013), em relação a cultivos em estado sólido.

Os dados de atividade enzimática apresentados são maiores que os apresentados por Deswal *et al.* (2011), com o fungo *Fomitopsis* sp. RCK2010, com a utilização de farelo de trigo, que obtiveram 71,526 UI/g de CMCCase, 3,268 UI/g de FPase e 50,696 UI/g de β -glicosidase. Utilizando farelo de soja, obtiveram 84,127 UI/g de CMCCase, 4,682 UI/g de FPase e 69,083 UI/g de β -glicosidase. Somente os valores de β -glicosidase foram maiores do que os obtidos no presente trabalho.

Para *T. reesei* RUT C30, empregando farelo de trigo, foram obtidos 22,8 U/gds de FPase, 299,55 U/gds de CMCCase e 4,5 U/gds de β -glicosidase (SUKUMARAN *et al.*, 2009). Os valores de endoglicanase foram superiores aos obtidos no presente trabalho, mas o teor de β -glicosidase foi muito inferior.

Na Tabela 7, são apresentados dados de comparação de atividades enzimáticas obtidas neste trabalho com outros dados da literatura, com a utilização de diferentes microrganismos e diferentes meios em CES.

Tabela 7. Atividade enzimáticas para diferentes microrganismos crescidos em substratos diversos, em cultivo em estado sólido.

Microrganismo	Substrato	Atividades enzimáticas (UI/g)				Referência
		FPA	EG	BG	Xilanase	
<i>P. echinulatum</i> S1M29	0,75FT+0,25 RNF	24,22	210,5	22,62	784,73	Neste trabalho
<i>P. echinulatum</i> S1M29	RNF	9,98	123,17	18,31	392,1	Neste trabalho
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana-de-açúcar + FT	32,89	282,36	58,95	10,0	Camassola & Dillon, 2007b
<i>A. niger</i> NS-2	Bagaço de cana-de-açúcar	3,0	5,0	0,03	-	Bansal <i>et al.</i> , 2012
<i>T. asperellum</i> SR1-7	Farelo de trigo	2,2	13,13	9,2	-	Raghuwanshi <i>et al.</i> , 2014
<i>T. reesei</i> + <i>A. niger</i>	Farelo de trigo	22,89	117,71	24,54	2.710,62	Dhillon <i>et al.</i> , 2011
<i>A. niger</i> NRRL 567	Casca de arroz+Bagaço de maçã	113,68	172,3	60,09	-	Dhillon <i>et al.</i> , 2012
<i>A. fumigatus</i> SK1	Tronco de dendezeiro	3,36	54,27	4,51	418,70	Ang <i>et al.</i> , 2013

FPA: atividade sobre papel filtro; EG: endoglicanase; BG: β -glicosidase

Comparando-se a produção enzimática de FPA, endoglicanase e β -glicosidase de *P. echinulatum* S1M29 do meio 0,75 g FT + 0,25 g RNF, verifica-se que os dados do presente trabalho foram apenas inferiores aos dados obtidos para *P. echinulatum* 9A02S1 em Camassola & Dillon (2007b), os quais estão entre os maiores da literatura. A mesma situação pode ser verificada quando são comparadas as produções enzimáticas com *A. niger* NRRL 567 (Dhillon *et al.*, 2012). Entretanto, salienta-se que os valores deste trabalho são superiores às médias dos dados obtidos em CES. Em relação à cultura mista de *T. reesei* e *A. niger* (Dhillon *et al.*, 2011), as concentrações enzimáticas com *P. echinulatum* S1M29 com o meio 0,75 g FT + 0,25 g RNF são relativamente semelhantes.

5.2.2 Determinação da massa micelial em cultivos em estado sólido

Visando, também, avaliar a biomassa nas diferentes condições, são apresentados, na Figura 6, os dados de massa micelial para diferentes meios com o cultivo em estado sólido após 120 horas, utilizando-se o fungo *P. echinulatum* S1M29, sendo esta estimada indiretamente pela análise de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise enzimática da quitina presente na parede celular do fungo.

Observa-se que o cultivo no meio com FT apresentou a maior quantidade de N-acetil-D-glicosamina liberada. Após, o cultivo no meio com 0,75 g FT + 0,25 g RNF apresentou maiores valores de massa micelial. Depois, as concentrações no meio com 0,50 g FT + 0,50 g RNF, seguido dos outros meios com concentrações estatisticamente semelhantes. Nos meios contendo maiores quantidade de RNF ocorreram as menores concentrações de massa micelial. Isso pode indicar uma menor acessibilidade do fungo ao substrato.

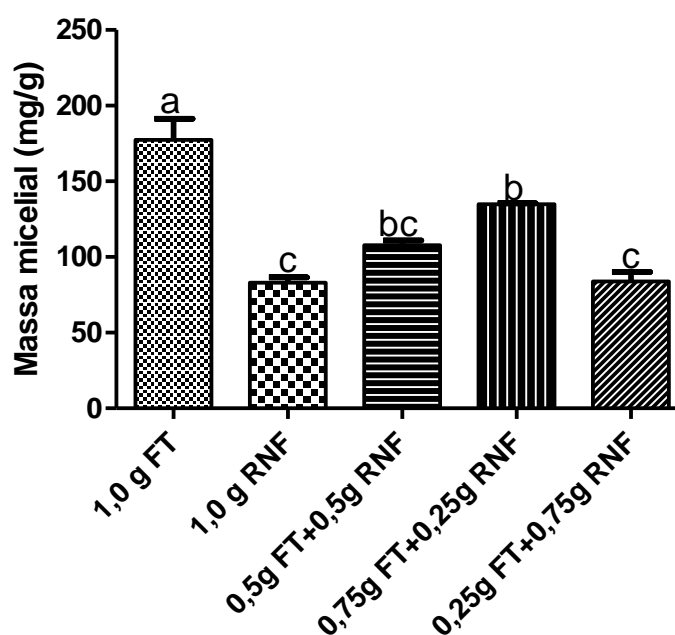


Figura 6. Concentração de massa micelial em 120 horas, em diferentes meios, em cultivos em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. FT – farelo de trigo; RNF – resíduo de nabo forrageiro.

5.2.3 Liberação de açúcares redutores durante o cultivo em cultivos em estado sólido

A celulase produzida durante o cultivo provoca a hidrólise da celulose e, assim, libera açúcares redutores (AR) no meio (YOON *et al.*, 2013). Nos ensaios, a maior liberação de AR (Figura 7) foi observada em 96 horas no cultivo com FT 0,5 g + RNF 0,5 g, valor estatisticamente semelhante ao dosado no meio somente com RNF. Como pode ser verificado, os valores decrescem até o final do experimento para valores próximos a 10 mg/g (144 horas). Observa-se que, a partir de 96 horas, são apresentadas as maiores atividades enzimáticas, contrastando com o decréscimo de AR no meio. Esse fato pode ser devido ao consumo de AR para o crescimento fúngico.

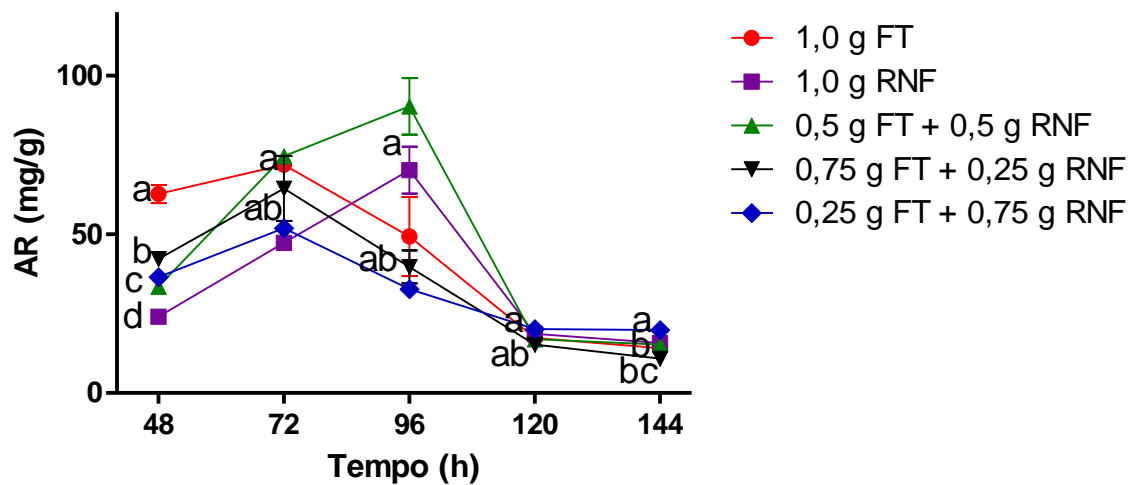


Figura 7. Açúcares redutores liberados de cultivos em estado sólido pelo fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro e farelo de trigo em diferentes proporções. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; RNF – resíduo de nabo forrageiro; AR – açúcares redutores.

5.2.4 Variações de pH durante o cultivo em cultivos em estado sólido

O perfil do pH durante o cultivo foi acompanhado, pois a liberação de ácidos ou mesmo a liberação de amônia, como sugerem Sternberg & Dorval (1979), podem ser indicativos do metabolismo. Como se observa na Figura 8, para os dados de pH sem correção, o valor inicial do meio com RNF ficou em torno de 5,1 e quando o meio utilizado foi o FT, ficou em 5,6. Ocorreu um leve decréscimo do valor do pH nas 96 horas iniciais para quase todos os meios. Neste período, provavelmente houve consumo de nutrientes, acidificando o meio a valores próximos de 4,0. Após 96 horas, quando ocorreu aumento das atividades enzimáticas, o pH subiu para valores entre 6,0 e 7,0.

Sternberg & Dorval (1979), utilizando *Trichoderma reesei*, observaram que o aumento de pH depois que cessou o consumo de NH_4^+ pareceu ser devido à secreção de amônia pelo fungo.

Com o meio somente com FT, após 48 horas de cultivo, ocorreram os menores valores de pH, ao contrário do que foi observado por Camassola & Dillon (2007b).

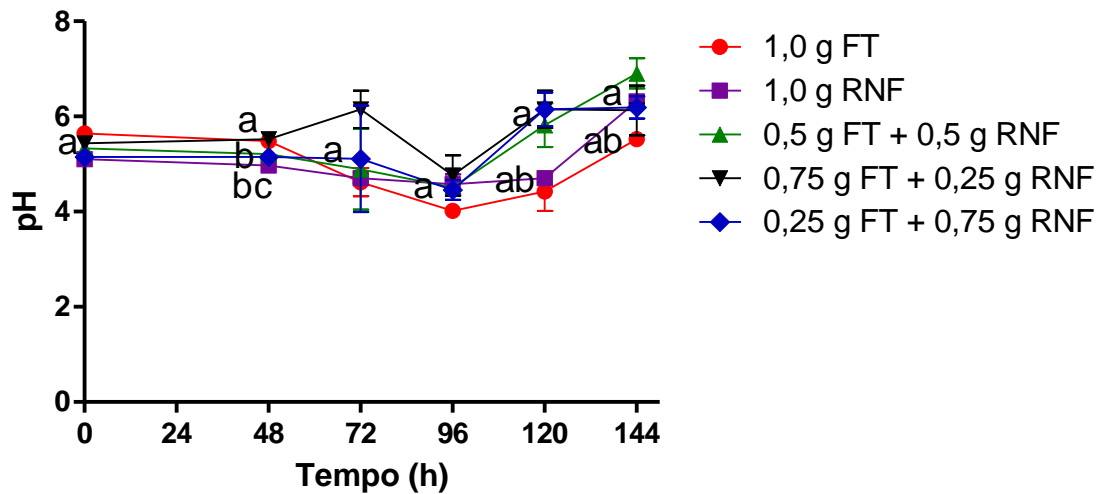


Figura 8. Variação de potencial hidrogeniônico em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos em estado sólido, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29.

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – Celulose.

Como visto nos dados apresentados nas Figuras 6 a 9, quando utilizado como única fonte de carbono, RNF não se constitui como meio para produção de celulases em CES. Entretanto, a associação de 0,75 g FT + 0,25 g RNF resultou nas maiores atividades gerais em comparação com a utilização de FT. Assim, há vantagem no emprego do RNF juntamente com o farelo de trigo como fontes de carbono para a produção de celulases. Possivelmente, pode ter havido maior porosidade do meio na combinação de FT e RNF e o empacotamento diminuído, condição observada quando o meio é apenas constituído de farelo de trigo, tal como sugerem Camassola & Dillon (2007b), quando FT foi associado com bagaço de cana-de-açúcar.

5.3 Produção de celulases, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos

Os resíduos de nabo forrageiro também foram estudados como aditivos na composição de meios para cultivo submerso, visando à produção de enzimas em *P. echinulatum*. O uso de RNF para produção de celulases visou à possibilidade de substituir o farelo de trigo, como fonte de proteínas ou nitrogênio no meio de cultivo, visto que o farelo de trigo já tem uso na alimentação animal.

5.3.1 Atividades enzimáticas sobre papel filtro, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos

Nos dados apresentados na Figura 9 A, verifica-se que, isoladamente, o RNF apresentou as menores atividades de endoglicanases, possivelmente devido ao excesso de proteínas no meio e à menor quantidade da fonte indutora (celulose) em sua composição. A maior atividade enzimática ($9,3 \pm 0,5$ UI/mL) foi observada no meio controle (FT 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g), embora, em 120 h de cultivo, sejam verificadas atividades estatisticamente semelhantes no cultivo (RNF 0,7 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g), onde o farelo de trigo foi substituído por RNF. Quando houve a substituição total dos farelos de trigo e soja por RNF, as atividades foram menores do que o controle, mas não foram diferentes do cultivo (RNF 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g), indicando que a composição desta biomassa suplementada com celulose apresenta limitado potencial para desencadear a produção de endoglicanases.

Para β -glicosidases, observa-se, na Figura 9 B, que o meio constituído apenas de RNF apresentou as menores atividades. Em 96 horas, a maior atividade enzimática ($0,18 \pm 0,03$ UI/mL) ocorreu para o controle (FT 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g). Os maiores valores foram obtidos em 120 horas, entretanto, sem diferença estatística entre os meios (RNF 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g), (RNF 0,7 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g) e (RNF 0,7 g + Cel 1,0 g).

Para FPA (Figura 9 C) verifica-se, também, que o meio constituído apenas de RNF mostrou as menores atividades. No cultivo controle (FT 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g) ocorreram as maiores atividades enzimáticas ($1,2 \pm 0,02$ UI/mL), após 120 horas de cultivo, que foi seguido pelas atividades dos cultivos (RNF 0,7 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g) e (RNF 0,7 g + Cel 1,0 g), as quais não se diferenciaram estatisticamente entre si.

