

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium echinulatum*  
EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO MECÂNICA**

**LAÍSA DOS REIS**

Caxias do Sul

2011

**LAÍSA DOS REIS**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium echinulatum*  
EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof Dr. Aldo J. P. Dillon

**Co-orientadora:** Prof Dr. Marli Camassola

Caxias do Sul

2011

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

R375p Reis, Laísa dos, 1985-  
Produção de celulases e xilanases por *penicillium echinulatum* em  
biorreator com agitação mecânica / Laísa dos Reis.- 2011.  
vii, 83 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, co-orientadora:  
Profª. Drª. Marli Camassola

1. Enzimas. 2. Celulases. 3. Xilanases. 4. *Penicillium echinulatum*.  
I. Título.

CDU 2.ed. : 577.15

Índice para catálogo sistemático:

1. Enzimas	577.15
2. Celulases	547.458.8
3. Xilanases	547.455.526
4. <i>Penicillium echinulatum</i>	582.282.123.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Cleoni Cristina G. Machado – CRB 10/1355

LAÍSA DOS REIS

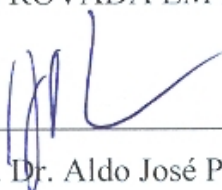
Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em  
biorreator com agitação mecânica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Marli Camassola

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 9 DE DEZEMBRO DE 2011.



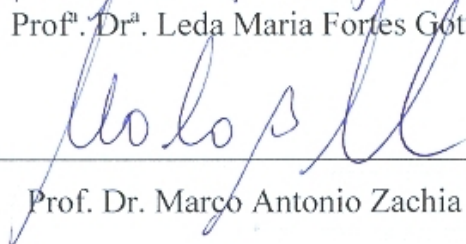
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



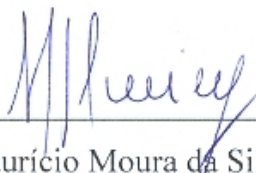
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Camassola



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Maria Fortes Gottschalk



Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub



Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

## **DEDICATÓRIAS**

Aos meus pais, Larri e Laira, por todo amor,  
incentivo e carinho dedicados durante minha vida.

Ao meu esposo Daniel pelo seu apoio, paciência e  
amor incondicional.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar minha caminhada.

Ao professor Dr. Aldo J. P. Dillon pelos ensinamentos, incentivo à pesquisa e orientação.

À professora Dra. Marli Camassola pelos ensinamentos, co-orientação e pela oportunidade de estágio de docência.

À Roselei C. Fontana, técnica do laboratório, por não medir esforços na realização deste trabalho.

Ao professor José G. C. Pradella e sua equipe de pesquisadores do Laboratório Nacional do Bioetanol.

Aos professores da banca de acompanhamento Dr. Maurício M. da Silveira e Dra. Rute T. da Silva Ribeiro.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e funcionários do Instituto de Biotecnologia.

A todos os colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas pela amizade e companheirismo, em especial ao Willian D. H. Schneider pela colaboração no desenvolvimento prático deste trabalho.

À Lucimara, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela eficiência e organização.

A minha família que sempre proporcionou o melhor para mim, estando sempre ao meu lado e acreditando em mim.

Ao meu esposo Daniel pelo seu amor, carinho e apoio.

Ao apoio estrutural da UCS e financeiro da CAPES.





## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Demanda energética	5
2.2 Biomassa vegetal	7
2.3 Celulases	13
2.4 Aplicações das celulases	18
2.5 Mecanismos de indução de celulases fúngicas	19
2.6 Xilanases	21
2.7 Aplicações das xilanases	22
2.8 Produção de Enzimas	23
2.8.1 Fonte de carbono e indutores	23
2.8.2 Fontes de nitrogênio	26
2.8.3 Uso de surfactantes	28
2.8.4 Efeito do pH	29
2.8.5 Temperatura	31
2.8.6 Agitação e aeração	32
2.8.7 Condições do processo de cultivo	33
2.9 Biorreatores	35

3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Linhagem	39
3.2 Soluções e suspensões	40
3.3 Meios de produção para celulases e xilanases	41
3.3.1 Meio de produção para inóculo	41
3.3.2 Meio de produção para cultivos em biorreator	42
3.4 Procedimentos	42
3.4.1 Crescimento e manutenção de linhagens	42
3.4.2 Cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca para inóculos	42
3.4.3 Cultivos em biorreator	43
3.5 Determinação do coeficiente volumétrico da transferência de oxigênio	47
3.6 Determinação do conteúdo de celulose	48
3.7 Determinação da sacarose	48
3.8 Dosagens enzimáticas	49
3.8.1 Determinação de FPA	49
3.8.2 Determinação de endoglicanases	50
3.8.3 Determinação de $\beta$ -glicosidases	50
3.8.4 Determinação de xilanases	51
3.8.5 Unidades de enzimas	52
3.8.6 Determinação de endoglicanases por viscosidade	52
3.9 Análise dos resultados	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

4.1 Efeito da temperatura na produção de celulases e xilanases de <i>Penicillium echinulatum</i>	55
4.2 Efeito do pH na produção de celulases e xilanases de <i>Penicillium echinulatum</i>	58
4.3 Produção de celulases e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i> em regime descontínuo com diferentes concentrações de celulose	67
4.4 Produção de celulases e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i> em regime descontínuo alimentado	71
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Comparação na produção de celulases empregando diferentes microrganismos e substratos.	26
Tabela 2. Valores ótimos de pH para a produção de celulases e xilanases.	65
Tabela 3. Resumo dos principais resultados obtidos em diferentes valores de pH.	66

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da distribuição da lignina, hemicelulose e celulose em um tecido vegetal, adaptada de Buchanan *et al.* (2000). Os cilindros representam as microfibrilas de celulose, a estrutura associada diretamente na fibra da celulose representa a hemicelulose e a lignina é o polímero que interliga a celulose e a hemicelulose 8
- Figura 2. Estrutura da lignina de *Fagus* sp. (Fengel & Wegener, 1989) 9
- Figura 3. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac: grupo acetil; Arab: L-arabinofuranose; MeGIA: ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil: D-xilose (Biely, 1985) 11
- Figura 4. Estrutura da celulose evidenciando as regiões cristalinas e amorfas (Fonte: Dillon (2004) 12
- Figura 5. Mecanismo de ação do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (Martins, 2005) 14
- Figura 6. Sítio ativo das endoglicanases que permite acesso ao longo de uma cadeia de celulose (Martins, 2005) 15
- Figura 7. Modo de ação progressiva das celobioidrolases I (CBH I) de *T. reesei* (Divne *et al.*, 1994) 16
- Figura 8. Modelo de indução de celulasas em *P. purpurogenum*. Os números de 1 a 4 correspondem aos processos de indução. Abreviação: IBGL:  $\beta$ -glicosidase intracelular (Suto & Tomita, 2001) 20
- Figura 9. Esquema de biorreator de tanque agitado piloto equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo 36
- Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de *Penicillium echinulatum* (Foto: Marli Camassola) 39

- Figura 11. Biorreator com agitação mecânica, construído em parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e o Senai/Mecatrônica 44
- Figura 12. Biorreator com agitação mecânica da New Brunswick, modelo BioFlo/CelliGen 115 46
- Figura 13. Valores de pH durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes temperaturas 56
- Figura 14. Atividades de endoglicanases (A), FPA (B),  $\beta$ -glicosidases conforme método de Chahal (1985) (C) e xilanases (D) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes temperaturas 58
- Figura 15. Agitações empregadas durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 59
- Figura 16. Vazão de ar requerida durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 60
- Figura 17. Concentração de sacarose (A) e de açúcares redutores (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 60
- Figura 18. Concentração de celulose durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 61
- Figura 19. Atividades de xilanases (A) e FPA (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 62
- Figura 20. Atividades de endoglicanases de acordo com o método de Ghose (1987) (A) e de acordo com o método da redução da viscosidade de Byrne *et al.* (1975) (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH 63

Figura 21. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de 63  
acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos com *Penicillium*  
*echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH

Figura 22. Concentração de celulose (A) e de sacarose (B) durante cultivos em regime 68  
descontínuo com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações  
iniciais de celulose

Figura 23. Atividade de endoglicanases (A) e FPA (B) durante cultivos em regime 68  
descontínuo com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações  
iniciais de celulose

Figura 24. Atividade de xilanases durante cultivos em regime descontínuo com *Penicillium* 70  
*echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose

Figura 25. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de 71  
acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos com *Penicillium*  
*echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose

Figura 26. Consumo de sacarose (A) e celulose (B) durante cultivos em regime descontínuo 73  
(RD) e regime descontínuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum* S1M29,  
empregando-se diferentes massas de celulose

Figura 27. Consumo de oxigênio e frequência dos agitadores durante cultivos em regime 74  
descontínuo (RD) e regime descontínuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum*  
S1M29, empregando-se diferentes massas de celulose

Figura 28. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de 76  
acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos em regime descontínuo  
(RD) e regime descontínuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum* S1M29,  
empregando-se diferentes massas de celulose

Figura 29. Atividade de FPA durante cultivos em regime descontínuo (RD) (A) e regime 77  
descontínuo alimentado (RDA)(B) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se  
diferentes massas de celulose

Figura 30. Atividade de endoglicanases durante cultivos em regime descontínuo (RD) (A) e 78  
regime descontínuo alimentado (RDA) (B) com *Penicillium echinulatum* S1M29,  
empregando-se diferentes massas de celulose