Verificou-se que os cultivos formulados com RNF apresentaram atividades xilanases (Figura 9 D) similares às obtidas nos meios formulados com farelo de trigo, a exemplo do observado para endoglicanases e β -glicosidases. Diferentemente das outras enzimas, a maior atividade foi observada em 96 h de cultivo ($15,7 \pm 0,5$ UI/mL). Novamente, o meio com apenas RNF mostrou a menor atividade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

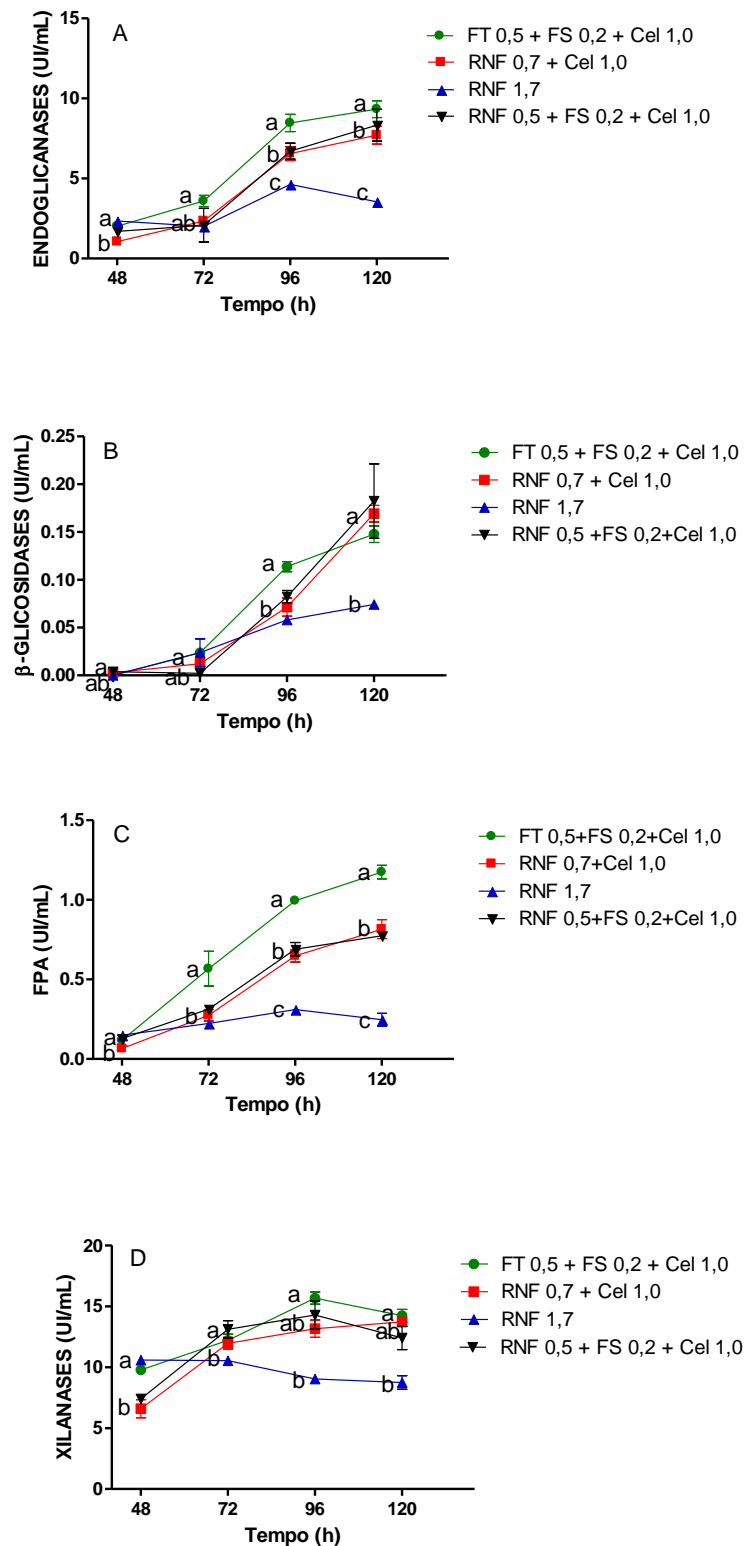


Figura 9. Atividades de endoglicanases (A), β -glicosidases (B), FPA (C) e xilanases (D) em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose.

As menores atividades enzimáticas observadas nos cultivos formulados apenas com RNF podem estar relacionadas a menores concentrações de celulose, cuja composição está em 13,81 % de celulose e de 15,37 % de hemicelulose, associadas à elevada concentração de proteínas e, possivelmente, à presença de óleo.

Camassola & Dillon (2009) utilizaram fungo da podridão branca *Pleurotus sajor-caju* PS 2001 para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, visando o seu emprego na formulação do meio. Após o pré-tratamento, a biomassa foi utilizada na produção de celulasas e xilanases pelo *P. echinulatum* 9AO2S1, mas as atividades enzimáticas obtidas com o bagaço de cana pré-tratado biologicamente (PSCB) foram menores do que as com os controles celulose e bagaço de cana não tratado (SCB). Para o meio suplementado com PSCB, as atividades máximas médias obtidas foram 0,13, 1,0, 0,18, e 0,33 U/mL respectivamente para FPA, endoglicanase, β -glucosidase e xilanase, enquanto para celulose, os valores obtidos foram 0,52, 1,20, 0,20, e 1,46 U/mL e os valores de SCB foram 0,95, 1,60, 0,21 e 1,49.

Os valores de atividades enzimáticas observados no presente trabalho podem ser comparados com dados de outros fungos, que apontam para o posicionamento superior dos valores obtidos para *P. echinulatum*. Marjamaa *et al.* (2013) fizeram comparações de produção enzimática entre *T. reesei* QM6a, *T. reesei* RutC30, *Penicillium pulvillorum* TUB F-2220 e *Penicillium cf. simplicissimum* TUB F-2378. Para atividade de celulase volumétrica (FPU), as culturas das novas linhagens *Penicillium* apresentaram nível semelhante ao *T. reesei* RutC30. Ao contrário, a atividade volumétrica de xilanase nas duas culturas de *Penicillium* foram inferiores à cultura com *Trichoderma*. As máximas atividades relativas foram obtidas a 45 °C e em pH 5. Quando foi utilizada palha de trigo pré-tratada, a atividade FPA foi maior para o RutC30 ($0,94 \pm 0,06$ UI/mL) em seis dias de cultivo. A atividade de xilanase mais elevada foi de $2,69 \pm 0,24$ UI/mL, em seis dias de cultivo para o QM6a. Para β -glicosidase, o F-2220 apresentou atividade de $1,34 \pm 0,05$ UI/mL em seis dias de cultivo. Para a atividade de endoglicanase, o maior valor foi $6,44 \pm 0,59$ UI/mL em seis dias de cultivo com o RutC30.

Apenas máximas atividades de FPA (0,59 UI/mL), endoglicanase (0,33 UI/mL), exoglicanase (24 UI/mL) e β -glicosidase (4,34 UI/mL), foram observadas em seis dias de cultivo com *A. sydowii* (MATKAR *et al.*, 2013), salientando-se que o gênero *Aspergillus* é um produtor de β -glicosidase.

Cinco diferentes substratos foram estudados por Goldbeck *et al.* (2013) na produção de enzimas celulolíticas por *Acremonium strictum*: bagaço de cana sem pré-tratamento, bagaço submetido a pré-tratamentos leve, médio e forte e celulose comercial Avicel® como

comparativo. Foi observado que a maior atividade CMCase (endoglicanase) foi de 139,42 UI/L (1,39 U/mL) em 240 horas de cultivo com bagaço com pré-tratamento leve. Para o mesmo substrato, a máxima atividade FPA foi de 10,82 UI/L (1,08 U/mL) em 192 horas de cultivo e de 3,48 UI/L para β -glicosidade em 240 horas de cultivo.

Os valores de atividade enzimática também foram semelhantes aos dados apresentados por Reis *et al.* (2014), que em cultivos em frascos sob agitação com o fungo *P. echinulatum* S1M29, obtiveram atividade para FPA de aproximadamente 0,9 UI/mL após 120 h de cultivo, em pH inicial de 6,5 e 7,0. Para atividade de endoglicanase, o valor obtido após 96 horas de cultivo foi de 8,2 UI/mL para um pH entre 6,0 e 7,0. A atividade máxima de xilanase obtida com pH inicial de 7,0 foi de 18,5 UI/mL, após 120 horas de cultivo. Em termos de β -glicosidase, a maior atividade (aproximadamente 0,38 UI/mL) foi obtida em pH 4,0 no mesmo período de tempo.

Fazer comparações de atividade enzimática em processos fermentativos é uma tarefa árdua, pois são vários métodos, condições, substratos, diferentes microrganismos empregados, entre outros fatores. Os números mostram diferenças que podem ser apenas mencionadas. Na Tabela 8, verifica-se que, em cultura submersa, os dados de atividades de endoglicanase deste trabalho são mais elevados do que as produzidas por *Trichoderma citrinoviride*, mas inferiores às produzidas pelos outros microrganismos. Os valores de FPA estão mais elevados do que os de *P. janthinellum*, *T. harzianum* e *T. citrinoviride*, mas abaixo dos demais. Para atividades de β -glicosidases, valores semelhantes ou inferiores foram obtidos nos meios formulados com RNF. As atividades de xilanase foram inferiores às produzidas por *T. harzianum*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8. Atividades enzimáticas para diferentes microrganismos crescidos em substratos diversos, crescidos em cultivo submersos.

Microrganismo	Substrato	Atividades enzimáticas (UI/mL)				Referência
		FPA	Endoglicanase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>P. echinulatum</i>	Celulose e RNF	0,84	7,70	0,17	13,43	Neste trabalho
<i>P. echinulatum</i>	RNF	0,31	4,51	0,075	10,31	Neste trabalho
<i>P. echinulatum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,95	1,55	0,22	1,50	Camassola & Dillon, 2009
<i>Neurospora crassa</i>	Palha de trigo	1,33	19,7	0,58	-	Romero <i>et al.</i> , 1999
<i>P. janthinellum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,55	21,5	2,3	-	Adsul <i>et al.</i> , 2004
<i>T. reesei</i> RUTC30	Papelão ondulado	2,27	-	-	-	Szijarto <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma viride</i>	Bagaço de cana	0,88	33,8	0,33	-	Adsul <i>et al.</i> , 2004
<i>T. citrinoviride</i>	-	0,63	3,12	8,22	-	Mahesh <i>et al.</i> , 2009
<i>T. harzianum</i>	Bagaço pré-tratado a vapor	0,78	-	9,18	36,96	Delabona <i>et al.</i> , 2012

5.3.2 Determinação da massa micelial em cultivos submersos e concentração de açúcares redutores

O desenvolvimento da massa fúngica e a liberação de açúcares redutores são parâmetros que devem ser utilizados para análise em conjunto com as atividades enzimáticas, pois maiores atividades enzimáticas podem ser consequência da quantidade de massa fúngica ou do aumento da capacidade de secreção. A liberação de açúcares redutores no meio pode sugerir a produção de enzimas hidrolíticas e sua atuação e o aproveitamento destes pela massa fúngica.

Na Figura 10, são apresentados os dados de concentração de massa micelial para os diferentes meios em cultivo submerso utilizando-se o fungo *P. echinulatum* S1M29. Observa-se que o maior crescimento do microrganismo aconteceu no intervalo entre 48 e 72 horas de cultivo, sendo que, entre os cultivos, o maior crescimento ocorreu no meio com RNF 0,7 g + Cel 1,0 g. De 72 a 96 horas, verifica-se diminuição da massa fúngica e de 96 horas até 120 horas não houve alteração da massa fúngica.

Pela análise da massa fúngica em conjunto com a atividade enzimática, verifica-se que em 96 horas ocorreu a maior atividade de β -glicosidase e em 120 horas as maiores atividades de FPA, endoglicanase e xilanase. Nota-se, assim, que não há correspondência entre o crescimento do fungo e a produção enzimática para essas condições. A menor concentração

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

de massa micelial foi verificada com a utilização apenas de RNF. Entretanto, quando RNF foi associado à celulose no cultivo (RNF 0,7 g + Cel 1,0 g), parece existir uma interação positiva para o crescimento fúngico.

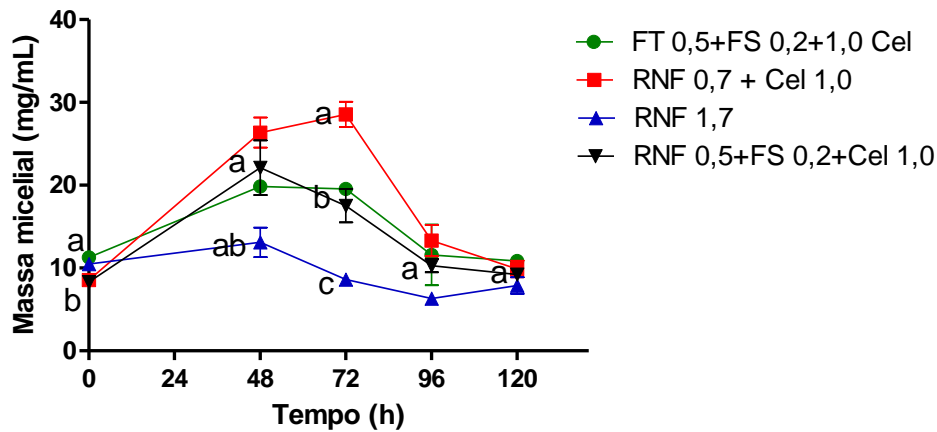


Figura 10. Concentração de massa micelial em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. FT – Farelo de trigo; FS – Farelo de soja; RNF – Resíduo de nabo forrageiro; Cel – Celulose.

Observa-se, na Figura 11, que de 48 para 72 horas ocorreu redução dos açúcares redutores em todos os cultivos, indicando o consumo destes pelo microrganismo.

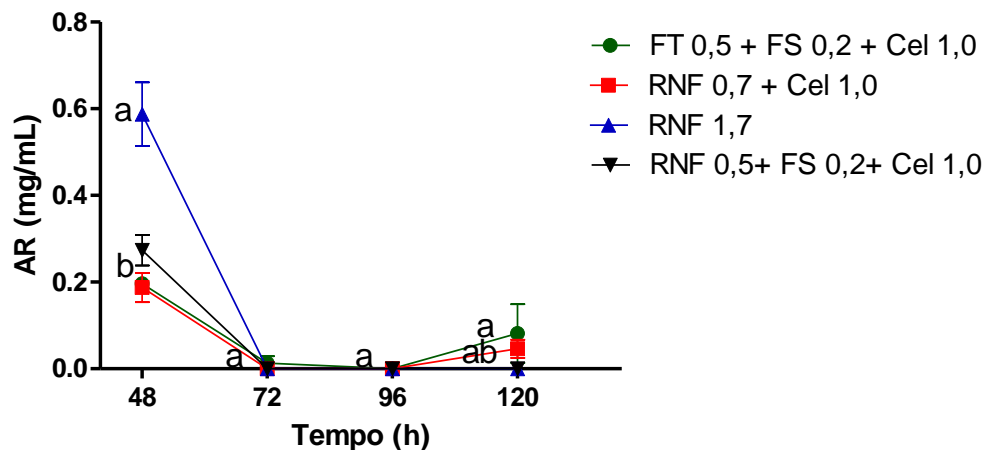


Figura 11. Concentração de açúcares redutores em cultivos submersos empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, em diferentes tempos. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose.

5.3.3 Variações de pH durante os cultivos submersos

Na Figura 12, observa-se que, durante o experimento, o pH apresentou uma queda nas primeiras 48 horas, sendo provavelmente este o período de crescimento do fungo, quando há consumo de nutrientes, acidificando o meio a valores em torno de 4,0. No restante do tempo de cultivo, houve elevação do pH para valores finais entre 6 e 7. Todos os meios apresentaram comportamento semelhante de variação de pH, sendo o meio somente com RNF o que apresentou valores mais elevados. A queda do pH durante o cultivo, segundo Sternberg & Dorval (1976) para *T. reesei*, pode ter sido consequência da entrada de amônia na célula a partir de amônio com o H^+ que permaneceria no exterior do fungo e a fase de alcalinização seria decorrente da liberação de amônia pelas células.

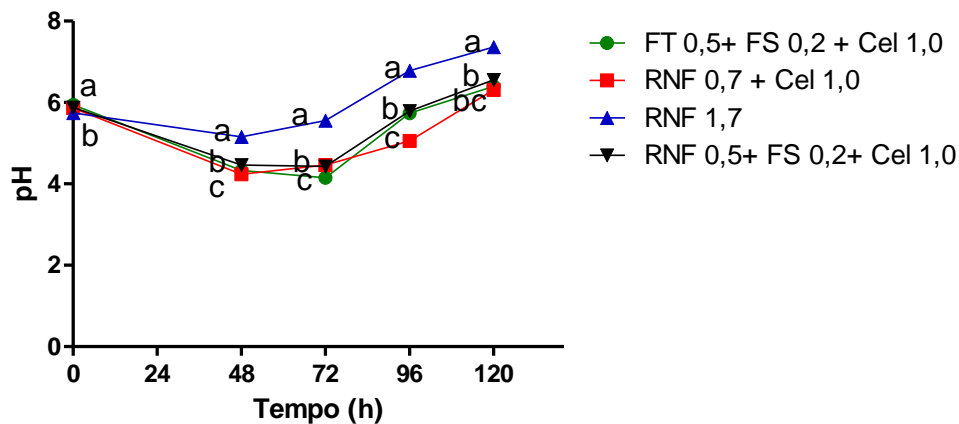


Figura 12. Variação de pH em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose.

Entretanto, como observado por Camassola & Dillon (2009), mesmo com crescimento fúngico, não houve diminuição nos valores de pH em cultivos com bagaço de cana pré-tratado biologicamente e bagaço sem tratamento, sendo que o pH se manteve em torno de 6,5. O cultivo com celulose apresentou uma queda no pH no terceiro dia para valores próximos de 4,0, aumentando nos dias seguintes, mas ficando abaixo de 6,0 até o sexto dia.

Em cultivos com *T. reesei* RutC30, *P. pulvillorum* F-2220 e *P. cf simplicissimum* F-2378, com pH inicial um pouco acima de 5,5, as linhagens *Penicillium* apresentaram comportamento semelhante entre si com queda após um dia de cultivo e elevação posterior depois de três dias, até pH em torno de 5,5. Diferentemente, a linhagem *Trichoderma* apresentou queda no pH, ficando o mesmo um pouco acima de 4,5 ao final do experimento (MARJAMAA *et al.*, 2013).

Como observado no estudo de cultivo submerso, o meio de cultivo formulado com (0,7 g RNF + 1,0 g Cel) apresentou atividades com valores próximos aos do meio controle (FT 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g) para endoglicanase, β -glicosidase e xilanase. Somente para FPA apresentou valores menores em relação ao meio controle. Estes dados permitem sugerir que RNF pode ser empregado na formulação de meios para a produção de celulasas e xilanases.

5.4 Produção de celulasas, β -glicosidases e xilanases em cultivos submersos contendo resíduos de nabo forrageiro, com e sem acréscimo de sacarose

Em Dillon *et al.* (2011), verifica-se que a adição de sacarose (0,5 e 1% - m/v) à celulose aumenta a atividade de celulasas no cultivo, sendo, portanto, importante analisar o emprego de sacarose também nos estudos com RNF.

Nas Figuras 13, 14, 15 e 16 são apresentados dados de atividades de endoglicanase, β -glicosidase, FPA e xilanase, respectivamente, obtidos em cultivo submerso realizados com e sem adição de sacarose (0,5 % - m/v).

Na Figura 13, observa-se que, nos cultivos onde a sacarose não foi empregada (Figura 13 B) como visto anteriormente, a maior atividade de endoglicanase (9,3 UI/mL) ocorreu em 120 horas no meio controle (FT 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g). Atividades enzimáticas menores, mas estatisticamente semelhantes, ocorreram nos meios RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0 e no RNF 0,7 + Cel 1,0. Como esperado, no cultivo com adição de sacarose ((Figura 13 A)), a maior atividade (9,9 UI/mL) foi atingida no meio FT 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0 em 120 horas. Para o meio com RNF 0,7 + Cel 1,0, houve uma queda acentuada na atividade enzimática, comparando-se ao meio somente com RNF, sendo provável uma inibição por açúcares. Verificou-se que, pelo menos para a produção de endoglicanases com RNF, não é interessante a adição de sacarose ao meio.

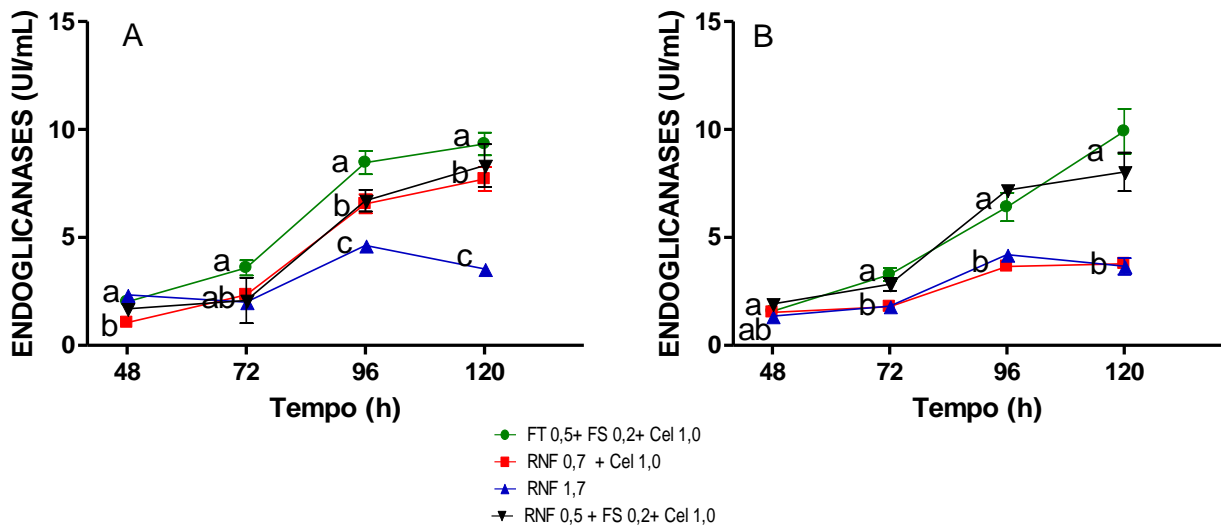


Figura 13. Atividades de endoglucanases sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose

Na Figura 14, observa-se que, nos cultivos sem sacarose (Figura 14 B), não ocorreram diferenças estatísticas para atividade de β -glicosidase em 120 horas entre os meios RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0, RNF 0,7 + Cel 1,0 e o controle FT 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0. Nos cultivos com sacarose, os valores foram mais elevados do que nos cultivos sem sacarose, tal como observado anteriormente por Dillon *et al.* (2011), mas não houve diferença nas maiores atividades entre os meios, com exceção do meio RNF 0,7 + Cel 1,0, cuja atividade foi inferior.

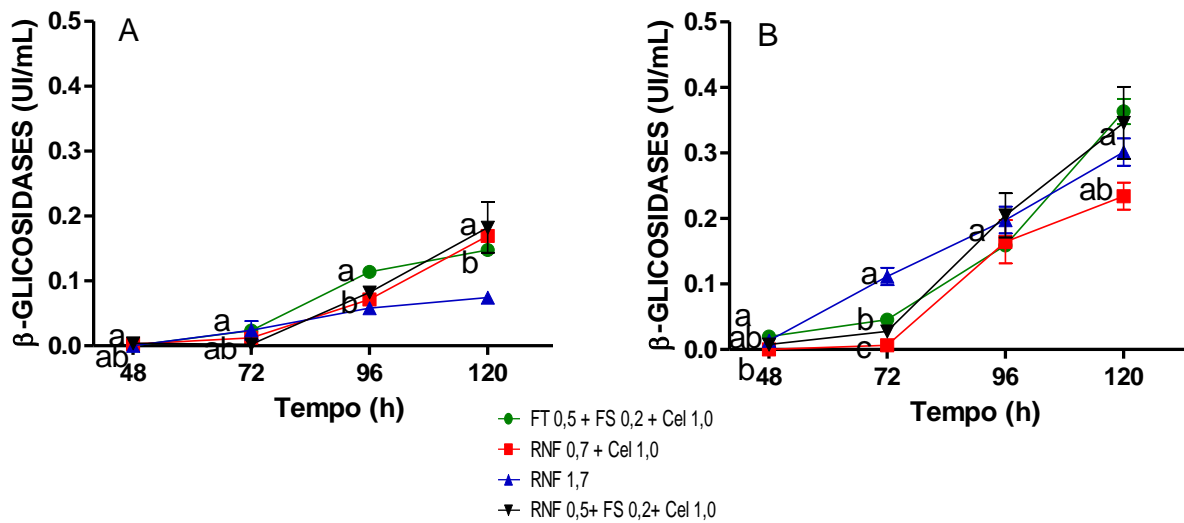


Figura 14. Atividades de β -glicosidases sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose

Na Figura 15, dados de FPA, verifica-se que nos cultivos sem sacarose (Figura 15 B), a maior média para atividade enzimática (em torno de 1,17 UI/mL) ocorreu em 120 horas com o meio controle (FT 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0). Menores e estatisticamente semelhantes foram os valores de FPA para os meios RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0 e com RNF 0,7 + Cel 1,0 (em torno de 0,8 UI/mL). O meio somente com RNF apresentou valores mais baixos. Nos cultivos com sacarose, a FPA do meio com RNF 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g não diferiu do controle (em torno de 1,0 UI/mL), entretanto com valores aparentemente inferiores aos verificados nos cultivos sem sacarose. Para o meio com RNF 0,7 + Cel 1,0, de maneira semelhante ao ocorrido com a endoglicanase, a FPA reduziu acentuadamente, comparando-se ao meio somente com RNF.

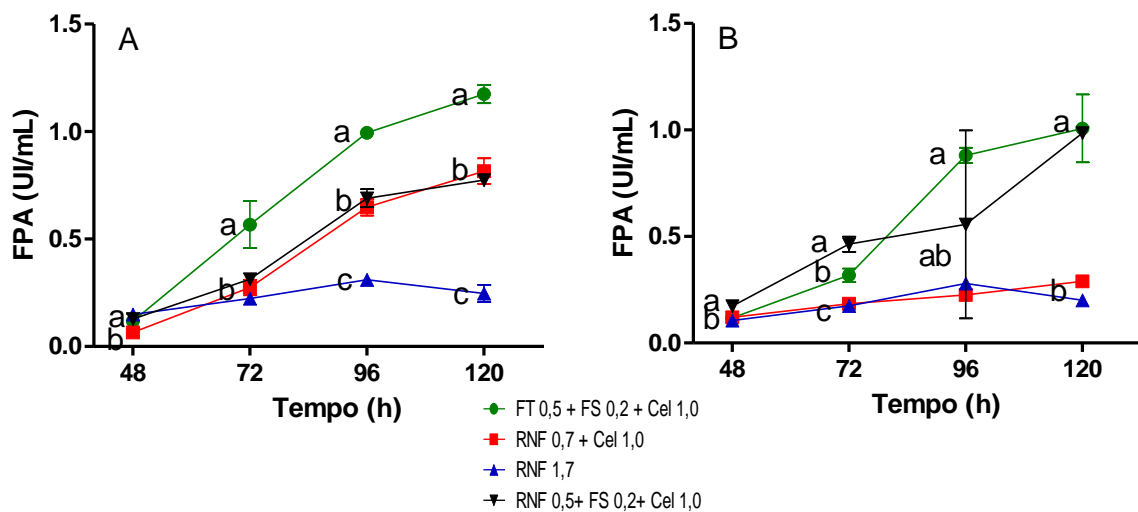


Figura 15. Atividades FPA sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose

Os dados de xilanase (Figura 16) evidenciam que, nos cultivos sem sacarose (Figura 16 B), a maior atividade de xilanase (em torno de 15,6 UI/mL) ocorreu em 96 horas no meio controle (FT 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0). Na sequência, observam-se os valores enzimáticos dos meios com RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0 e RNF 0,7 + Cel 1,0, que apresentaram atividades similares. Como em todos os outros cultivos, o meio com RNF foi o que apresentou atividades inferiores. No gráfico dos cultivos com sacarose (Figura 16 A), o meio RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0 foi o que apresentou a maior atividade de xilanase (17,0 UI/mL) em 120 horas de cultivo. O meio controle, assim como o meio com RNF 0,7 + Cel 1,0, apresentou queda nas atividades de xilanase em relação ao cultivo sem sacarose. Não se encontrou uma explicação para o fato de que o meio com RNF 0,7 + Cel 1,0 apresentou valores ainda menores do que o meio somente com RNF.