Figura 31. Atividade de xilanases durante cultivos em regime descontínuo (RD) (A) e 78  
regime descontínuo alimentado (RDA) (B) com *Penicillium echinulatum* S1M29,  
empregando-se diferentes massas de celulose



## RESUMO

As celulases e as xilanases são enzimas que hidrolisam a celulose e a xilana, respectivamente, contidas nos resíduos lignocelulósicos. A possibilidade de aplicar estas enzimas na produção de etanol vem sendo objeto de diversos estudos. No entanto, ainda não há uma tecnologia economicamente viável para a produção deste biocombustível a partir da biomassa lignocelulósica. Entre os microrganismos que apresentam altos títulos para estas enzimas, incluem-se linhagens de *Penicillium echinulatum*; porém, ainda faltam dados de sua fisiologia e estudos da produção de enzimas em biorreator. Neste trabalho, empregou-se a linhagem mutante celulolítica desreprimida S1M29 de *P. echinulatum* e o meio de cultivo foi composto por celulose, sacarose, solução de sais, Tween 80<sup>®</sup>, farelo trigo e farelo de soja. Avaliou-se o efeito de diferentes temperaturas e pHs na produção das enzimas. O efeito da concentração da celulose sobre as atividades enzimáticas foi avaliada em regime descontínuo (RD) e regime descontínuo alimentado (RDA). Verificou-se que a temperatura mais apropriada para a produção de celulases e xilanases é de 28°C e dentre os valores de pHs avaliados, o pH 6,0 apresentou a maior produção das enzimas. O aumento da concentração da celulose no RD proporcionou maiores atividades para endoglicanases, porém o mesmo não foi obtido para xilanases. Para FPA (*Filter Paper Activity*), aumentos proporcionais nas atividades foram obtidos somente com concentrações de até 3% de celulose em RD, condição que também proporcionou as maiores atividades de  $\beta$ -glicosidases. O RDA incrementou as atividades de FPA, endoglicanases e xilanases, mas não de  $\beta$ -glicosidases. Estes resultados contribuem para a otimização de processos e para a produção econômica de enzimas por *P. echinulatum*, visando o desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

**Palavras-chave:** celulases, xilanases, biorreator, *Penicillium echinulatum*.

## ABSTRACT

Cellulases and xylanases are enzymes that hydrolyze cellulose and xylan respectively, which are found in lignocellulosic residues. Although the applicability of these enzymes in the ethanol production has been the subject of several studies, an economically viable technology for the production of biofuel from lignocellulosic biomass is currently not available. Strains of *Penicillium echinulatum* are among the microorganisms that have high titers of these enzymes. However, data related to physiology and enzyme production in bioreactor for such strains are still missing. A cellulolytic mutant strain of *P. echinulatum* S1M29 and a culture medium composed of cellulose, sucrose, salt solution, *Tween 80*<sup>®</sup>, wheat bran and soybean meal were used in this study. The effect of different temperatures and pHs during the enzymes production was evaluated. The effect of cellulose concentration in the enzymatic activity was evaluated in batch cultivation (BC) and fed-batch cultivation (FBC). It was found that the appropriate temperature for the production of cellulases and xylanases is 28°C, while the higher enzyme production occurred at pH 6.0. The high cellulose concentration in BC provided the greatest activities for endoglucanases, but the same result was not obtained for xylanases. For Filter Paper Activity (FPA), proportional increases in activity were obtained only with concentrations up to 3% of cellulose in BC, which is also linked to the highest activities for  $\beta$ -glucosidases. FBC increased the activities of FPA, endoglucanases and xylanases, but it did not increase the  $\beta$ -glucosidases activities. Such results contribute towards the optimization of enzyme production using *P. echinulatum* and the development of economically viable technologies for the production of ethanol from lignocellulosic materials.

**Keywords:** cellulases, xylanases, bioreactor, *Penicillium echinulatum*.

## 1 INTRODUÇÃO

As celulasas e xilanases constituem complexos enzimáticos, produzidos e excretados principalmente por fungos e bactérias. Atualmente, há um grande interesse industrial nestas enzimas, devido a suas amplas aplicações na alimentação humana e animal, na indústria têxtil e nas indústrias de polpa e papel. Entretanto, a principal aplicação potencial dessas enzimas é na hidrólise da celulose e da xilana, que estão disponíveis em grandes quantidades nos resíduos lignocelulósicos da agricultura e nos resíduos sólidos urbanos e industriais. Os xaropes de glicose e xilose, obtidos a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica, poderiam ser utilizados para diferentes fins biotecnológicos, destacando-se a produção de etanol.

A possibilidade de substituir a gasolina em motores de combustão interna tem apontado o etanol como solução viável para atender a atual demanda energética e reduzir a emissão dos gases causadores do efeito estufa, visto que os carbonos do etanol são de origem fotossintética. Atualmente, as principais culturas utilizadas para a produção de etanol, como a cana-de-açúcar e o milho, competem com a produção de alimentos.

Neste contexto, a biomassa lignocelulósica apresenta enorme potencial para contribuir com esta tecnologia, devido à grande disponibilidade e baixo custo deste tipo de matéria-prima. A produção do etanol a partir dos resíduos lignocelulósicos pode aumentar consideravelmente a produção do combustível, sem aumentar a área cultivada. Além disso, a produção do etanol a partir dos resíduos lignocelulósicos poderia ser centralizada em diversas regiões do país, diminuindo os gastos com o transporte para a distribuição desse combustível. Porém, o alto custo de produção do complexo enzimático e a necessidade de pré-tratamento do material lignocelulósico limitam o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de etanol em escala industrial.

Entre os microrganismos mais estudados e utilizados para a produção de celulases, estão linhagens mutantes de *Trichoderma reesei*, cujos dados de produção estão disponíveis nos principais periódicos científicos da área biotecnológica. Na literatura, também são relatados microrganismos produtores de xilanases, sendo que linhagens de *Thermoascus aurantiacus* são as que mais se destacam devido às suas elevadas produções enzimáticas.

Outros microrganismos apresentam produção simultânea de celulases e xilanases, entre estes estão linhagens de *Penicillium echinulatum*. Mutantes selecionados são capazes de, em cultivo submerso, secretar celulases com atividade de papel filtro maior do que 2 UI/mL, empregando 1% de celulose como fonte de carbono e de secretar valores superiores a 30 FPU/massa seca em cultivo em estado sólido, usando bagaço de cana-de-açúcar. Adicionalmente, mutantes celulolíticos de *P. echinulatum* apresentam um complexo enzimático com estabilidade a 50°C, característica relevante para aplicação destas enzimas em hidrólise enzimática. O complexo também se destaca por apresentar uma proporção equilibrada de FPA e  $\beta$ -glicosidases, condição de grande importância para a hidrólise da celulose. A linhagem S1M29 de *P. echinulatum* é um mutante celulolítico que apresenta as maiores secreções enzimáticas para esta espécie.

Apesar da disponibilidade de mutantes de *P. echinulatum* com alta capacidade de secreção de celulases e xilanases em frascos mantidos sob agitação recíproca, ainda não foram alcançados títulos enzimáticos em biorreatores semelhantes aos obtidos para *T. reesei*. Além disso, as condições de produção das enzimas por *P. echinulatum* estão embasadas em dados descritos para outros fungos, como *T. reesei*.

Diversos autores já constataram que a produção de celulases e xilanases é influenciada por parâmetros como pH, temperatura, aeração e tipo de processo, sendo que o regime descontínuo alimentado proporciona maior produção enzimática que o regime descontínuo.

Por isso, é imprescindível a realização de estudos para conhecer a fisiologia do fungo e, assim, planejar ações que permitam otimizar processos de produção destas enzimas.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de celulasas e xilanases por *P. echinulatum*, linhagem S1M29, em processo submerso em biorreator com agitação mecânica, tendo como objetivos específicos:

- selecionar a temperatura mais apropriada para a produção de celulasas e xilanases em regime descontínuo;
- selecionar valores de pH que incrementam a produção de celulasas e xilanases em regime descontínuo;
- avaliar a produção de celulasas e xilanases em regime descontínuo em função da concentração inicial de celulose;
- avaliar a produção de celulasas e xilanases em regime descontínuo alimentado para a celulose.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Demanda energética

A demanda global por energia vem aumentando rapidamente, devido ao crescimento populacional, ao aumento nos padrões de vida e ao rápido desenvolvimento industrial nos países emergentes (Öhgren *et al.*, 2007). Este rápido desenvolvimento afeta a estabilidade dos ecossistemas, o clima global, bem como as reservas globais de petróleo, culminando em impactos ambientais e em aumento no preço do petróleo (Balat, 2011).

Entre as alternativas para atender a demanda por combustíveis e reduzir os gases causadores do efeito estufa, uma das mais promissoras é a utilização de etanol, que tem atraído a atenção mundial devido ao seu potencial como combustível alternativo (Takahashi *et al.*, 2000). O etanol é obtido a partir de um processo de fermentação pela qual os açúcares simples são convertidos neste combustível. As três principais fontes de biomassa de açúcares utilizados são: beterraba, cana-de-açúcar e milho (Öhgren *et al.*, 2007). No entanto, uma quarta fonte de açúcares, os resíduos lignocelulósicos, apresentam potencial para tornarem-se a fonte mais viável para atender a atual demanda energética, pois a matéria-prima é abundante, renovável e não é empregada na alimentação da população (Singhania *et al.*, 2010).

Existem várias vantagens de adicionar o etanol a gasolina, já que o etanol emite menores quantidades de monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e hidrocarbonetos quando comparado com a gasolina (Takahashi *et al.*, 2000). Além disso, visto que os carbonos do etanol são de origem fotossintética, estima-se que 10% de etanol acrescido a gasolina poderia reduzir a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de 3-6% (Singhania *et al.*, 2010).

Com a criação do PROÁLCOOL em 1975, resposta pioneira do Brasil à primeira crise mundial do petróleo, o etanol ganhou grande impulso. No entanto, sua integração definitiva na matriz energética brasileira ocorreu apenas em 2003, quando o Brasil introduziu os veículos com motor flexível (*flex fuel*), projetados para usar tanto etanol como gasolina em qualquer proporção (Rosa & Garcia, 2009). Desde o lançamento dos veículos *flex fuel* no Brasil, em 2003, o uso do etanol em substituição à gasolina evitou o lançamento de mais de 100 milhões de toneladas de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) à atmosfera (Raízen, 2011).

Apesar do Brasil ser um grande produtor global de etanol, sua produção não está sendo suficiente para atender a própria demanda. No início de 2011, o Brasil importou 400 milhões de litros de etanol dos Estados Unidos para abastecer o mercado. Enquanto que as vendas de veículos *flex fuel* cresceram 21,7% entre 2008 e 2010, a produção de etanol no Brasil entre a safra 2008/2009 e a atual (2011/2012) está estimada a cair mais de 12%, devido a problemas climáticos e baixos investimentos na renovação dos canaviais. Além disso, haverá uma redução de 11,2% de etanol para aumentar a produção de açúcar. Segundo a União da Indústria da Cana-de-Açúcar (Unica), 46,9% da cana-de-açúcar será destinada a açúcar em 2011, contra 44,9% na safra passada. Estima-se que a demanda de etanol para veículos neste ano será de 23 bilhões de litros e a previsão para a produção de etanol é de 26,9 bilhões de litros (Deere, 2011).

Diante deste cenário, comprova-se a importância de uma tecnologia de produção de etanol, que aproveite o bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos lignocelulósicos gerados no Brasil e no mundo. Uma tonelada de cana-de-açúcar produz 80 litros de etanol e 280 Kg de bagaço. Este bagaço, que é um dos maiores subprodutos lignocelulósicos agroindustriais no Brasil (Camassola & Dillon, 2010), apresenta um teor de 40 a 45% de celulose (Peng *et al.*, 2009). Se esse conteúdo de celulose fosse hidrolisado e fermentado, seria possível obter um



adicional de aproximadamente 56 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar, evidenciando a importância deste resíduo na produção de combustíveis (Carvalho, 2005).

O processo biológico para a conversão do material lignocelulósico a etanol requer três importantes etapas: (1) deslignificação - liberação da celulose e da hemicelulose que estão associadas à lignina; (2) hidrólise - despolimerização dos polímeros de carboidratos com liberação de açúcares livres, e; (3) fermentação - produção de etanol (Lee, 1997). A hidrólise dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) geralmente é realizada por tratamentos ácidos e/ou enzimáticos e a utilização de hexoses e pentoses, presentes no hidrolisado, é essencial para a produção econômica do etanol (Saha *et al.*, 2005). Portanto, microrganismos que são capazes de fermentar glicose e xilose simultaneamente são necessários para uma eficiente bioconversão da biomassa em etanol (Martín *et al.*, 2002).

## **2.2 Biomassa vegetal**

A fotossíntese produz cerca de 200 bilhões de toneladas de biomassa vegetal por ano (Klass (1998); Botella *et al.* (2009)), sendo o complexo lignocelulósico o principal componente da biomassa vegetal e o recurso renovável mais abundante na superfície da Terra. Grandes quantidades desse complexo estão disponíveis para exploração como fontes de combustíveis (etanol), reserva de alimentos, produtos químicos e nutrição de herbívoros (Broda, 1992).

Estima-se que 50% de toda biomassa disponível no mundo seja composta pelo complexo lignocelulósico, o que comprova seu potencial como matéria-prima para a produção do etanol (Singhania *et al.*, 2010). Entre as fontes de biomassa lignocelulósica disponíveis para a produção do etanol, estão os resíduos agrícolas - como palhas de milho, de arroz e de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho -, os resíduos florestais - como a madeira -, os resíduos industriais - como a celulose do processamento de papel -, os resíduos orgânicos urbanos, e culturas energéticas - como gramíneas (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

A celulose, a hemicelulose e a lignina são os três maiores constituintes das paredes celulares dos vegetais, que são unidos entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Estes três componentes das paredes celulares vegetais constituem 97-99% da massa seca dos lignocelulósicos. Entretanto, as proporções podem ser distintas em diferentes materiais lignocelulósicos, dependendo do vegetal. Outros componentes poliméricos como o amido e a pectina estão presentes em menores quantidades (Martín *et al.*, 2007). Na Figura 1, observa-se um esquema da distribuição da lignina, hemicelulose e celulose de um tecido vegetal.

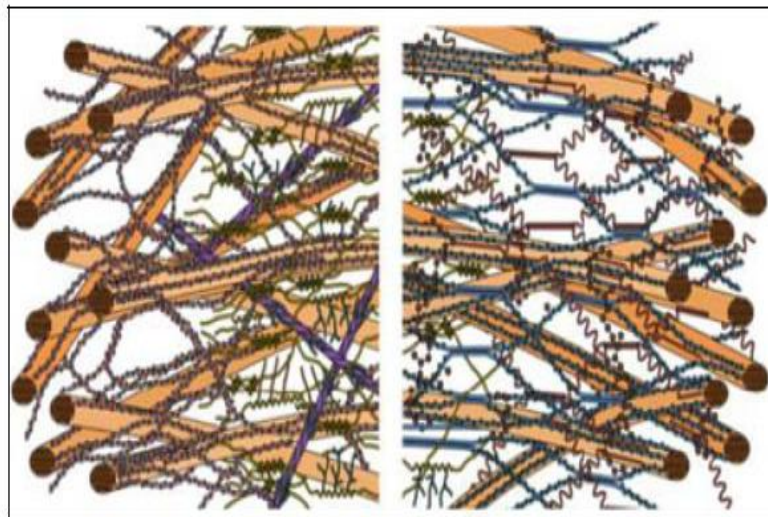


Figura 1. Ilustração da distribuição da lignina, hemicelulose e celulose em um tecido vegetal, adaptada de Buchanan *et al.* (2000). Os cilindros representam as microfibrilas de celulose, a estrutura associada diretamente na fibra da celulose representa a hemicelulose e a lignina é o polímero que interliga a celulose e a hemicelulose.

A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% da sua massa seca. Ela é uma macromolécula aromática de elevada massa molecular, formada pela polimerização de unidades fenólicas e alcoóis (Figura 2), que atua como uma estrutura incrustante, conferindo rigidez às paredes celulares vegetais e resistência ao ataque dos microrganismos. Em função dessa propriedade, essa macromolécula é de difícil degradação, quando comparada aos

polissacarídeos, permanecendo nos solos como componente recalcitrante do húmus (Silva & Gomes, 2004).