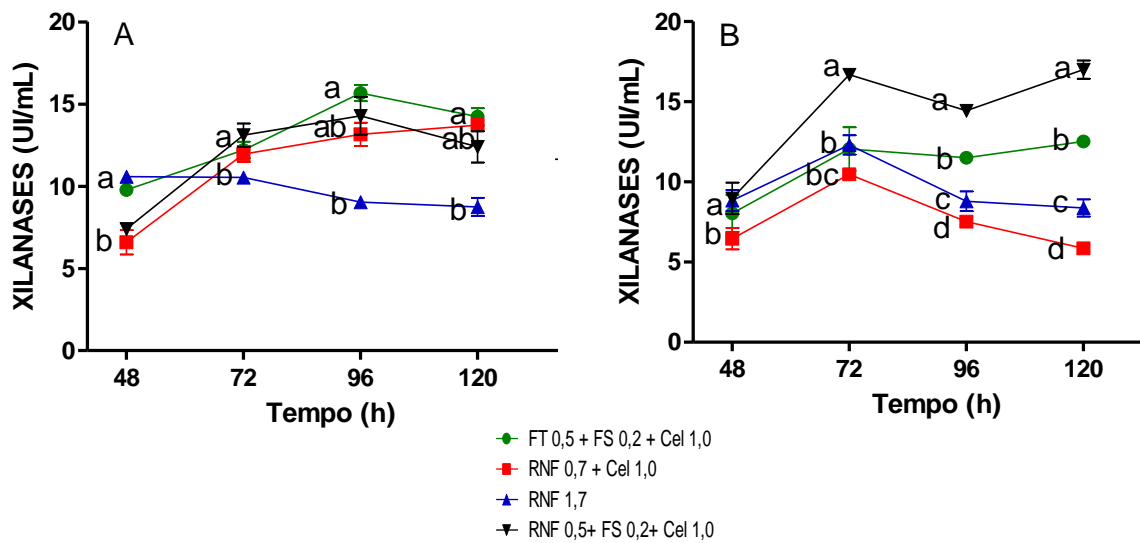


Figura 16. Atividades de xilanas sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose, em frascos mantidos sob agitação recíproca em cultivos submersos empregando o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose

Na Figura 17, são apresentados os gráficos da concentração de massa micelial, sem (Figura 17 A) e com (Figura 17 B) o uso de sacarose, durante o cultivo submerso com o fungo *P. echinulatum* S1M29.

Pode-se notar que, no cultivo com sacarose (Figura 17 B), ocorre uma diminuição nas concentrações de massa micelial no meio com RNF 0,7 + Cel 1,0. Por outro lado, ocorre um aumento na concentração de massa micelial para o meio com RNF 0,5 + FS 0,2 + Cel 1,0.

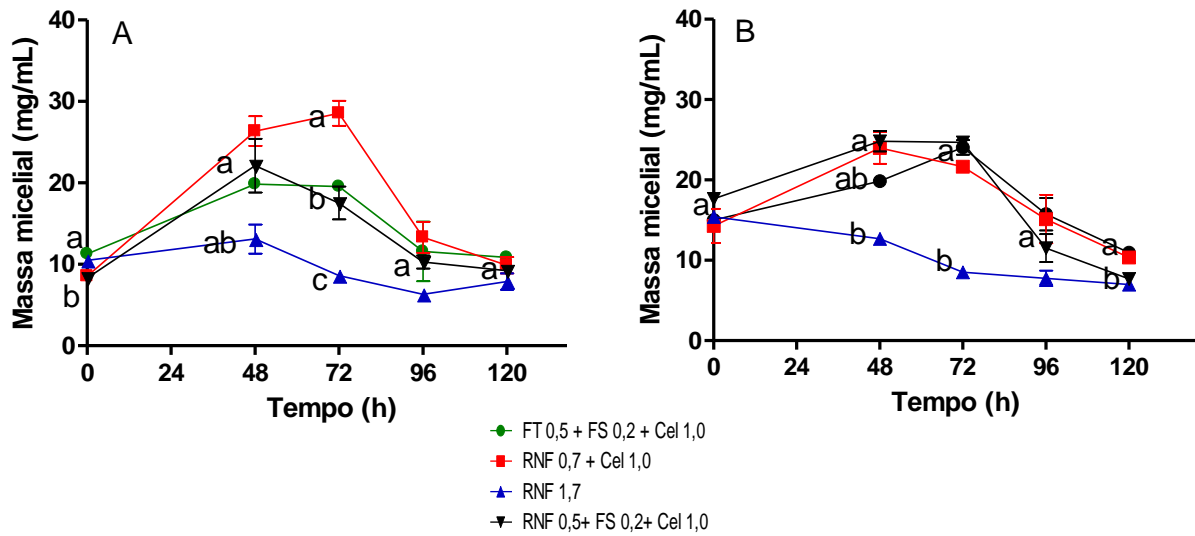


Figura 17. Concentração de massa micelial em diferentes tempos, em diferentes meios, em cultivos submersos, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose.

FT – Farelo de trigo; FS – Farelo de soja; RNF – Resíduo de nabo forrageiro; Cel – Celulose.

Comparando-se o comportamento da concentração de açúcares redutores durante os cultivos na Figura 18, observa-se que com a adição de sacarose (Figura 18 B), a concentração de AR do meio somente com RNF diminuiu. No meio controle, houve aumento das concentrações de AR liberados em relação ao cultivo sem sacarose (Figura 18 A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

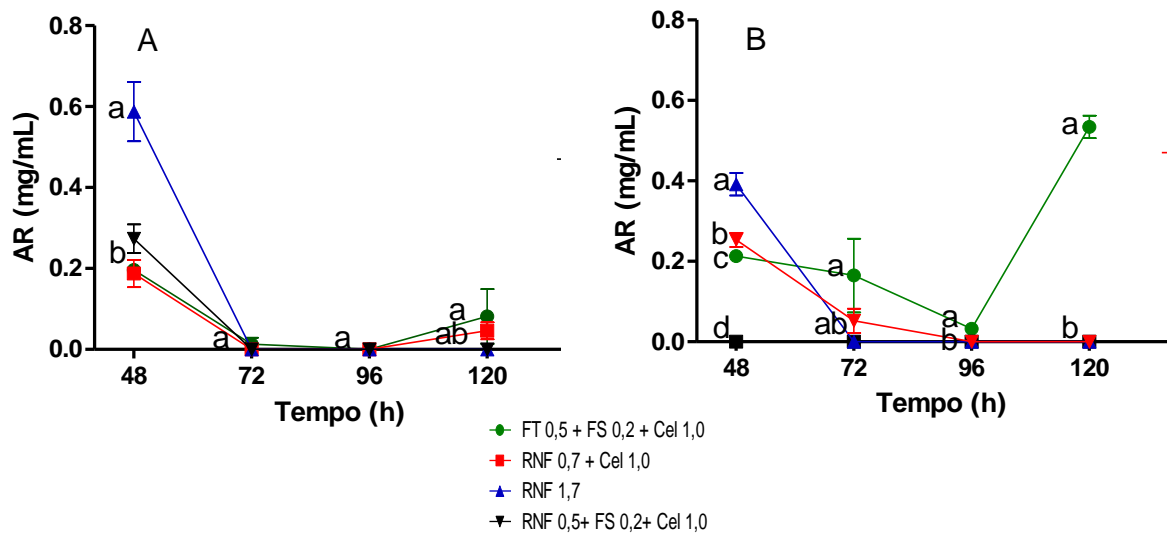


Figura 18. Concentração de açúcares redutores em cultivos submersos empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, sem adição (A) e com adição (B) de 0,5% (m/v) de sacarose. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FT – Farelo de trigo; FS – Farelo de soja; RNF – Resíduo de nabo forrageiro; Cel – Celulose

Observa-se, na Figura 19 B, que, com adição da sacarose, ocorrem variações no comportamento do pH durante o cultivo. A queda do pH foi mais acentuada nas primeiras 48 horas de cultivo e o valor do pH caiu abaixo de 4,0. Ao final do cultivo, o pH ficou em 7,3 para o meio somente com RNF, valor semelhante ao observado no meio sem sacarose.

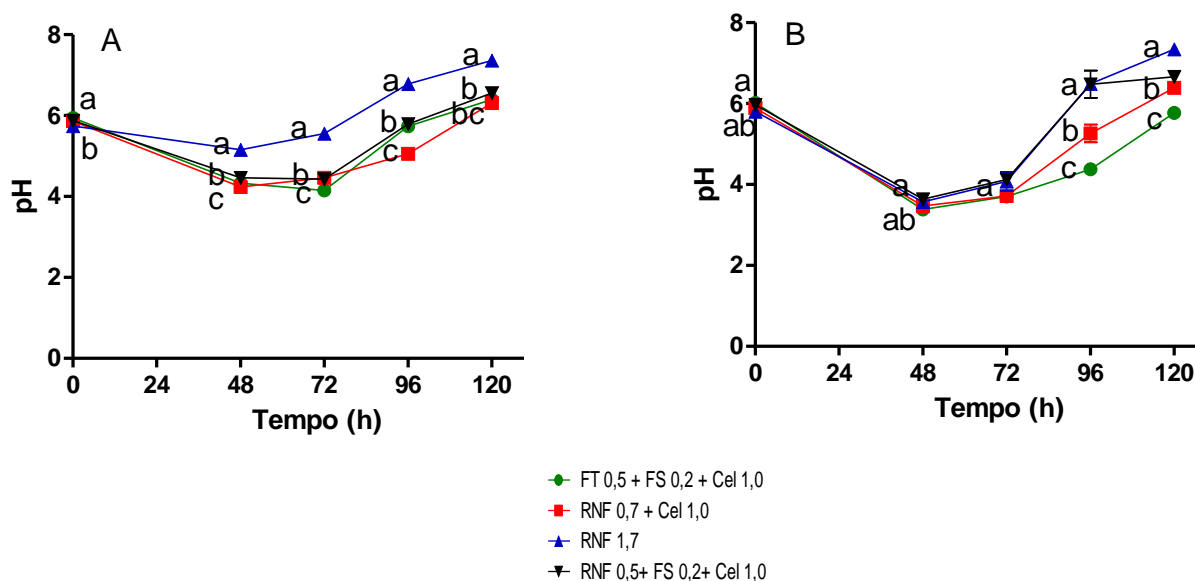


Figura 19. Variação de pH em cultivos submersos empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* SIM29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, sem adição (A) e com adição de 0,5 % (m/v) de sacarose (B). As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo tempo não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). FT – Farelo de trigo; FS – Farelo de soja; RNF – Resíduo de nabo forrageiro; Cel – Celulose

Observa-se, na Figura 19, que em 72 horas ocorre elevação do pH, sendo que no mesmo tempo ocorre decréscimo da concentração da massa miscelial conforme observado na Figura 17.

Uma vez que a intenção é utilizar o RNF como fonte de carbono e nitrogênio nos cultivos e, com o uso de sacarose, a partir da análise dos gráficos de cultivo submerso com e sem adição de sacarose, ocorrem diminuições nas atividades de endoglicanase, β -glicosidase, FPA e xilanase em meios formulados com esse substrato, pode-se verificar que a adição desse açúcar não é interessante tecnológica e economicamente.

O consumo de sacarose, que foi adicionada ao cultivo submerso, pode ser observado na Figura 20.

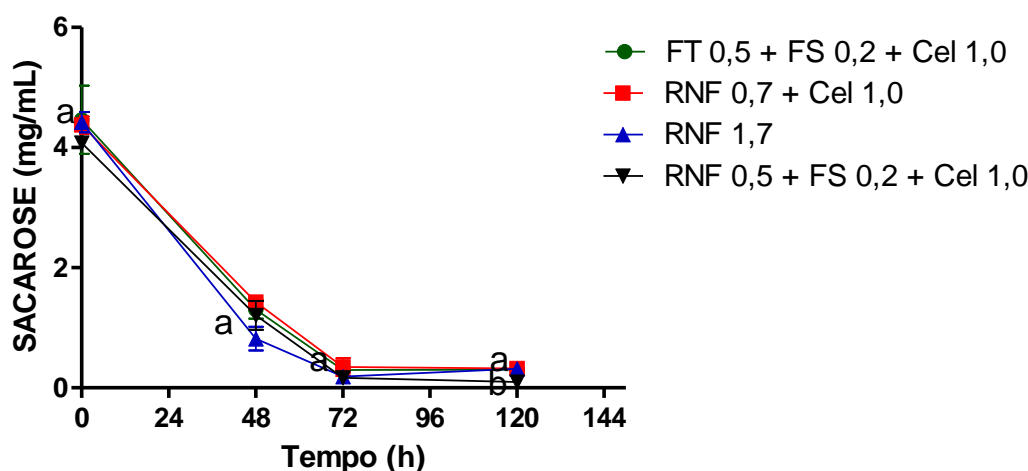


Figura 20. Consumo de sacarose em cultivos submersos com adição de 0,5 % (m/v) de sacarose empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, em diferentes meios de cultivo, utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja; RNF – resíduo de nabo forrageiro; Cel – celulose;

Após 48 horas, ocorreu uma queda brusca na concentração de sacarose na solução, sugerindo que a mesma foi consumida durante o crescimento do fungo, fato que pode ser observado na Figura 10, onde a maior concentração de massa micelial é apresentada no período entre 48 e 72 horas. Neste período ocorreu o consumo praticamente total da sacarose.

5.5 Hidrólise enzimática

Além da determinação das atividades enzimáticas apresentadas nos itens anteriores, considerou-se relevante verificar a *performance* dos caldos enzimáticos obtidos na hidrólise de diferentes substratos celulósicos. Para tanto, estudou-se os substratos celulose, Avicel[®], bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, capim elefante e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor.

Na sequência, são apresentados resultados referentes às hidrólises realizadas com os caldos (ou extratos) enzimáticos produzidos com o RNF como substrato em cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES), utilizando-se uma solução enzimática (enzima padrão - EP) produzida no Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, também proveniente de cultivos com *P. echinulatum*.

5.5.1 Produção das enzimas para a hidrólise

A partir da Figura 5, observou-se que o meio com 0,5 g FT + 0,5 g RNF apresentou FPA estatisticamente igual ao meio controle em 144 horas de cultivo em estado sólido. Também, houve incremento da atividade de endoglicanase. Assim, visando utilizar maiores quantidades de RNF do que de farelo de trigo para a produção de enzimas, optou-se pela utilização do meio formulado com 0,5 g FT + 0,5 g RNF para a produção do caldo enzimático em cultivo em estado sólido.

Na Figura 9, observa-se que com o meio RNF 0,7 g + Cel 1,0 g foram obtidas atividades de FPA próximas ao do meio controle em 120 horas de cultivo para o cultivo submerso. As atividades de β -glicosidase e de xilanase foram estatisticamente semelhantes ao meio controle. Como o interesse era a utilização de maiores quantidades do RNF, esse foi o meio escolhido para a produção do caldo enzimático em CS.