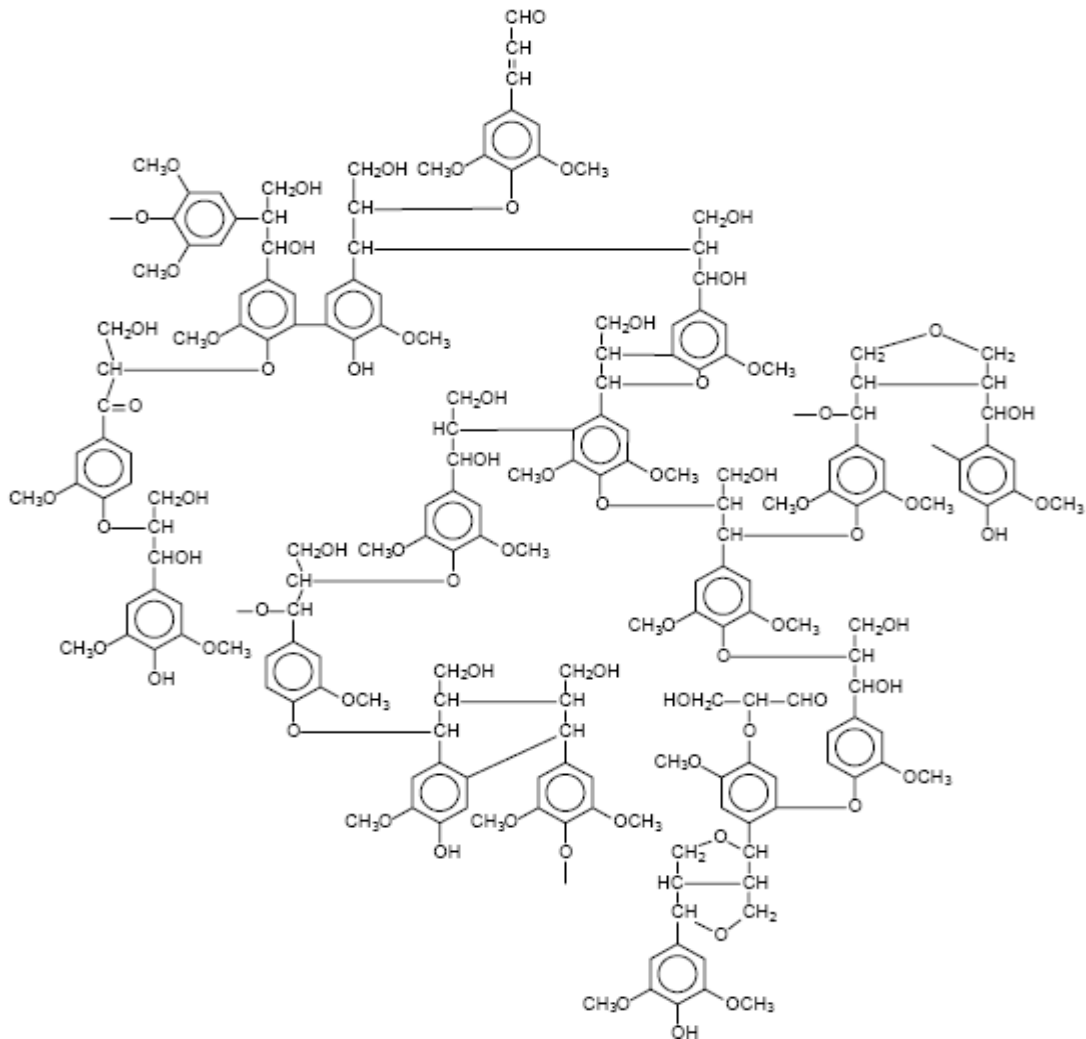


Figura 2. Estrutura da lignina de *Fagus sp.* (Fengel & Wegener, 1989).

Estudos de degradação da lignina são de extrema importância, pois ela permanece sempre associada à celulose e à hemicelulose nos vegetais, dificultando o aproveitamento dessas últimas. Além disso, em processos fermentativos com matéria lignocelulósica, os fenóis, ou pelo menos alguns deles, são indesejáveis, pois alguns são inibidores de crescimento microbiano, a partir de concentrações maiores que 0,5 mg/L (Icidca-Geplacea-Pnud, 1990).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de baixa massa molecular, compreendendo 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, e tem como função ligar as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Este polissacarídeo é estruturalmente mais parecido com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação (Ramos, 2003).

Os componentes hemicelulósicos da parede celular vegetal incluem uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas e geralmente são classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição (Beg *et al.*, 2001). Entre os polímeros constituintes estão as pentoses (xilose, ramnose, arabinose), as hexoses (manose, glicose, galactose) e os açúcares ácidos (ácidos urônicos). Estes açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Estas ligações entre os monômeros da hemicelulose são facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas (Figura 3), galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas e galacto-arabino-glucurono-xilana são diferentes denominações das hemiceluloses em função das respectivas estruturas químicas (Biely, 1985).

As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem em heteropolissacarídeos formados por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo  $\beta$ -1,3. Além de xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glucurônico, grupo acetil e o grupo 4-O-metil-éter (Saha, 2003). A xilana se encontra localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose (Beg *et al.*, 2001).

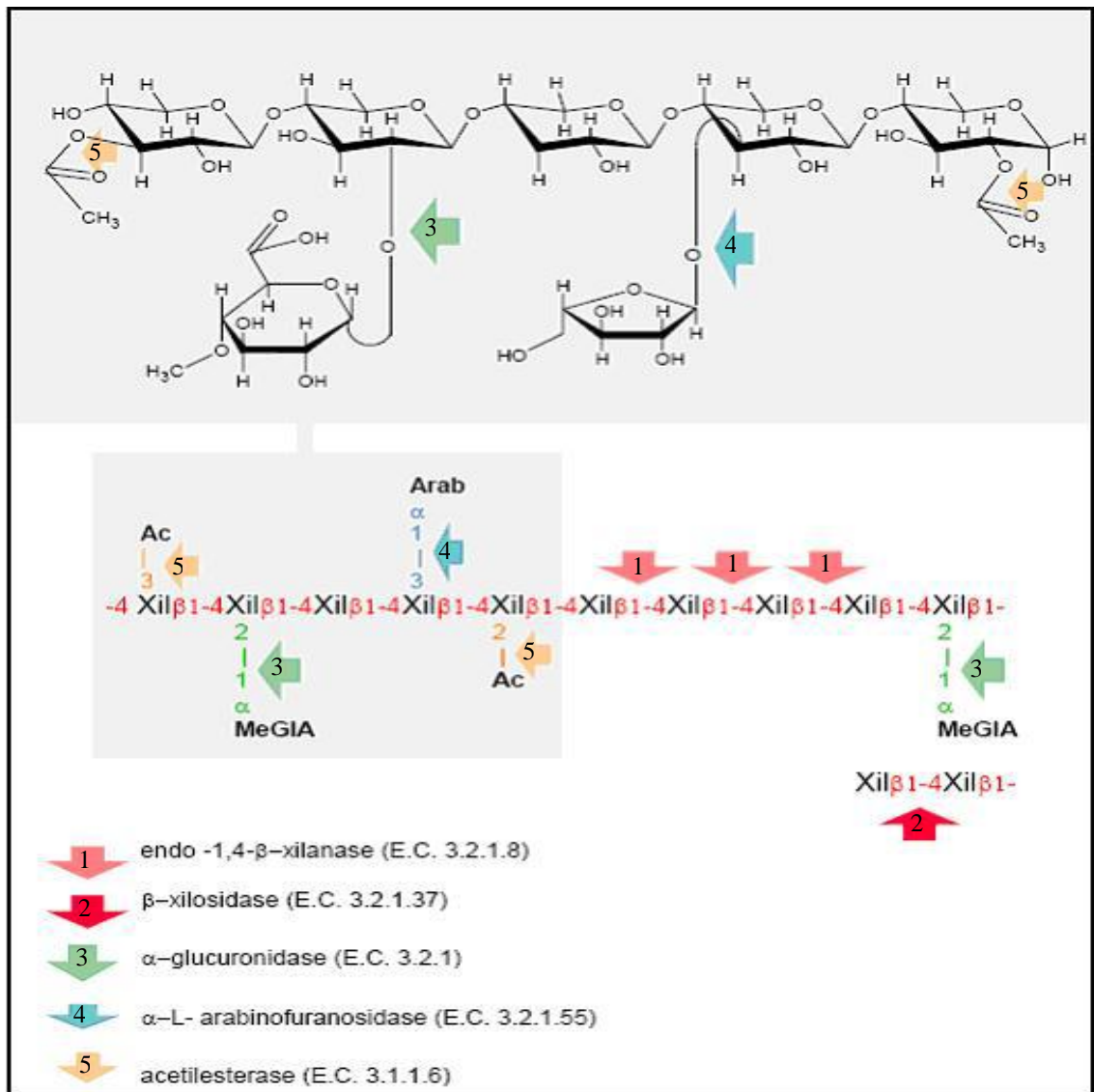


Figura 3. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac: grupo acetil; Arab: L-arabinofuranose; MeGIA: ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil: D-xilose (Biely, 1985).

A celulose é o principal componente das fibras vegetais e é encontrada tanto em vegetais primitivos quando em plantas evoluídas, representando entre 30 e 60% da sua massa seca total. Trata-se de um homopolissacarídeo linear formado por unidades de  $\beta$ -glicopiranosose (D-glicose) unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 e apresenta elevada massa molar

( $1,5 \cdot 10^6$  M). As longas cadeias de celulose são estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das moléculas adjacentes (Fan *et al.*, 1980).

Apesar de a molécula de celulose ser hidrofílica, é impossível que a água penetre no interior da celulose cristalina à temperatura ambiente. As regiões de celulose cristalina, região mais compacta devido às pontes de hidrogênio e de difícil degradação enzimática, são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas (Figura 4). As regiões de celulose amorfa apresentam baixa resistência aos ataques químicos e biológicos, sendo, portanto, pontos de degradação (Fan *et al.*, 1980).

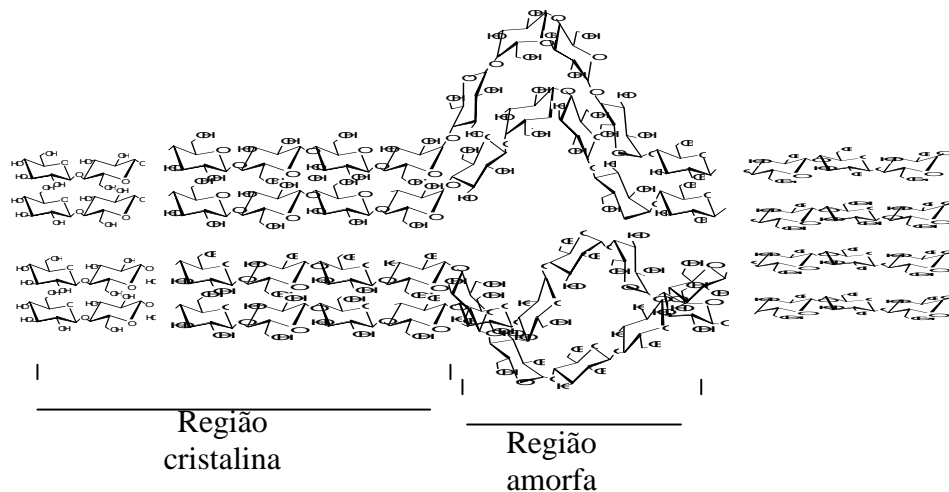


Figura 4. Estrutura da celulose evidenciando as regiões cristalinas e amorfas (Fonte: Dillon, 2004).