As atividades enzimáticas de FPA, xilanase, β -glicosidase e endoglicanase foram determinadas nos caldos enzimáticos de produção das enzimas. As atividades das enzimas para o CS foram: 42,81 UI/mL de endoglicanase, 21,7 UI/mL de β -glicosidase e de 478,9 UI/mL de xilanase. Para o CES as atividades foram: 567,7 UI/mL de endoglicanase, 11,82 UI/mL de β -glicosidase e de 517,54 UI/mL de xilanase. As atividades para a EP foram: 24,91 UI/mL de endoglicanase, 10,55 UI/mL de β -glicosidase e de 49,76 UI/mL de xilanase. A Figura 21 apresenta, de forma comparativa, as atividades dos caldos enzimáticos produzidos em diferentes formas de cultivo. O caldo enzimático do CES apresenta atividades de endoglicanase mais elevadas em relação aos outros caldos. Também, nota-se que o teor de xilanase é maior para esse caldo. O caldo EP apresentou as menores atividades enzimáticas.

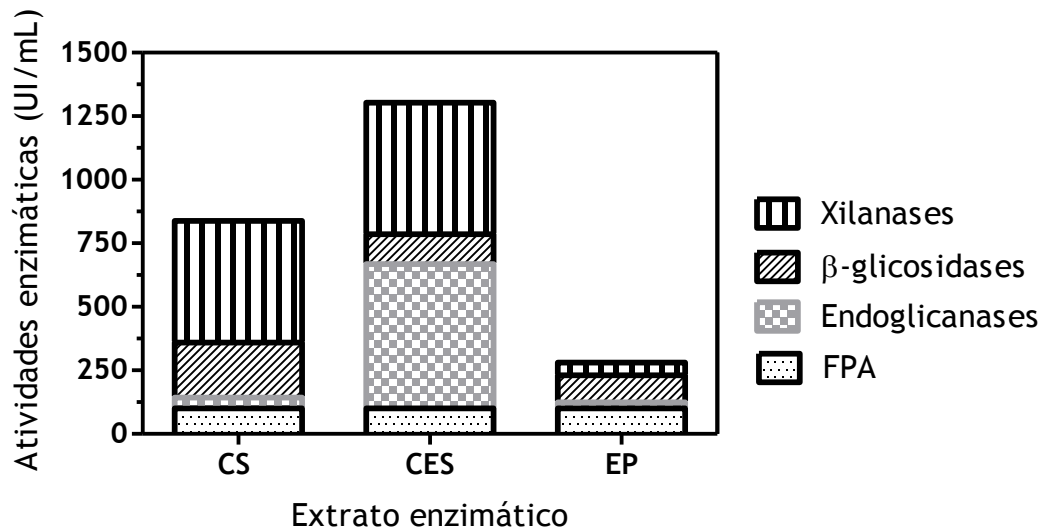


Figura 21. Representação das atividades enzimáticas médias determinadas nos volumes de caldos enzimáticos utilizados durante a hidrólise. Utilizou-se como padrão o volume de enzima contendo 10 FPA/g de substrato. As atividades de FPA e β-glicosidade estão representadas dez vezes maiores que as utilizadas durante as hidrólises enzimáticas para possibilitar a sua visualização. CS – cultivo submerso; CES – cultivo em estado sólido; EP – enzima padrão.

Na Figura 22, são apresentados dados de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos utilizados na hidrólise dos substratos. Observa-se, no complexo EP, maior concentração de proteínas totais. A maior concentração de proteínas totais nesse caldo pode ser devido à maior concentração de enzimas acessórias, como as monoxigenases, que apresentam um importante papel na hidrólise.

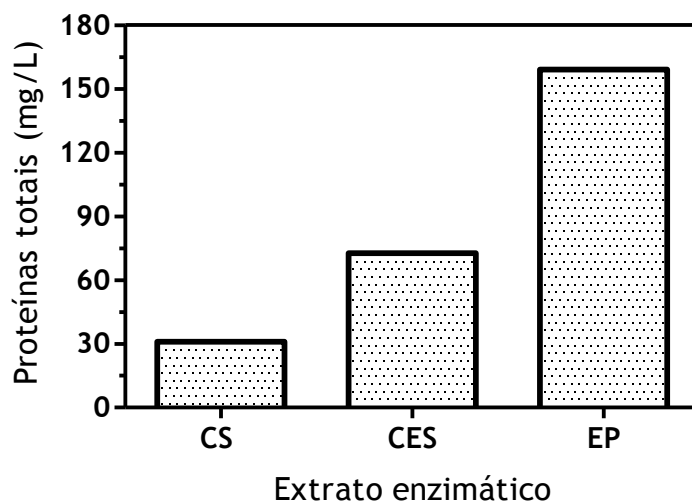


Figura 22. Teor médio de proteínas totais determinadas nos volumes de caldos enzimáticos utilizados durante a hidrólise enzimática.

CS – cultivo submerso; CES – cultivo em estado sólido; EP – enzima padrão

5.5.2 Hidrólise com caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum*

Foram utilizadas 10,0 UI de FPA/g de substrato de enzima produzida em CES (50 % RNF + 50 % FT), em CS (41,18 % RNF + 58,82 % Cel) e de EP (enzima padrão do Laboratório de Enzimas e Biomassa da UCS produzida em CES com 50 % bagaço de cana-de-açúcar + 50 % de farelo de trigo).

Os dados de hidrólise da celulose, apresentados na Figura 23 A, permitem verificar que, após 24 horas, a maior concentração de AR foi liberada pelo complexo enzimático EP ($890,04 \pm 26,45$ mg de AR/g de substrato). Entretanto, a maior liberação de AR ($997,45 \pm 0,26$ mg de AR/g de substrato) foi observada com o uso do complexo enzimático CS após 48 horas de hidrólise. Depois de 48 horas, houve uma queda na concentração de AR liberados pelo complexo do CS e do CES, sendo que para a EP houve um leve aumento. As menores concentrações de AR foram liberadas com o caldo do CES.

Para a celulose, o caldo enzimático de CES apresentou a menor eficiência na liberação de AR em relação aos outros complexos enzimáticos. Esse fato talvez esteja relacionado com a composição das endoglicanases e exoglucanases, que possivelmente foram induzidas diferentemente, quando da produção dos complexos enzimáticos CS, CES e EP. A celobiohidrolase, sendo o principal componente do sistema de celulases, pode hidrolisar a celulose altamente cristalina (SÁNCHEZ, 2009). Possivelmente, o caldo do CES apresentou menores teores dessa enzima. Provavelmente, os caldos de CS e EP tenham apresentado maiores concentrações dessa enzima, pois foi maior a eficiência na hidrólise de Avicel[®], substrato com maior cristalinidade da celulose. Também, esses caldos podem ter apresentado maior concentração de monoxigenases, aumentando, assim, a eficiência das celulases.

O declínio na hidrólise pode ser devido à resistência apresentada pelo substrato (NARRA *et al.*, 2012). Também, esse declínio pode ter ocorrido devido à inibição causada pelos produtos da hidrólise, como glicose e celobiose. Podem ter ocorrido impedimentos estéricos na superfície da celulose, o que pode ter diminuído a eficiência da hidrólise.

Na Figura 23 B, que corresponde à hidrólise de Avicel[®], que se trata de uma fonte pura de celulose microcristalina, as curvas de liberação de AR são semelhantes às da Figura 23 A. Observa-se que, em 48 horas, ocorreu a maior liberação de AR (em torno de 858 mg de AR/g de substrato) com o uso do caldo enzimático do CS. O caldo do CES apresentou as menores concentrações de AR. Após 48 horas, observa-se queda nos teores para o CES e para o CS, havendo um leve aumento para a EP.

Alternativamente ao verificado nas Figuras 23 A e B, quando o substrato utilizado para a hidrólise foi o bagaço de cana-de-açúcar, as enzimas produzidas pelo CES apresentam a maior liberação de AR (Figura 23 C). A maior concentração observada foi em 48 horas ($758,66 \pm 20,64$ mg de AR/g de substrato). Após, houve queda na liberação de açúcares. O caldo enzimático da EP apresentou as menores liberações de AR durante o ensaio.

A atividade superior de xilanases, no complexo enzimático de CES, pode explicar a maior eficiência. Entretanto, a presença de *swolleninas* também pode ter contribuído para os maiores rendimentos da hidrólise enzimática, como sugerem Maeda *et al.* (2011). Também, a maior proporção de endoglicanases no caldo do CES pode ter sido fator da maior eficiência na hidrólise desse substrato.

Na Figura 23 D, são apresentadas as concentrações de AR liberadas durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A maior concentração de AR (~ 790,33 mg de AR/g de substrato) foi liberada, também, com o uso do complexo CES, que foi máxima após 24 horas de hidrólise. Os caldos de CS e de EP apresentaram comportamento semelhante entre si e apresentaram uma maior liberação de AR para o bagaço pré-tratado do que para o bagaço sem tratamento.

Para os dados de hidrólise de capim elefante (Figura 23 E), a maior liberação de AR (~ 656 mg de AR/g de substrato) ocorreu após 24 horas com o complexo CES. Para o CS e EP, a liberação de AR foi semelhante, mas em concentrações inferiores.

Na Figura 23 F, os dados de liberação de AR no capim elefante pré-tratado após a hidrólise, evidenciam que, depois de 24 horas, a hidrólise com o caldo enzimático do CES apresentou a maior concentração de AR (~ 606 mg de AR/g de substrato). Após as 24 horas, houve queda na liberação de AR. Os caldos de CS e de EP apresentaram comportamentos semelhantes entre si.

Para os substratos capim elefante e capim elefante pré-tratado (Figura 23 E e F), os teores de AR liberados com o uso de CES foram semelhantes. Para os caldos de CS e EP, houve um acréscimo na liberação de AR com o substrato capim elefante pré-tratado. Pode-se sugerir que as enzimas presentes no CES apresentam uma formulação mais adequada para a hidrólise de substratos contendo, além da celulose, lignina e hemicelulose.

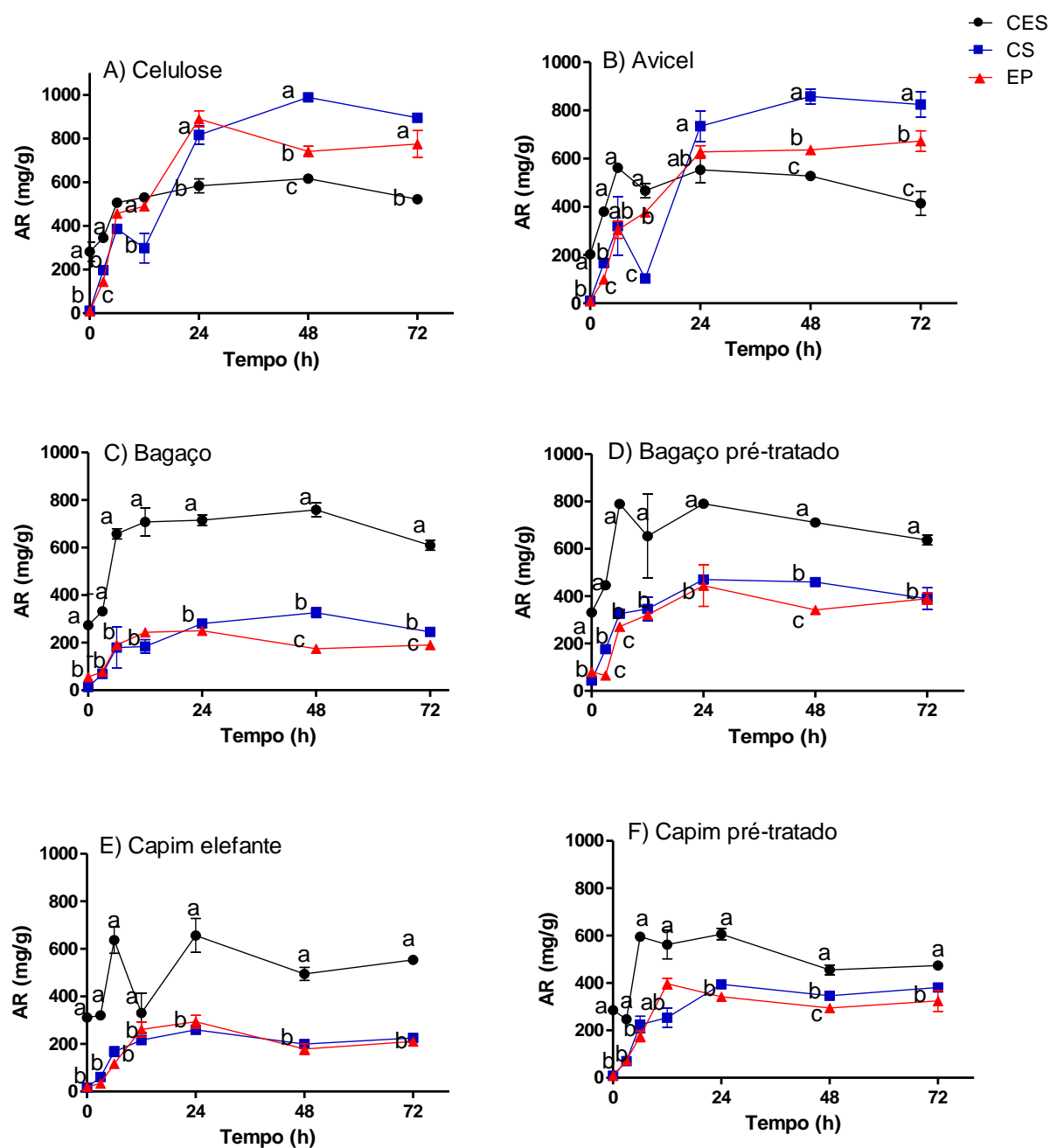


Figura 23. Liberação de açúcares redutores durante hidrólise de celulose (A), Avicel[®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F) com caldos enzimáticos produzidos em cultivo em estado sólido e cultivo submerso utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato, em comparação com enzima padrão produzida por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

CES – cultivo em estado sólido; CS – cultivo submerso; EP – enzima padrão.

O pré-tratamento interrompe a ligação entre a lignina, hemicelulose e celulose, assim como diminui a cristalinidade do substrato, criando poros mais acessíveis e área superficial específica para a ação das celulases e xilanases (ANG *et al.*, 2013). Já Maeda *et al.* (2011) observaram que a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar levou a um aumento constante na proporção e no tamanho dos cristais de celulose. No entanto, o aumento da cristalinidade, naquelas condições, não impediu a hidrólise enzimática, sendo que houve um incremento na liberação de glicose nas amostras estudadas. Também, o pré-tratamento aumentou a acessibilidade das enzimas às microfibrilas de celulose.