Devido à difícil degradação da lignina e da cristalinidade da celulose, é imprescindível o uso de pré-tratamentos no material lignocelulósico, tendo o intuito de remover a lignina e reduzir a organização da estrutura celulósica. Os pré-tratamentos podem ser classificados em químicos - que empregam, por exemplo, ácido sulfúrico e/ou hidróxido de sódio -, físicos - como a explosão a vapor e a moagem - e, biológicos - tratamentos com fungos e bactérias que promovem a degradação seletiva da lignina e ou da hemicelulose (Eriksson *et al.*, 1980; Rivers & Emmert, 1987; Sawada *et al.*, 1995; Ramos, 2003).

### 2.3 Celulases

As celulases receberam maior atenção durante a Segunda Guerra Mundial, quando militares norte-americanos observaram um excessivo desgaste de roupas, fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos nas selvas do Pacífico Sul, em 1944. Amostras de microrganismos suspeitos de serem os responsáveis pelo prejuízo foram coletadas e levadas ao laboratório de pesquisas do exército, em Natick, Massachusetts. De milhares de amostras, uma, recolhida na Nova Guiné, mostrou conter um fungo – *Trichoderma viride* (atualmente denominado *Trichoderma reesei*, em homenagem ao seu descobridor, Elwyn Reese) – capaz de converter a celulose em seus monômeros (Bio & Farma, 2009).

O complexo enzimático das celulases constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas, encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, plantas e de alguns animais como gastrópodes e insetos xilófagos. Estas enzimas são glicoproteínas de massa molecular entre 20 e 250 kDa, capazes de romper ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 de microfibrilas da celulose, liberando moléculas de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Kubicek *et al.*, 1993).

As técnicas de separação de moléculas e os estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que esse complexo enzimático é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas: as endo- $\beta$ -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra da celulose; as exo- $\beta$ -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e as  $\beta$ -1,4-glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). Na Figura 5, pode-se visualizar o modo de ação sinérgica do complexo enzimático na hidrólise da celulose.

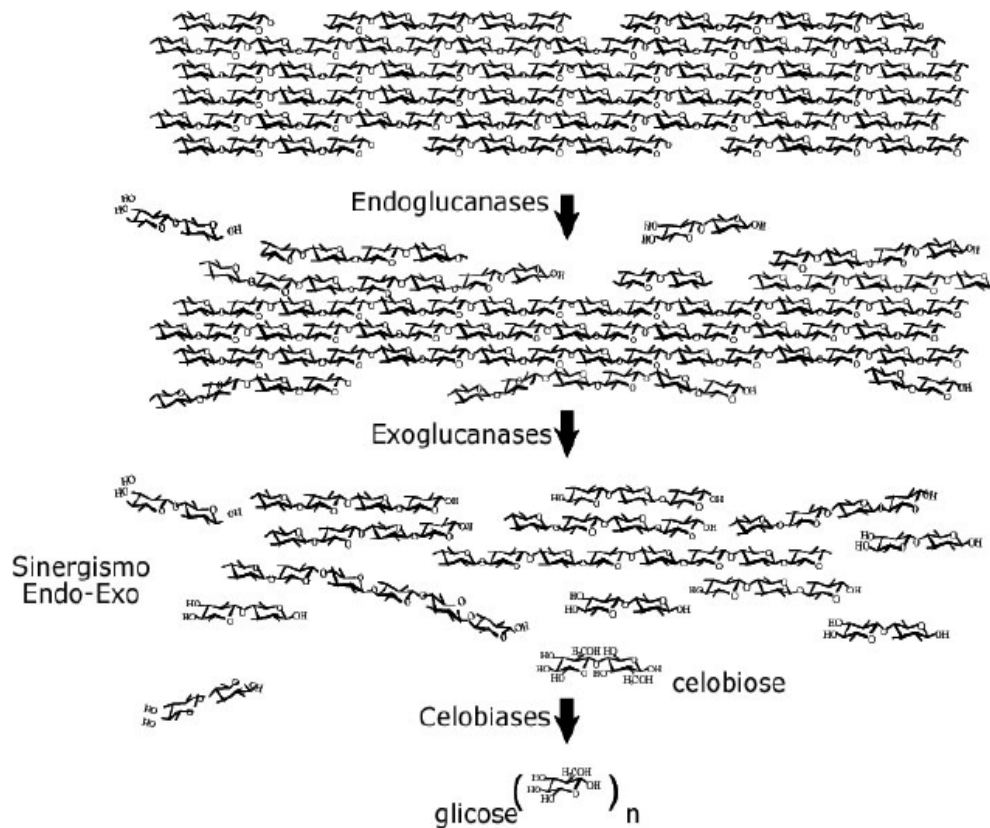


Figura 5. Mecanismo de ação do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (Martins, 2005).

As endoglucanases hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). Fontes de celulose com elevado grau de cristalinidade são menos hidrolisáveis devido ao maior grau de organização molecular que apresentam. Estas enzimas apresentam um sítio ativo que possibilita a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose, reduzindo o seu grau de polimerização (Figura 6). As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (Rabinovich *et al.*, 2002; Martins, 2005).



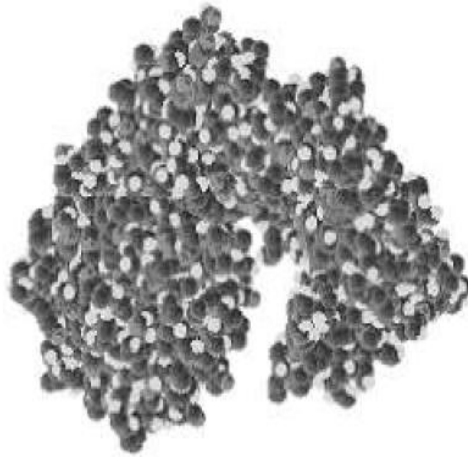


Figura 6. Sítio ativo das endoglicanases que permite acesso ao longo da cadeia de celulose (Martins, 2005).

As celobioidrolases atuam sobre a celulose cristalina (*Avicel*<sup>®</sup>), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. O sítio ativo destas enzimas apresenta a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celobiose. O domínio de ligação ao substrato (DLS) é constituído por aproximadamente 40 unidades de aminoácidos e possui a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo. A adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina (TYR) presentes no DLS com as unidades de glicopirranose presentes na superfície da celulose (Divne *et al.*, 1994) (Figura 7).

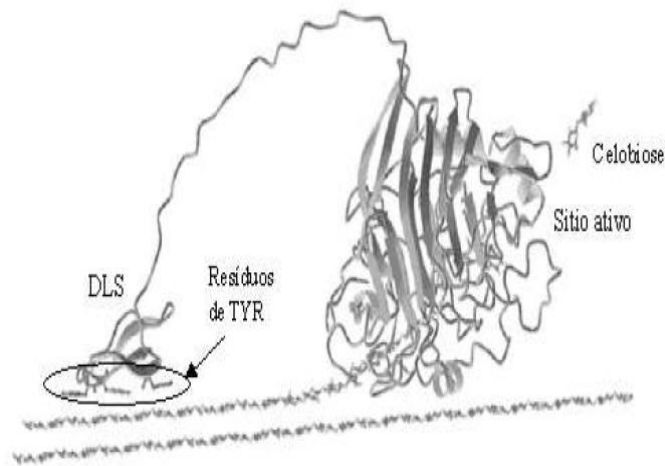


Figura 7. Modo de ação progressiva das celobioidrolases I (CBH I) de *T. reesei* (Divne *et al.*, 1994).

Formalmente, as  $\beta$ -glicosidases não são consideradas celulases legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose, pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobioidrolases (Medve, 1997).

As celulases, assim como as demais enzimas de hidrólise, são induzidas, havendo a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek *et al.*, 1993).

Os modelos do mecanismo de ação de celulases na hidrólise do enlace glicosídico são provenientes de estudos de cinética enzimática, com ou sem a presença de inibidores, da análise de raio-X, da cristalografia do complexo enzima-substrato e de alterações na hidrólise por modificação na estrutura primária das enzimas (Dillon, 2004).

Estudos já mostraram que as celulases, além de desencadear hidrólises, devem romper pontes de hidrogênio, que ligam microfibrilas, nas regiões cristalinas da celulose (Dillon, 2004). O mecanismo de hidrólise das celulases ocorre por catálise ácido-base, com reversão ou retenção da configuração anomérica do monossacarídeo. Por este mecanismo,

inicialmente ocorre um ataque eletrofílico de um grupo carboxila pertencente a um resíduo de aminoácido ácido, sendo o próton do grupo carboxila o responsável pela protonação de um oxigênio da ligação glicosídica, gerando um íon *carbanium*. Quase que simultaneamente, outro grupo carboxila de um segundo aminoácido ácido, no lado oposto da ligação glicosídica, produz um ataque nucleofílico no íon *carbanium*, resultando em um éster glicosídico intermediário. Com a formação deste, desencadeia-se a desorganização do acetal, resultando na divisão de um polímero ou de um oligossacarídeo em dois componentes, o que resulta na liberação da hidroxila de um carbono 4. Posteriormente, o éster intermediário se desfaz ao associar-se com uma hidroxila de uma molécula de água e desta nova associação é gerado um hemiacetal. O próprio próton liberado pela água dissociada pode ser disponibilizado para a base conjugada pertencente ao resíduo responsável pelo ataque eletrofílico (Heightman & Vasella, 1999).