O material lignocelulósico contém lignina, que pode absorver as enzimas. Esta absorção é considerada parcialmente irreversível, sendo que apenas 50 % das enzimas adicionadas podem ser recuperadas após a conclusão da hidrólise (JØRGENSEN & OLSSON, 2006). Esse fator pode ser uma possível causa da diminuição da eficiência da hidrólise ao longo do processo.

O pré-tratamento não melhorou a acessibilidade do complexo enzimático do CES tanto para o bagaço como para o capim elefante, pois os valores de AR liberados foram semelhantes. Para os complexos CS e EP, houve incremento na concentração de AR liberados com os pré-tratamentos. Sendo assim, a remoção da lignina foi adequada para melhorar a acessibilidade das enzimas dos complexos CS e EP ao substrato.

Os dados de proteínas totais mostrados na Figura 22 podem explicar a maior liberação de açúcares para o bagaço de cana-de-açúcar e para o capim elefante pré-tratados. Provavelmente, esse fato ocorreu devido à enzimas acessórias presentes nos caldos do CS e EP.

Os valores apresentados no presente trabalho, para a hidrólise enzimática dos diferentes substratos celulósicos, são semelhantes ou mesmo mais elevados do que os descritos em outros trabalhos, tal como comentado na sequência.

Em Adsul *et al.* (2005), foram obtidos 307,6 mg de AR para o uso de Avicel[®] com caldo enzimático de *P. janthinellum* NC1M 1171 com a utilização de 0,5 g de bagaço, com uma primeira hidrólise seguida de uma segunda hidrólise com os resíduos da primeira. Utilizando-se 0,5 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor seguido por branqueamento, o teor de AR foi de 473 mg de AR.

O rendimento máximo de hidrólise (479 mg/g) com palha de arroz foi obtido em 20 horas com caldo enzimático de *A. terreus* (NARRAS *et al.*, 2012).

As enzimas sobrenadantes do cultivo de *P. pulvillorum* TUB F-2220 possibilitaram maiores rendimentos de AR (em torno de 65 %) na hidrólise de celulose microcristalina

(Avicel[®]) comparativamente às enzimas do *P. cf simplicissimum* TUB F-2378 e *T. reesei* RUT C30 (MARJAMAA *et al.*, 2013).

A hidrólise de bagaço pré-tratado com celulases comerciais liberou em torno de 15 g/L de AR após 35 horas (ZHU *et al.*, 2012).

A sacarificação com o complexo enzimático do mutante SR1-7 de *Trichoderma asperellum* RCK2011 apresentou concentrações de açúcares redutores de 530,061 mg/g de substrato para palha de milho pré-tratada com álcalis, 337,741 mg/g de substrato para bagaço de cana-de-açúcar e 288,219 mg/g de substrato para palha de trigo (RAGHUWANSHI *et al.*, 2014).

5.5.3 Análises de componentes liberados após a hidrólise

A quantificação dos componentes dos polímeros celulose e hemicelulose pode ajudar a entender a ação das enzimas sobre as fontes destes polímeros utilizadas na hidrólise enzimática.

Na Figura 24, são apresentadas as concentrações de glicose e xilose determinadas por HPLC após 24 horas de hidrólise de diferentes substratos.

Verifica-se, na Figura 24 A, que na hidrólise de celulose com o complexo CS, houve uma maior liberação de glicose (em torno de 400 mg/g de substrato) do que o complexo CES. A concentração de xilose (em torno de 60 mg/g) foi estatisticamente semelhante para o CES e para o CS e maior em relação a liberada pelo complexo EP.

Para Avicel[®] (Figura 24 B), as proporções destes monossacarídeos foram semelhantes, pois se observa que a concentração de glicose (345 ± 31 mg/g de substrato) foi maior com a utilização do complexo CS. Em relação à xilose liberada, não houve diferença entre a hidrólise com os complexos CES e EP, mas a concentração menor foi verificada nos açúcares liberados por CS.

Na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (Figura 24 C), a maior concentração de glicose foi liberada pelo complexo EP ($365,2 \pm 20,64$ mg/g de substrato), não havendo diferença entre a quantidade deste açúcar liberado por CES e CS. Por outro lado, a concentração de xilose liberada foi maior para o CES, seguido de CS e EP.

Uma possível explicação para o caldo enzimático EP ter liberado maior concentração de glicose pode ser o fato de que este foi produzido com bagaço de cana-de-açúcar, estando as enzimas em proporções ideais para a hidrólise deste substrato, tal como sugerem Goldbeck *et al.* (2013).

Já a liberação de glicose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (Figura 24 D) pelos complexos CS e EP (em torno de 160 mg/g de substrato) foram estatisticamente iguais e superiores ao complexo CS. Para liberação de xilose, o complexo CES foi mais eficiente, sendo que para CS e EP as concentrações desse açúcar foram semelhantes.

Na hidrólise do capim elefante (Figura 24 E), a liberação de glicose foi estatisticamente semelhante com a utilização do complexo CS (em torno de 106,5 mg/g de substrato) e EP e maior do que a liberada por CES. A xilose foi liberada de forma semelhante pelo caldo do CES (em torno de 75,5 mg/g de substrato) e do CS, sendo menor para o caldo da EP.

Para o capim elefante pré-tratado (Figura 24 F), observa-se que a liberação de glicose (em torno de 383,8 mg/g de substrato) com o complexo EP foi maior, inclusive em relação ao capim elefante sem pré-tratamento, como esperado. Nas hidrólises com CES e EP, a concentração de xilose é mais elevada.

Verifica-se que, entre os substratos utilizados, o capim elefante *in natura* liberou, aparentemente, menores quantidades de glicose e de xilose, em relação aos outros substratos, salientando-se que os dados entre as fontes de carbono não foram comparadas estatisticamente. Este fato se deve, provavelmente, à estrutura desse substrato sem tratamento, impedindo a ação das enzimas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

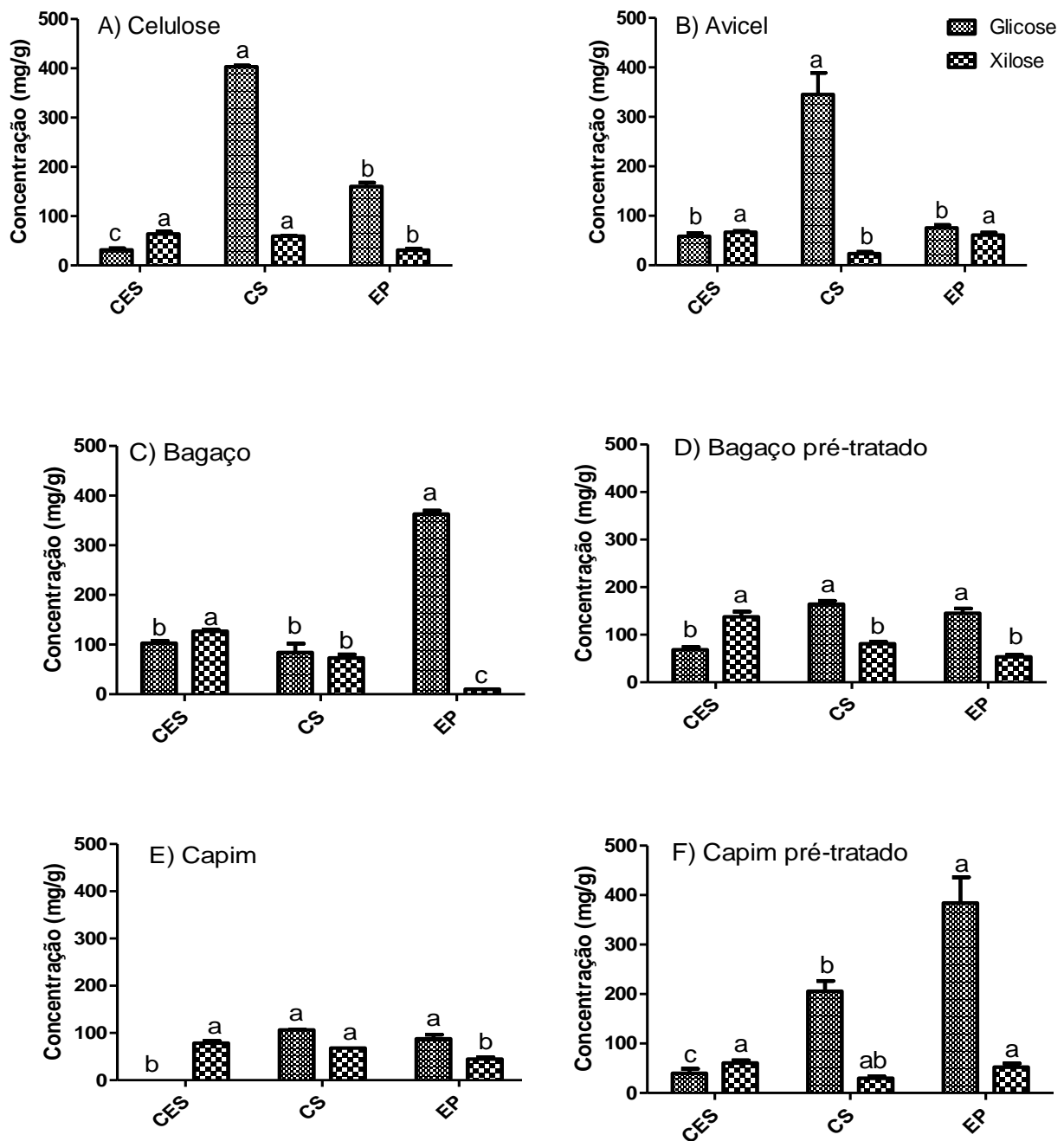


Figura 24. Concentrações de glicose e xilose determinadas por HPLC após 24 horas da hidrólise enzimática de celulose (A), Avicel[®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F). As enzimas foram produzidos em cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS), utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato em comparação com um complexo enzimático padrão (EP) produzido por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para um mesmo açúcar não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), para cada substrato.

As demais substâncias (celobiose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol) detectadas por HPLC no hidrolisado, após 24 horas de hidrólise enzimática de diferentes substratos, podem ser observadas na Figura 25.

Destaca-se, na Figura 25 A, a maior concentração de celobiose ($57 \pm 0,5$ mg/g de substrato) liberada pelo complexo CS do substrato celulose.

Dados semelhantes são encontrados na Figura 25 B, em que o CS liberou a maior quantidade de celobiose (em torno de 43 mg/g de substrato) de Avicel[®]. Por outro lado, a liberação de celobiose do bagaço de cana-de-açúcar foi baixa (Figura 25 C), onde se observa maior concentração de arabinose, assim como para o bagaço pré-tratado (Figura 25 D) e capim elefante (Figura 25 E). Para o capim elefante pré-tratado (Figura 25 F), o CES liberou maior quantidade de celobiose.

De maneira geral, a liberação de arabinose para os diferentes substratos foi semelhante com os complexos CES e do CS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

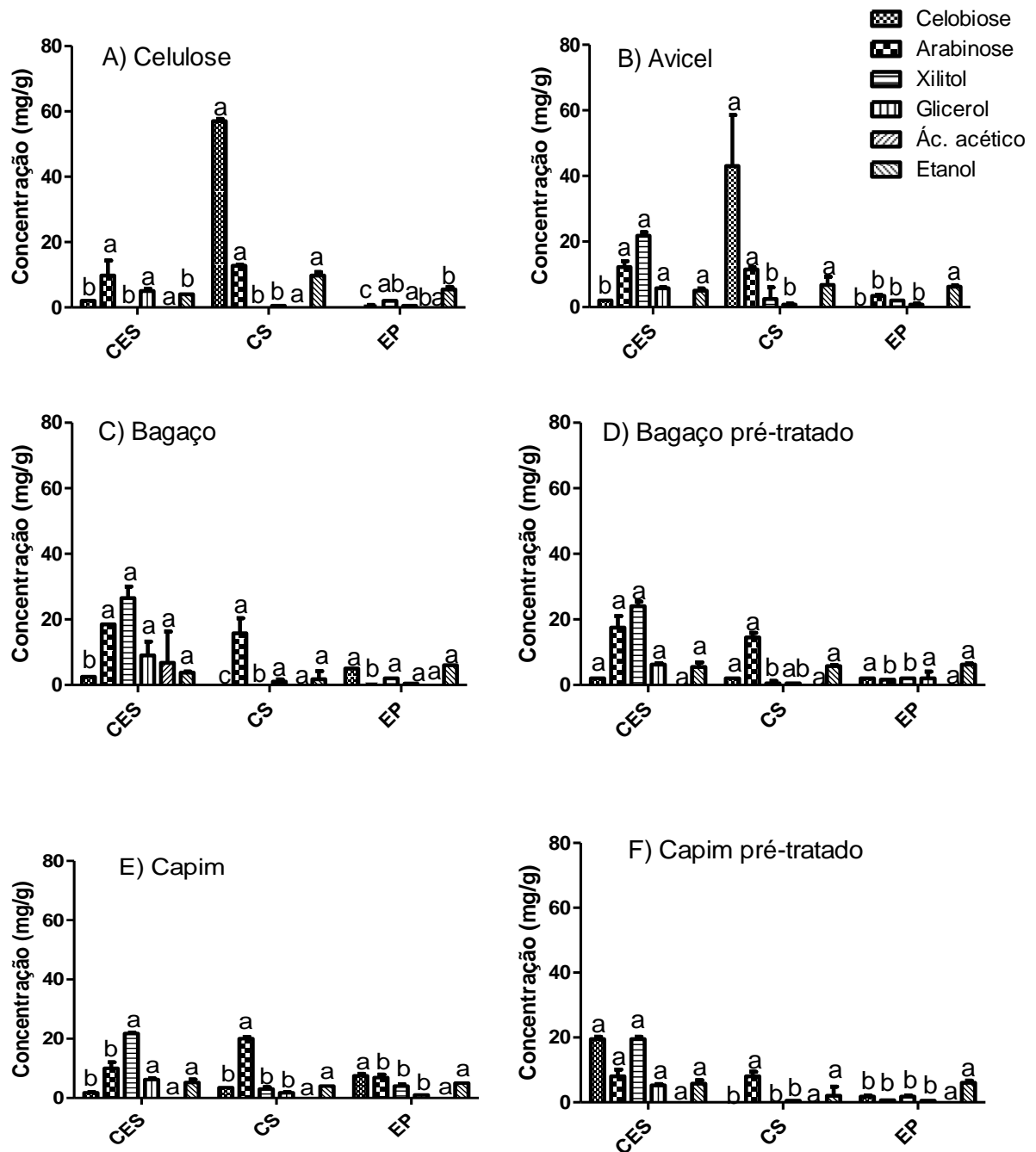


Figura 25. Concentrações de celobiose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol determinados por HPLC após 24 horas da hidrólise enzimática de celulose (A), Avicel[®] (B), bagaço de cana-de-açúcar (C), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (D), capim elefante (E) e capim elefante pré-tratado por explosão a vapor (F), com caldos produzidos em cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS) utilizando-se o resíduo de nabo forrageiro como substrato em comparação com enzima padrão (EP) produzida por cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando-se o fungo *Penicillium echinulatum* S1M29. As médias dos tratamentos com as mesmas letras para a mesma substância não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O CES apresentou, para todos os substratos, concentração elevada e similar (em torno de 50 mg/g) de arabinose, o que indicou que esse açúcar estava presente no caldo enzimático antes da hidrólise. Sendo a arabinose um açúcar raro (Adsul *et al.*, 2005), este método de produção de enzimas com o CES pode ser utilizado para produzi-lo.

Foi realizada a análise por HPLC de glicose, xilose, arabinose, glicerol e celobiose presentes nos caldos enzimáticos brutos de CES, CS e EP. Os valores encontrados foram subtraídos das concentrações encontradas desses produtos após a hidrólise dos diferentes substratos. No caldo enzimático do CES, a concentração de glicose foi de 135,3 mg/g de substrato. Este caldo apresentou, também 33,20 mg/g de xilose e 37,50 mg/g de arabinose. No caldo do CS, a concentração de xilose foi de 5,85 mg/g. Para a EP, as concentrações foram inferiores.

Sendo fato conhecido, as enzimas do complexo celulásico sofrem inibição pelos seus produtos finais de hidrólise. A ação das celulases é inibida pela celobiose produzida durante a hidrólise enzimática (SOARES *et al.*, 2011). A β -glicosidase pode contornar o problema da inibição e, se estiver disponível numa mistura de enzimas para a hidrólise de biomassa, pode melhorar a eficiência, deslocando o equilíbrio para uma maior concentração do produto (SINGHANIA *et al.*, 2013). Observa-se que houve produção de altas concentrações de glicose em relação a pequenas concentrações de celobiose para todos os substratos indicando que, devido à presença de β -glicosidase, houve conversão de celobiose à glicose. De modo geral, o caldo do CS apresentou maior eficiência na liberação de glicose. Assim, esse caldo enzimático pode ser utilizado para produção de etanol de segunda geração com controles específicos do processo.

A produtividade de glicose neste trabalho, quando foi utilizado celulose como substrato, foi de 8,0 g/L. Para o bagaço pré-tratado, a produtividade foi de 3,29 g/L. Na literatura, são apresentados trabalhos de hidrólise de diferentes substratos com diferentes microrganismos, com caldos produzidos por diferentes cultivos, apresentando valores superiores e inferiores de produtividade em relação à glicose.

A concentração final de açúcares redutores a partir da hidrólise de tronco de palma (produtora de óleo) pré-tratado com NaOH com o extrato enzimático de *A. fumigatus* SK1 foi de 8,55 g/L (ANG *et al.*, 2013). A análise por HPLC indicou que a degradação enzimática produziu vários açúcares fermentáveis. A concentração de glicose foi de 5,09 g/L e a de celobiose foi de 1,43 g/L. Segundo Ang *et al.* (2013), a baixa concentração de celobiose ocorreu devido à presença de β -glicosidase que converteu esse açúcar à glicose. O teor de

xilose e arabinose foi, provavelmente, devido à presença de α -L-arabinofuranosidase no extrato enzimático.

Com extrato enzimático de *T. reesei* Rut–C30 em SSF, após 72 horas de hidrólise com farelo de trigo como substrato, foram obtidas as concentrações de 3,39 g/L de glicose, 0,67 g/L de celobiose, 2,59 g/L de xilose e 0,34 g/L de arabinose. Para o substrato Avicel[®], o teor de glicose foi de 7,53 g/L e de celobiose de 4,04 g/L (PRÉVOT *et al.*, 2013).

Pereira *et al.* (2013) avaliaram o desempenho do complexo celulásico produzido por *P. echinulatum* em comparação com o complexo enzimático comercial (Accelerase 1500) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por vapor, após 72 horas. O complexo enzimático produzido por *P. echinulatum* mostrou o melhor desempenho em termos de concentração máxima de glicose (rendimentos de 15,5 para *P. echinulatum* e 6,1 g/L para o Accelerase 1500). Níveis baixos semelhantes de xilose foram obtidos para os dois complexos de enzimas e a concentração de arabinose estava em níveis abaixo do detectável para ambos os complexos.

5.5.4 Zimogramas para atividade de β -glicosidase, endoglicanase e xilanase nos diferentes cultivos

A análise por zimogramas de uma solução enzimática pode ser uma ferramenta de comparação entre distintas misturas enzimáticas. Os zimogramas para atividade de β -glicosidase, endoglicanase e xilanase são mostrados na Figura 26. Foram analisadas as diferentes proteínas produzidas por *P. echinulatum* nos diferentes tipos de cultivos através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Para a obtenção dos géis de atividade, o SDS foi removido.

O gel de atividade (Figura 26 A) mostrou bandas de atividade de β -glicosidase sobre esculina com posicionamento relativo a 219,6 kDa para os caldos enzimáticos de CS e de CES e de 219,4 kDa para da EP.

Na Figura 26 B, são observadas bandas de atividade de endoglicanase em CMC. Para o complexo CS, o posicionamento relativo das bandas de atividade enzimática são de 25,8, 43,8, 73,8 e 150 kDa. Para o caldo do CES, o posicionamento relativo das bandas são de 25,3, 26,3 e 76,2 kDa. Já para o caldo da EP, o posicionamento relativo das bandas são 25,9, 68,9 e 75,2 kDa. O caldo enzimático do CS apresentou maior quantidade de bandas em relação aos outros caldos para essa enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para xilanase (Figura 26 C), o posicionamento relativo da banda observada ficou em 118,1 kDa para o caldo de CS. Para o caldo do CES, ocorreram duas bandas de hidrólise de posicionamento relativo de 58,9 e 105,3 kDa. Para o caldo da EP, o posicionamento relativo das bandas ficaram em 62,4, 106,1, 121,1 e 146,7 kDa. Nota-se que o caldo EP apresentou maior quantidade de bandas em relação aos outros caldos para essa enzima e, na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e do capim elefante pré-tratado, apresentou maior eficiência na liberação de glicose.

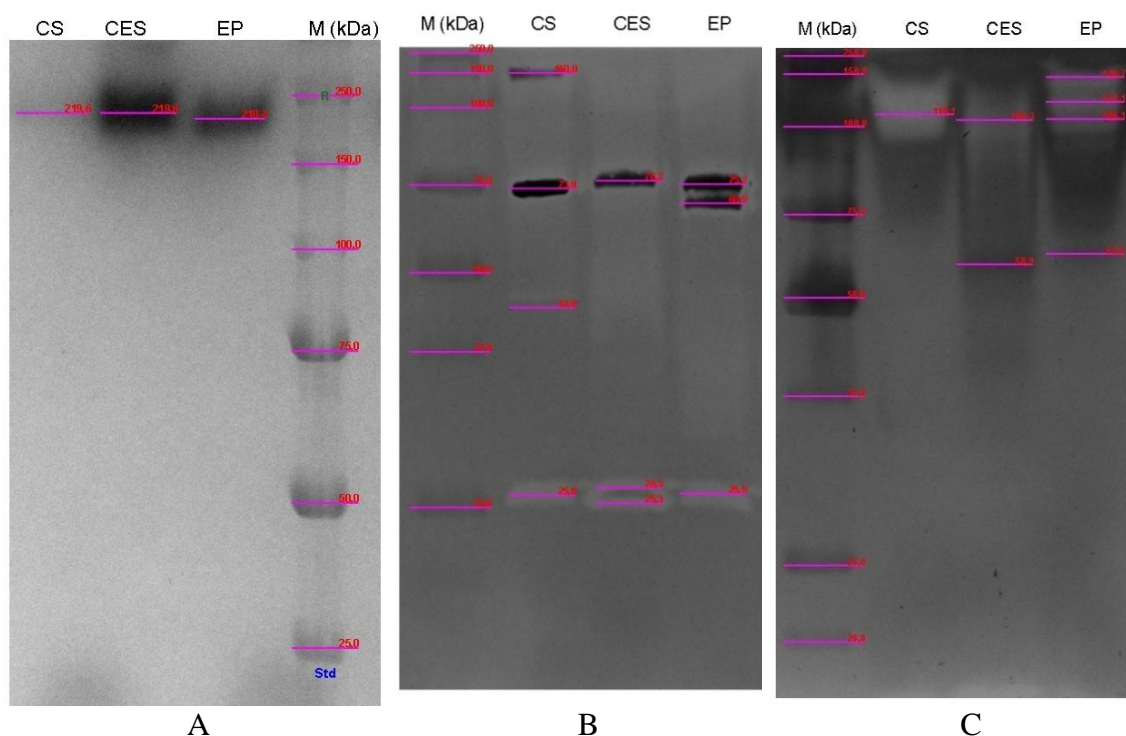


Figura 26. Perfis das atividades de β -glicosidase (A), endoglicanase (B) e xilanase (C) dos caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* S1M29 separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As informações na parte superior da figura relacionam-se ao tipo de cultivo (CES – cultivo em estado sólido; CS – cultivo submerso; EP – enzima padrão) e M é o marcador de massa molecular, com bandas de 25 a 250 kDa. O valor da massa molecular de cada enzima está marcada sobre a banda.

Reis *et al.* (2014) verificaram géis de atividade de endoglicanase para o complexo enzimático de *P. echinulatum* com posicionamento relativo de bandas em torno de 36 kDa para cultivos em pH 5,5 a 6,0, não sendo possível observar a mesma banda em cultivos a pH 4,0 e 7,0. A banda de posicionamento relativo a 32 kDa foi menos intensa quando o cultivo ocorreu em pH 7,0, em relação aos outros valores testados. Em pH 5,0 foram observadas bandas de posicionamento relativo de 25 a 250 kDa.

Zampieri *et al.* (2013) avaliaram a atividade de endoglicanase em gel para *P. echinulatum* e observaram posicionamento relativo de 70,13 a 78,83 kDa. A atividade de β -glicosidase foi detectada na posição relativa a 220 kDa, para diferentes condições de produção. Nos meios formulados com celobiose e glicerol, essas enzimas foram observadas em posições relativas a 146,95 e 150,22 kDa do marcador.

Os zimogramas forneceram uma visão geral sobre os principais componentes de endoglicanase, β -glicosidase e xilanase presentes nos caldos enzimáticos de *P. echinulatum* e que foram utilizados para a hidrólise dos diferentes substratos.

Com o caldo enzimático do CS foi obtida a maior eficiência na hidrólise dos substratos celulose e Avicel[®]. Para o bagaço de cana-de-açúcar, o caldo da EP apresentou a maior liberação de glicose e os caldos CES e CS liberaram glicose de maneira semelhante estatisticamente. Para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, o CS e EP foram os caldos que liberaram maior concentração de glicose. Na hidrólise de capim elefante, a liberação de glicose foi semelhante para o CS e para EP. O caldo enzimático da EP apresentou maior eficiência na liberação de glicose na hidrólise do capim elefante pré-tratado. Assim, de maneira geral, o caldo enzimático de *P. echinulatum* produzido em cultivo submerso (CS) foi o que apresentou maior eficiência na liberação de glicose após a hidrólise de diferentes substratos.

Diante do exposto, verifica-se que os resultados da produção de celulasas e xilanas demonstraram que o RNF apresenta potencial para a produção de enzimas pelo fungo *P. echinulatum* S1M29 em CES e em CS, em substituição parcial e/ou total aos farelos de trigo e/ou farelo de soja, como fonte de proteínas ou nitrogênio no meio de cultivo. O complexo enzimático produzido em CS com RNF apresentou eficiência na liberação de glicose na hidrólise de diferentes substratos. Assim, o RNF tem potencial para ser utilizado como fonte alternativa de carbono em substituição parcial ao FT e ao FS na produção de complexos enzimáticos, contribuindo, assim, no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção enzimática e, conseqüentemente, na produção de bioprodutos.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, a partir dos dados apresentados neste trabalho, que:

- o fungo *P. echinulatum* S1M29 pode crescer tanto em cultivo em estado sólido como em cultivo submerso, com meios contendo RNF como componente para substituição parcial ou total do farelo de trigo ou de soja e produzir enzimas celulásicas;
- os resultados da produção de celulasas e xilanases demonstraram que o RNF apresenta potencial para substituir parcialmente o farelo de trigo, como fonte de proteínas ou nitrogênio no meio de cultivo, na produção de enzimas pelo fungo *P. echinulatum* S1M29 em CES para serem empregadas em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos;
- o RNF apresenta potencial para substituir parcial ou totalmente o farelo de trigo e o farelo de soja na produção de enzimas pelo fungo *P. echinulatum* S1M29 em CS para serem empregadas em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, fato observado nos resultados da produção de celulasas e xilanases;
- o uso de sacarose aumentou as atividades de endoglicanase, FPA, β -glicosidase e xilanase em meios formulados com RNF 0,5 g + FS 0,2 g + Cel 1,0 g em CS;
- os meios constituídos somente com RNF não apresentaram atividades enzimáticas satisfatórias; as menores atividades enzimáticas observadas nos cultivos formulados apenas com RNF podem estar relacionadas a menores concentrações de substratos indutores (celulose e xilana), associadas à elevada concentração de proteínas, o que pode ter acarretado na ausência de indução e em repressão catabólica;
- foi obtida maior eficiência na liberação de glicose na hidrólise de diferentes substratos com o complexo enzimático do CS e, entre estes, a hidrólise foi mais eficiente com celulose e Avicel[®];
- há possibilidade de utilização do RNF como fonte alternativa de carbono em substituição parcial ao FT e ao FS para produzir complexos enzimáticos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se, para futuros trabalhos:

- estudar a produção de celulases com o uso de RNF em biorreatores;
- estudar a produção de celulases com a utilização de diferentes concentrações de torta de nabo forrageiro;
- estudar a produção de celulases com a utilização de farelo de nabo forrageiro;
- avaliar a fermentação dos açúcares produzidos pela hidrólise dos caldos enzimáticos do fungo *P. echinulatum* S1M29 com complexos enzimáticos produzidos com RNF;
- avaliar a produção de etanol a partir de RNF hidrolisado pelo complexo enzimático produzido pelo fungo *P. echinulatum* S1M29 em meios com RNF;
- avaliar os custos de produção empregando RNF em relação ao cultivo com farelos de soja e trigo para uma melhor estimativa da vantagem do emprego de RNF em substituição aos farelos;
- estudar a produção de outros bioprodutos (como xilitol, n-butanol, 2,3-butanodiol) empregando RNF.