Durante a fase de crescimento ativo de *T. reesei* em presença de celulose, as celulasas permanecem ligadas ao micélio, sendo detectadas no meio de cultivo apenas na fase estacionária. Entretanto, quando o crescimento é realizado em celobiose, as celulasas são detectadas imediatamente após o início do cultivo. As  $\beta$ -glicosidases, no entanto, são detectadas somente no final do processo de produção enzimática, quando ocorre lise celular (Vaehri *et al.*, 1979).

Ao caracterizar as celulasas de *P. echinulatum*, Camassola *et al.* (2004) verificaram que a atividade de FPA é maior em pH 4,8, numa faixa de temperatura entre 50 e 60°C. Entretanto, a atividade de  $\beta$ -glicosidases apresentou maior atividade em pH entre 4,0 e 4,5, sendo a temperatura ideal entre 55 e 60°C. Este trabalho também mostrou que as celulasas de *P. echinulatum* apresentam estabilidade térmica a 50°C até 48 horas.

## 2.4 Aplicações das celulases

O interesse em utilizar as celulases na indústria foi despertado na década de 1960, quando se descobriu que preparações de enzimas extracelulares do fungo *T. reesei* eram responsáveis pela ação hidrolítica. A ideia de aproveitar estas enzimas na conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energéticos surgiu entre 1973 e 1979 (Bio & Farma, 2009).

Atualmente, as celulases vêm sendo empregadas na extração de óleos, essências e pigmentos vegetais, inclusão na composição de rações animais, produtos estimuladores de silagens, detergentes de uso doméstico, na produção de sucos, adjuvante para o malte da cerveja, componente farmacológico e na produção de protoplastos vegetais para a manipulação genética (Esterbauer *et al.*, 1991; Bhat, 2000; Han & He, 2010). Também podem ser empregadas na produção de xaropes de glicose que podem ser utilizados para diferentes fins biotecnológicos, destacando-se a produção de etanol por fermentação leveduriana (Kubicek *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2007).

A aplicação potencial das celulases e das  $\beta$ -glicosidases na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica vem sendo intensamente estudada e, apesar dos esforços, ainda não foi produzido um complexo enzimático econômico e eficiente, tratando-se de assunto amplamente conhecido e discutido no meio técnico-científico. A exigência de grande quantidade de enzimas no processo de hidrólise e o elevado custo de obtenção do complexo enzimático, que representa cerca de 40% do custo total da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, limita a produção do combustível em larga escala (Balat, 2011; Deswal *et al.*, 2011).

Outra aplicação tecnológica das celulases que merece destaque é a bioestonagem que emprega as enzimas em tecidos e roupas de algodão tingidas com índigo, como os famosos *blue jeans*, proporcionando maciez e um aspecto desbotado no tecido. Nessa técnica emprega-

se o complexo de celulases ao invés de pedra pomes em máquinas de lavar industriais para tratar os tecidos (Bhat, 2000).

As celulases se destacam na produção industrial de enzimas em todo o mundo, sendo a terceira maior em termos de volume de dólares, devido às suas amplas aplicações. No entanto, as celulases podem se tornar o maior volume de enzima industrial caso o etanol obtido de biomassa lignocelulósica por via enzimática venha a tornar-se um importante combustível (Singhania *et al.*, 2010).

## 2.5 Mecanismos de indução de celulases fúngicas

As celulases fúngicas são produzidas apenas na presença de celulose (Mandels & Reese, 1957). Entretanto, a celulose não induz diretamente a produção das enzimas, por ser um açúcar insolúvel. A indução só é possível a partir da ação de celulases basais, que degradam a celulose a celo-oligossacarídeos solúveis. Estes, por sua vez, conseguem entrar na célula fúngica desencadeando a indução (Gong & Tsao, 1979).

A celobiose é o menor celo-oligossacarídeo com ligações  $\beta$ -1,4 e sua capacidade de induzir as celulases já foi verificada por vários pesquisadores (Eberhart *et al.*, 1977; Rho *et al.*, 1982). A sofrorose, dissacarídeo de glicose com ligações  $\beta$ -1,2, pode induzir 2500 vezes mais a expressão das celulases que a celobiose em *T. reesei* (Mandels *et al.*, 1962). A gentiobiose, dissacarídeo de glicose com ligações  $\beta$ -1,6, induz 50 vezes mais celulases em *Penicillium purpurogenum* (Kurasawa *et al.*, 1992); entretanto, tal indução só é possível na presença de um inibidor de  $\beta$ -glicosidases (Niwa *et al.*, 1970).

A celobiose é um indutor encontrado na maioria dos fungos e provém da hidrólise da celulose por celulases constitutivas (Gong & Tsao, 1979). No entanto, a sofrorose e a gentiobiose não compõem a celulose; são açúcares raros na natureza e por isso devem ser formados por um processo conhecido como transglicosilação. Neste processo, as  $\beta$ -

glicosidases convertem celo-oligossarídeos em sofrorse ou gentiobiose (Kurasawa *et al.*, 1992; Vaheri *et al.*, 1979).

Um modelo de indução proposto para celulasas de *P. purpurogenum* pode ser observado na Figura 8. No passo 1, celulasas basais degradam a celulose em celo-oligossacarídeos e glicose. Em seguida, no passo 2, os dissacarídeos entram na célula e a glicose é assimilada como fonte de carbono. A  $\beta$ -glicosidase intracelular converte os celo-oligossacarídeos em gentiobiose e mais glicose. No passo 3, a gentiobiose induz as celulasas e estas são secretadas para fora da célula. Por fim, no passo 4, as celulasas secretadas degradam mais celulose em celo-oligossacarídeos e glicose, dando continuidade ao ciclo até que a celulose seja esgotada (Suto & Tomita, 2001).

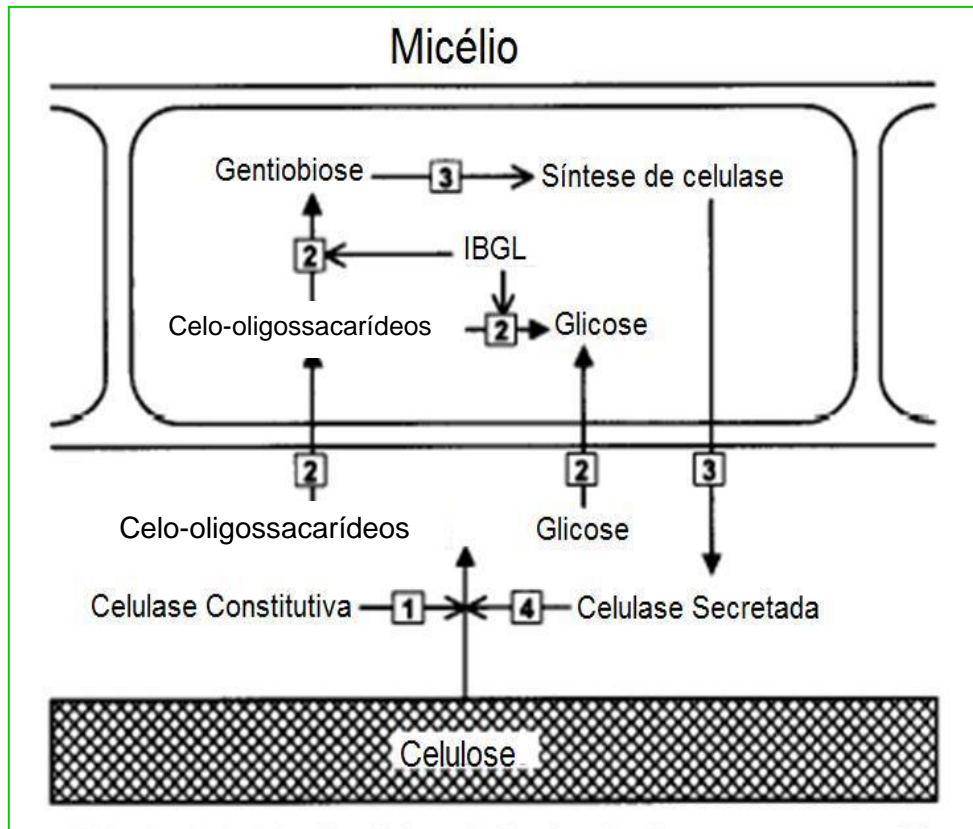


Figura 8. Modelo de indução de celulasas em *P. purpurogenum*. Os números de 1 a 4 correspondem aos processos de indução. Abreviação: IBGL:  $\beta$ -glicosidase intracelular (Suto & Tomita, 2001).

## 2.6 Xilanases

As xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). Apresentam massa molecular entre 8 a 145 kDa. As hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente, xilana) formados por diferentes resíduos de açúcares; portanto, sua completa degradação necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais específicas (Coughlan & Hazlewood, 1993).

A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase (EC 3.2.1.8), que cliva aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana, produzindo principalmente oligossacarídeos de xilose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Em geral, as bactérias produzem duas xilanases, uma ácida, com elevada massa molecular, e outra básica, com baixa massa molecular. Entretanto, esta relação não é observada em fungos, em que xilanases com menores massas moleculares são mais comuns (Camassola, 2007).