REFERÊNCIAS

ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; HUSIN, W. N. W.; SAHU, J. N. Utilization possibilities of palm shell as a source of biomass energy in Malaysia by producing bio-oil in pyrolysis process. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1863-1872, 2011.

ADSUL, M. G.; CHULE, J. E.; SINGH, R.; SAIKH, H.; BASTAWDEA, K. B., GOKALE, D. V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: Applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 6-10, 2005.

AIDOO, K. E., HENDRY, R., WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293-1302, 2013.

APPRICH, S.; TIRPANALAN, O.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorizations of products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 56, p. 222-231, 2014.

ÁVILA, R. N. A.; SODRÉ, J. R. Physical-chemical properties and thermal behavior of fodder radish crude oil and biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 54-57, 2012.

BAÑOS, R.; AGUGLIARO, F. M.; MONTTOYA, F. G.; GIL, G.; ALCAYDE, A.; GÓMEZ, J. Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1753-1766, 2011.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BAYLEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**. v. 23, 257-270, 1992.

BAYLEY, M. J.; TAHTIHARJU, J. Efficient cellulose production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 156-162, 2003.

BEKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; AJAYI, A.; SHONUKAN, O. O. Purification characterization of cellulose from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 898-904, 2005.

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

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, LALITHA, D.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4767-4774, 2010.

BITTENCOURT, L. R.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Quantificação de massa celular de *Penicillium echinulatum* a partir do conteúdo de quitina hidrolisada enzimaticamente. In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Resumos**, p. 209, 2002.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BRASI, L. A. C. S.; DENUCCI, S.; PORTAS, A. A. **Nabo - adubo verde, forragem e bioenergia**. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/new/acervotecnico.php?ID=18>>. Acesso em: 09 mar. 2014.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 120-128, 2010.
- BRUMMER, V.; JURENA, T.; HLAVACEK, V.; OMELKOVA, J.; BEBAR, L.; GABRIEL, P.; STEHLIK, P. Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper – Source of raw material for production of liquid biofuels. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 543-547, 2014.
- CALLOW, N. V.; JU, L. Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulose production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 311-317, 2012.
- CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L. R.; SEHNEM, N. T.; ANDREAS, J.; DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 391-396, 2004.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Effect of methylxanthines on production of cellulases by *Penicillium echinulatum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 478-485, 2007a.
- 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, 2007b.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 642-647, 2009.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1889-1900, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase determination: Modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **OMICS Publishing Group**, 2012.

Disponível em: <<http://omicsonline.org/scientific-reports/srep125.php>>. Acesso em: 09 jun. 2014.

CARRIER, M.; LOPPINET-SERANI, A.; DENUX, D.; LASNIER, J-M.; HAM-PICHAVANT, F.; CANSELL, F.; AYMONIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 298-307, 2011.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 151-158, 2010.

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

DAROIT, D. J.; SIMONETTI, A.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18(5), p. 933-941, 2008.

DEKA, D.; DAS, S. P.; SAHOO, N.; DAS, D.; JAWED, M.; GOYAL, D.; GOYAL, A. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, Article ID 965310, 2013.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with

pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulose production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

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

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

DILLON, A. J. P. Enzimas como agentes biotecnológicos. **Celulases**, p. 243-269, 2004.

DILLON, A. J. P.; ZORGI, C.; CAMASSOLA, M.; HENRIQUES, J. A. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 740-746, 2006.

DILLON, A. J. P.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 48-53, 2011.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; RAMOS, L. P. Optimizations of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1837-1845, 2008.

DOPPELBAUER, R.; ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LAFFERTY, R. M.; STEINMILLER, H. Lignocellulosic waste for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 26, p. 485-94, 1987.

DRUZHININA, I. S.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Global carbon utilization profiles and wild-type, mutant and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2126-2133, 2006.

ESTERBAUER, H.; STEINER, I.; LABUDOVA, I.; HERMAN, A.; HAYN, M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 51-65, 1991.

FALCONE, M.; MARQUES, A. B. Estudo sobre condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v. 4, p. 24-30, 1965.

GARCIA-MARTINEZ, D. V.; SHINMYO, A.; MADIA, A.; DEMANI, A. L. Studies on cellulase production by *Clostridium thermocellum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 189-197, 1980.

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

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M. R.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO; F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 797-803, 2013.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, v. 47, p. 36-38, 1986.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. T. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HENDY, N. A.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 73-77, 1984.

HENZ, J. R.; NUNES, R. V.; BERTICELLI, V.; SILVA, W. T. M.; SCHONE, R. A.; EYNG, C.; POZZA, P. C.; NUNES, C. G. V. Composição química e valores energéticos de diferentes farelos de soja para aves. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, Águas de Lindóia, **Anais**, 2009.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PINTO, G. A.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1057-67, 2011.

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

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 186-193, 2011.

JOHNSON, A. The control of fed-batch fermentation processes – A survey. **Automatica**, v. 23, p. 691-705, 1987.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 42-48, 2005.

JØRGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 2088 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381-390, 2006.

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

- KADAM, K. L.; McMILLAN, J. D. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 17-25, 2003.
- KARLSSON, J.; MOMCILOVIC, D.; WITTGREN, B.; SCHULEIN, M.; TJERNELD, F.; BRINKMALM, G. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. **Biopolymers**, v. 63, p. 32-40, 2002.
- KHAWLA, B. J.; SAMEH, M.; IMEN, G.; DONYES, F.; DHOUBA, G.; RAOUNDHA, E. G.; OUMÈMA, N. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 144-149, 2014.
- KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; KOOKOS, I. K.; WEBB, C. Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions. **Biochemical Engineering Journal**. v. 16, p. 23-34, 2003.
- KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, p.19-33, 2009.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y. –H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4950-4962, 2011.
- KULKARNI, N.; JUNQUEIRA, L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.
- LAEMNLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 29-48, 1999.

LEE, Y. J.; KIM, B. K.; LEE, B. H.; JO, K. I.; LEE, N. K.; CHUNG, C. H.; LEE, Y. C.; LEE, J. W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 378-386, 2008.

LEVER, M.; GOEN, H.; CORD-RUWISCH. Ethanol from lignocelulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7083-7087, 2010.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4554-4563, 2010.

LI, C.; YOSHIMOTO, M. FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1366-1372, 2007.

LI, C.; YANG, Z.; ZHANG, R. H. C.; ZHANG, D.; CHEN, S.; MA, L. Effect of pH on cellulose production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 470-477, 2013.

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 493-498, 2013.

LIAB, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.

LIANG, Y.; FENG, Z.; YESUF, J.; BLACKBURN, J. W. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and

- cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1841-1852, 2010.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.
- LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 259-262, 2004.
- LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-deph investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicelluloses and lignin. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8217-8223, 2010.
- LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. New York: Spring Verlag, p. 33-61, 1992.
- LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New Biotechnology**, v. 28, p.733-737, 2011.
- MABEE, W. E.; MCFARLANE, P. N.; SADDLER, J. N. Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, 1-11, 2011.
- MAHESH, C. ALOK, K.; SANGWAN, N. S.; SHAIENDRA, G. S; MAHENDER, D. P.; RAJINDER, S. S. Development of a mutant of *Trichoderma citroniviride* for enhanced production of celluloses. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1659-1662, 2009.
- MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR., N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of preated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p.1196-1201, 2011.
- MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of celulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbono source and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, p. 269-278, 1957.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 6, 21-33, 1976.

MARJAMAA, K.; TOTH, K.; BROMANN, P. A.; SZADACS, G.; KRUUS, K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 358-369, 2013.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 24-33, 2013.

MCGAVIN, M.; FORSBERG, C. W. Catalytic and substrate binding domains of endoglucanase 2 from *Bacteroides succinogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.171, p. 3310-3315, 1989.

MELLO-DE-SOUSA, T. M.; SILVA-PEREIRA, I.; FONSECA, POÇAS-FONSECA, M. J. Carbon source and pH – Dependent transcriptional regulation of cellulose genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, 19-26, 2011.

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

MINIHANE, B. J.; BROWN, D. E. Fed-batch culture technology. **Biotechnology Advance**, v. 4, p. 207-218, 1986.

MONONO, E. M.; NYREN, P. E.; BERTI, M. T.; PRYOR, S. W. Variability in biomass yield, chemical composition, and ethanol potential of individual and mixed herbaceous biomass species grown in North Dakota. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 331-339, 2013.

MONTENECOUT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulose production by *Trichoderma viride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 178-183, 1977.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATATAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MORRISON, M.; MIRON, J. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: A combination of cellulosomes and Pil-proteins? **FEMS Microbiology Letters**, v.185, p.109-115, 2000.

NASCIMENTO, A. H.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; RIBEIRO, E. G. Valores de composição química e energética de alimentos para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 579-583, 1998.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NIRANJANE, A. P.; MADHOU, P.; STEVENSON, T. W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulose by *Phlebia gigantean*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1464-1468, 2007.

- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 612-619, 2003.
- PARACHIN, N.; SIQUEIRA, S.; FARIA, F. P.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 59, p. 52-27, 2009.
- PAZARLIOĞLU, N. K.; SARIISIK, M.; TELEFONCU, A. Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 767-771, 2005.
- PEREIRA, B. M. P.; ALVAREZ, T. M.; DELABONA, P. S.; DILLON, A. J. P.; SQUINA, F. M.; PRADELLA, J. G. C. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 1052-1062, 2013.
- PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – Thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, p. 58–68, 2012.
- PRÉVOT, V.; LOPEZ, M.; COPINET, E.; DUCHIRON, F. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690-693, 2013.
- RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulose production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189, 2014.
- RAMIREZ-COUTIÑO, L.; ESPINOSA-MARQUEZ, J.; PETER, M. G.; SHIRAI, K. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9236-9240, 2010.
- REESE, E. T.; MAGUIRE, A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 17, p. 242-245, 1969.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597-603, 2013.

REIS, L.; SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenergy Resource**, v. 7, p. 60-67, 2014.

REISINGER, M.; TIRPANALAN, Ö.; HUBER, F.; KNEIFEL, W.; NOVALIN, S. Investigations on a wheat bran biorefinery involving organosolv fractionation and enzymatic treatment. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 53-61, 2014.

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

SADHU, S.; MAITI, K. Cellulase production by bacteria: A review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3 (3), p. 235-258, 2013.

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

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SARATALE, D. G.; OH, S. E. Production of thermo-tolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiosis* sp. KNU. **Biodegradation**, v. 22, p. 905-919, 2011.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCHWARZ, W. H.; BRONNENMEIER, K.; GRABNITZ, F.; STAUDENBAUER, W. L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage-glucans. **Analytical Biochemistry**, v. 164, p. 72-77, 1987.

SILVA, R. J. **Efeito de pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Caxias do Sul, 2012.

SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; BON, E. P. S.; ANDREAUS, J. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulose preparations using filter paper. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 280-285, 2012.

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

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

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

SOARES, I. B.; TRAVASSOS, J. A.; BAUDEL, H. M.; BENACHOUR, M.; ABREU, C. A. M. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 670-675, 2011.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, p. 437-441, 2009.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 181-191, 1979.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 1-11, 2002.

SUN, S.; ZIYONG, L.; KAI, Z.; XIN, S.; YINBO, Q. The composition of basal and induced cellulose systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 560-567, 2008.

ŚWIĄTEK, K.; LEWANDOWSKA, M.; ŚWIĄTEK, M.; BEDNARSKI, W.; BRZOZOWSKI, B. The improvement of enzymatic hydrolysis efficiency of rape straw and *Miscanthus giganteus* polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 323-331, 2014.

SZABÓ, I. J.; JOHANSSON, G. PETTERSSON, G. Optimized cellulose production by *Phanerochaete chrysosporium*: Control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 221-230, 1996.

SZKLO, A. S.; SCHAEFFER, R.; SCHULLER, M. E.; CHANDLER, W. Brazilian energy policies side-effects on CO₂ emissions reduction. **Energy Policy**, v. 33, p. 349-364, 2005.

SZIJARTO, N.; FAIGL, Z.; RÉCZEY, K.; MÉZESC, M.; BERSÉNYI, A. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding Trial. **Industrial Crops and Products**, v. 20, 49-47, 2004.

TALEBNIA, F.; KARAKASCHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744-4753, 2010.

TAYLOR, M. P.; ELEY, K. L.; MARTIN, S.; TUFFIN, M. I.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. *Thermophili cethanogenesis*: Future prospects for second generation bioethanol production. **Trends in Biotchnology**, v. 27, p. 398-405, 2009.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VALENTINOTTI, S.; SRINIVASAN, B.; HOLMBERG, U.; BONVIN, D.; CANNIZZARO, D.; RHIEL, M.; VON STOCKAR, U. Optimal operation of fed-batch fermentations via adaptive control of overflow metabolite. **Control Engineering Practice**, v. 11, p. 665-674, 2003.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hidrolisis of cellulose: An overview. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 3-14, 1991.

WESTERENG, B.; AGGER, J. W.; HOM, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; AACHMANN, F. L.; STENSTROM, Y. H.; EIJSINK, V. G. H. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide mooxygenases. **Jounal of Chromatography A**, v. 1271, p. 144-152, 2013.

WILMOT, C. M. Polysaccharide monoxygenases: Giving a boost to biofuel production. **Structure**, v. 20, p. 1051-1061, 2012.

WINQUIST, E.; MOILANEN, U.; METTALA, A; LEISOLA, M.; HATAKKA, A. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by soldid-state cultivation of fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 128-132, 2008.

XIN, S.; YANG, H.; CHEN, Y.; WANG, X.; CHEN, H. Assessment of pyrolysis polygeneration of biomass based on major components: Product characterization and elucidation of degradation pathways. **Fuel**, v. 113, p. 266-273, 2013.

XIONG, H.; WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 731-736, 2004.

YOON, L. W.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 250-256, 2013.

ZAMPIERI, D.; GUERRA, L.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Secretion of endoglucanases and glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. **Industrial Crops and Products**, v. 520, 882-886, 2013.

ZHANG, J.; TANG, M.; VIIKARI, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 8-12, 2012.

ZHANG, H.; LI, L.; CAO, J.; ZHAO, M.; WU, Q. Comparison of renewable energy policy evolution among the BRICs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4904-4909, 2011.

ZHANG, Y. P; LYND, L. R. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p.1563-1569, 2004a.

ZHU, Z.; ZHU, M.; WU, Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with NH₄OH-H₂O₂ and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 199-207, 2012.