As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Fungos filamentosos produtores de xilanases são particularmente interessantes, uma vez que secretam maiores quantidades de enzima em relação a bactérias e leveduras. Ainda, as xilanases fúngicas são produzidas associadas às celulasas (Dekker & Richards, 1976; Ball & McCarthy, 1989; Sunna & Antranikian, 1997; Liu *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001).

A reação de hidrólise catalisada pelas xilanases, assim como pelas celulasas, ocorre por meio de um mecanismo envolvendo dois resíduos. O primeiro resíduo atua como um catalisador genérico e protona o oxigênio da ligação glicosídica. O segundo resíduo interage com o *oxycarbanium* intermediário ou promove a formação de um íon  $\text{OH}_3$  da molécula de água. A reação envolve duas etapas em que ocorre a transferência do próton e de um átomo de oxigênio na posição equatorial no centro anomérico (Sinnot, 1990).

## 2.7 Aplicações das xilanases

As endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases constituem um grupo de enzimas com aplicações industriais, particularmente na indústria de alimentos para animais, mas também são utilizadas nas indústrias de polpa e papel (biobranqueamento) e processamento de alimentos (Xiong *et al.*, 2005). As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por fibras. Isto resulta na diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2005). Também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999).

O interesse industrial pelas hemicelulases e por fungos produtores de xilanases extracelulares vem crescendo nas últimas décadas, principalmente nas indústrias químicas e farmacêuticas, na produção de biopolímeros catiônicos, hidrogéis e derivados de éster alquil de cadeias longas (Sun *et al.*, 2004).

Na indústria de polpa e papel, as xilanases são empregadas em formulações livres de celulases, para hidrolisar a xilana presente na polpa e facilitar a extração da lignina. Ainda, a utilização destas enzimas reduz o consumo de reagentes tóxicos (cloro e peróxido de hidrogênio) requeridos no processo de branqueamento da polpa (Madlala *et al.*, 2001), além de possibilitar a obtenção de um papel com maior resistência (Damaso *et al.*, 2002).

No processamento de alimentos, as xilanases são empregadas na clarificação de sucos e vinhos, em processos de maceração de vegetais, na extração de aromas e pigmentos, óleos vegetais e amido (Biely, 1985; McCleary, 1986; Bhat, 2000). São empregadas ainda na indústria de panificação para aumentar a qualidade dos produtos, melhorando a qualidade da massa de pão, deixando-a mais flexível e permitindo a obtenção de um produto com maior volume (Collins *et al.*, 2006). Ainda, segundo Kulkarni *et al.* (1999), as xilanases serão aplicadas, futuramente, na conversão de biomassa renovável em combustíveis.



## 2.8 Produção de Enzimas

A produção de celulases e xilanases é influenciada por diversos fatores que incluem a concentração e qualidade do substrato, condições de crescimento, aeração, temperatura e pH (Mandels, 1975; Bailey & Tahvanainen, 2003; Haki & Rakshit, 2003). Outro fator importante para obterem-se altos níveis de enzimas é o emprego de linhagens geneticamente modificadas que apresentem desrepressão aos açúcares (Dillon, 2004).

### 2.8.1 Fonte de carbono e indutores

As celulases são enzimas induzidas e várias fontes de carbono vêm sendo estudadas para identificar os substratos de maior efeito indutor (Mandels & Reese, 1957; Mandels, 1975; Muthuvelayudham *et al.*, 2005). A celulose é reconhecida como o melhor indutor do complexo enzimático das celulases, sendo a lactose e a sofrose os outros indutores mais importantes (Mandels, 1975; Mandels *et al.*, 1962; Harikrishna *et al.*, 2000). Ryu & Mandels (1980) constataram que a indução do complexo enzimático por celulose, celobiose e lactose só é possível quando estes substratos estão em alta concentração no meio de cultivo.

A natureza do substrato é muito importante para o crescimento do microrganismo celulolítico, pois este pode constituir-se tanto em fonte de carbono como em fonte de energia. Mandels & Weber (1969) estudaram a indução de celulases em *T. viride*, cultivando o fungo em vários substratos. Estes autores observaram que fontes insolúveis de celulose - como *Solka Floc*<sup>®</sup> (polpa de celulose), algodão e papel filtro - são todas indutoras de celulases, como também os dissacarídeos solúveis, lactose e celobiose. Entretanto, a sofrose (2-0-β-D-glicopiranosil-D-glicose) é um dissacarídeo indutor que proporciona elevada atividade celulolítica, enquanto o amido, a glicose e o glicerol não atuam como indutores dessas enzimas.

Joglekar & Karanth (1984) verificaram que fontes naturais de celulose de menor custo, como o algodão e o bagaço de cevada, quando tratados com álcalis, aumentam a capacidade indutora de celulasas. Acredita-se que os oligossacarídeos formados durante a hidrólise de uma fonte de celulose desempenham um papel importante na indução natural das celulasas (Huang, 1975; Ladisch *et al.*, 1981). Lo *et al.* (2009) conduziram experimentos em cultura contínua, empregando hidrolisados obtidos de serragem de madeira tratada com ácido sulfúrico. Os mesmos autores verificaram que os oligossacarídeos obtidos do tratamento ácido induzem mais celulasas que a lactose.

Cultivos para a produção de celulasas podem alcançar títulos maiores com o aumento na concentração de celulose até o nível de 6% (m/v), quando o pH do cultivo é controlado (Sternberg & Dorval, 1979). Hendy *et al.* (1984) verificaram também que, aumentando-se a concentração de celulose até 5% (m/v) de *Solka Floc*<sup>®</sup>, observa-se um aumento proporcional nos títulos enzimáticos.

Quando altas concentrações de celulose são requeridas, a viscosidade do meio aumenta, gerando uma situação que dificulta a transferência de oxigênio, resultando em diminuição do crescimento. Para amenizar o problema, fontes solúveis que não desencadeiam repressão catabólica são importantes. Nesta perspectiva, o soro de leite, quando utilizado em culturas contínuas de *T. reesei* MCG-80, induziu títulos de FPA de 1,29 UI/mL (Allen & Andreotti, 1982). Outro meio empregado com sucesso para a produção de celulasas de *T. reesei* CL-847 contém 5% (m/v) de lactose e apenas 0,5% (m/v) de *Solka Floc*<sup>®</sup>. Esse meio apresenta menor viscosidade e baixos teores de sólidos insolúveis (El-Hawary & Mostafa, 2001).

Sehnen *et al.* (2006) analisaram a produção de celulasas por *P. echinulatum* em meios de cultura contendo diferentes concentrações de lactose e celulose, constatando que cultivos contendo apenas lactose apresentavam baixas atividades de FPA (0,1 UI/mL). Entretanto, os

cultivos com celulose e lactose associados e os contendo apenas celulose apresentaram atividades enzimáticas de FPA semelhantes (1,5 UI/mL), permitindo uma redução de até 75% da concentração de celulose. Para  $\beta$ -glicosidases, os autores verificaram o contrário do observado para FPA; ou seja, os meios com apenas lactose ou com concentração maior de lactose apresentaram os maiores títulos enzimáticos de  $\beta$ -glicosidases, sugerindo que a lactose é indutora para esta enzima em *P. echinulatum*.

Dillon *et al.* (2011) verificaram que a produção de celulases por *P. echinulatum*, linhagem S1M29 não é inibida quando o meio de cultivo apresenta na sua composição, além de celulose, sacarose como fonte de carbono. O trabalho também mostrou que um meio formulado com apenas 0,5% (m/v) de sacarose permite obter um complexo celulolítico favorável para a hidrólise da celulose, com maiores níveis de FPA e endoglicanases, quando comparado a um meio de 1% (m/v) de sacarose. No entanto, o meio com maior quantidade de sacarose (1% (m/v)) proporcionou maiores atividades de  $\beta$ -glicosidases.

Meios de crescimento de *T. reesei*, com concentrações de glicose acima de 0,1% (m/v), inibem a secreção de celulases, por repressão catabólica (Abrahão-Neto, 1995). No entanto, Domingues *et al.* (2001) verificaram que concentração de glicose entre 0,04 e 0,06% (m/v) presentes no meio de cultivo, são suficientes para inibir as celulases.

A repressão catabólica também pode ocorrer pela celobiose, dissacarídeo produto da degradação da celulose. Zaldivar *et al.* (2001) indicaram claramente que o complexo celulolítico de *T. reesei* é deficiente em celobiasas, o que causa acumulação da celobiose e posterior limitação da síntese e atividade enzimática pela repressão pelo produto.

Na Tabela 1, observa-se a produção de celulases por diferentes microrganismos, empregando diferentes substratos. Os dados da tabela foram todos obtidos em cultivos submersos, empregando biorreatores com agitação mecânica e ou frascos mantidos sob agitação.

Tabela 1. Comparação na produção de celulases empregando diferentes microrganismos e substratos.

Microrganismo	Substrato	Magnitude	FPA (UI/mL)	Referência
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Palha de arroz	Frascos	10,4	Hideno <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Palha de trigo	Frascos	3,2	Singh <i>et al.</i> (2009)
<i>Neurospora crassa</i>	Palha de trigo	Frascos	1,33	Romero <i>et al.</i> (1999)
<i>Penicillium brasilianum</i>	<i>Solka Floc 200</i> <sup>®</sup> (celulose)	Biorreator	0,75	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de trigo	Frascos	1,72	Dutta <i>et al.</i> (2008)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E</i> <sup>®</sup> (celulose)	Frascos	2,0	Dillon <i>et al.</i> (2011)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,55	Adsul <i>et al.</i> (2004)
<i>Penicillium occitanis</i>	Polpa de papel	Biorreator	23,0	Belghith <i>et al.</i> (2001)
<i>Penicillium persicinum</i>	<i>Solka Floc 200</i> <sup>®</sup> (celulose)	Biorreator	0,80	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium pinophilum</i>	<i>Solka Floc 200</i> <sup>®</sup> (celulose)	Biorreator	0,28	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Salgueiro tratado a vapor	Biorreator	2,80	Reczey <i>et al.</i> (1996)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc 200</i> <sup>®</sup> (celulose)	Biorreator	4,65	Velkovska <i>et al.</i> (1997)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Lactose/glicose	Biorreator	4,50	Domingues <i>et al.</i> (2001)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc 200</i> <sup>®</sup> (celulose)	Frascos	1,50	Juhász <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Esterco bovino	Frascos	1,72	Wen <i>et al.</i> (2005)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Resíduos de papelão	Biorreator	2,27	Szijarto <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Resíduo fermentação milho	Biorreator	1,90	Ximenes <i>et al.</i> (2007)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Palha de arroz	Frascos	1,07	Sun <i>et al.</i> (2008)
<i>T. reesei</i> ZU-02	Resíduo sabugo de milho	Biorreator	5,48	Liming & Xueliang (2004)
<i>Trichoderma viride</i>	Celulose	Frascos	4,95	Mandels <i>et al.</i> (1971)
<i>T. viride</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,88	Adsul <i>et al.</i> (2004)

### 2.8.2 Fontes de nitrogênio

A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados. A amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, é reprimida a assimilação de outras fontes nitrogênio como nitrato, aminoácido e proteína. Os aminoácidos e pequenos peptídeos obtidos de hidrolisados de proteínas (peptonas) podem ser transportados

para dentro da célula. Peptídeos grandes e proteínas precisam, antes, ser hidrolisados por proteinases (Carlile & Watkinson, 1997).

A fonte de nitrogênio disponível apresenta um papel importante na secreção de celulases, e as respostas variam de acordo com o microrganismo e a fonte. *T. reesei* cresce em sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), fosfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e amônia (NH<sub>3</sub>), mas não utiliza nitrato. Fontes de aminoácidos, como a peptona, vêm sendo empregadas desde os primeiros trabalhos com *T. reesei* nos anos 60, em quantidades que correspondem a 1/10 da concentração de celulose (Mandels & Weber, 1969). Dillon *et al.* (1999) verificaram que a peptona pode ser substituída por farelo de soja, de custo inferior, para *P. echinulatum*.

Para a linhagem mutante NTGIII/6 de *Penicillium pinophilum*, Brown *et al.* (1987) verificaram que sólidos da água de maceração de milho, quando adicionados à palha de cevada moída, proporcionaram secreções de celulases superiores em relação à ureia, NaNO<sub>3</sub>, caseína hidrolisada, proteose peptona, extrato de levedura, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Estudos têm mostrado que nitratos podem ser utilizados como fonte de nitrogênio para *Penicillium occitanis* (Ellouz-Chabouni *et al.*, 1995). Dillon *et al.* (1999) também verificaram que nitratos, como o nitrato de potássio, podem ser empregados por *P. echinulatum* e que cultivos que empregam nitrato de potássio, não apresentam uma queda brusca no pH, como constatado em cultivos com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mesmo quando concentrações mais altas de celulose são utilizadas.

O farelo de trigo também apresenta alta eficiência para a produção de enzimas, pois trata-se de um substrato que contém nutrientes suficientes e capazes de permanecer livres mesmo em elevadas umidades, permitindo assim maior superfície para que os microrganismos absorvam nutrientes e desenvolvam-se. Ainda, a composição do farelo de trigo indica que este material, quando hidrolisado, contém consideráveis quantidades de açúcares solúveis, tais com glicose (42,5%), xilose (15,4%), arabinose (3,1%) e galactose

(2,7%) que são requeridos para multiplicação dos microrganismos. Além disso, possui hemicelulose (45%) capaz de induzir a produção de enzimas e fontes de nitrogênio orgânico (23%), que são essenciais para a formação de proteínas (Archana & Satyanarana, 1997).

O *Prodex*<sup>®</sup> é um extrato de levedura bruto de baixo custo, sendo utilizado como fonte de vitaminas, em substituição ao extrato de levedura purificado. Estudos de produção de celulases e xilanases em cultivo em estado sólido que empregam meios formulados com bagaço de cana-de-açúcar, quando suplementados com *Prodex*<sup>®</sup>, permitem obter maiores títulos enzimáticos para *P. echinulatum* (Michalski *et al.*, 2008).

### 2.8.3 Uso de surfactantes

Reese (1972) verificou que surfactantes como *Tween 80*<sup>®</sup> aumentam de 2 a 17 vezes a secreção de celulases. Porém, Romanelli *et al.* (1975) verificaram que o *Tween 80*<sup>®</sup> foi desfavorável para a habilidade celulolítica de vários fungos.

O efeito de *Tween 80*<sup>®</sup> foi posteriormente estudado por Tangnu *et al.* (1981) em concentrações de 0,01, 0,02 e 0,1% (v/v) em cultivos do *T. reesei* RUT-C30. Os autores verificaram que concentrações de 0,1% (v/v) foram inibitórias para a secreção de celulases.

O *Tween 80*<sup>®</sup> é um surfactante não-iônico, pouco tóxico às membranas biológicas e constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Este vem sendo empregado na produção de enzimas, pois aumenta a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos (Giese *et al.*, 2004).

Reese & Maguire (1969) sugeriram que o acréscimo de *Tween 80*<sup>®</sup> no meio, contribui para aumentar a produção de celulases em linhagens de *Trichoderma*, pois pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo rápida secreção de enzimas e conseqüente maior síntese da enzima. Sternberg (1976) e Tangnu *et al.* (1981)

também verificaram que o *Tween 80*<sup>®</sup> pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana celular.

Romio & Dillon (2006) avaliaram a produção de celulases em *P. echinulatum* sob efeito de *Tween 80*<sup>®</sup> e polipropilenoglicol. Os autores verificaram que a presença do antiespumante polipropilenoglicol no meio de cultivo exerce influência na atividade enzimática, diminuindo a atividade de FPA, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. Entretanto, tratamentos com apenas *Tween 80*<sup>®</sup> mostraram-se benéficos para FPA, com maiores atividades nos tratamentos com 0,15% (v/v) do surfactante. Para endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases, o tratamento com *Tween 80*<sup>®</sup> não mostrou diferenças significativas na atividade enzimática.

#### **2.8.4 Efeito do pH**

Na literatura, há pouca informação sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do cultivo (Carlile & Watkinson, 1997). A maioria dos fungos filamentosos apresentam um decréscimo no valor de pH no seu meio de cultivo durante o crescimento em substratos contendo carboidratos, e após o esgotamento da fonte de carbono, um aumento nos valores de pH é observado (Bailey & Tahtiharju, 2003).

O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela produção de ácidos orgânicos ou pela absorção da fonte de nitrogênio e liberação de íons H<sup>+</sup>. Durante o cultivo, o tamponamento é difícil, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. Apenas em biorreatores, o pH pode ser mantido constante, automaticamente, durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente

pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (Carlile & Watkinson, 1997).

O pH ideal para a produção de celulases fúngicas varia de espécie para espécie, sendo os valores ótimos de pH entre 3,0-6,0 (Garg & Neelakantan, 1981; Niranjane *et al.*, 2007). Ahmed *et al.* (2009) ao estudarem valores de pH entre 4,0 e 7,0, na produção de celulases por *T. harzianum*, verificaram que um pH de 5,5 proporciona uma maior produção de endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. Da mesma forma, Ikram-ul-Haq *et al.* (2001) verificaram que a indução máxima de endoglicanase em *Aspergillus niger* é obtida em pH 5,5. Estudos indicam que *Aspergillus terreus* produz maiores títulos de  $\beta$ -glicosidases num intervalo de pH que varia entre 4,0-5,5 (Pushalkar *et al.*, 1995).

Sternberg & Dorval (1979) observaram que cultivos com altas concentrações de celulose produzem uma queda brusca do pH em meio contendo sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como fonte de nitrogênio, devido ao consumo de NH<sub>3</sub>, o que interfere na atividade da enzima e na sua produção. Entretanto, com a adição de bases e tampões, o pH pode ser controlado e os títulos enzimáticos podem ser aumentados. Ainda, esses autores verificaram que o controle do pH durante a fase ácida pode ser obtido pela adição automática de NH<sub>4</sub>OH aos fermentadores e, assim, ao mesmo tempo em que é realizado o controle do pH também é suprido o nitrogênio ao cultivo.

Brown & Halsted (1975) estudaram a relação entre o pH e o crescimento em cultivos de *T. reesei* QM 9123, em reatores de 10 litros. Os dados obtidos indicam que de quatro valores estudados de pH (2,5, 2,7, 3 e 4), no pH 2,5 não ocorreu crescimento, sendo que houve maior crescimento com o aumento do valor do pH. Posteriormente, Ryu & Mandels (1980) sugeriram que para *T. reesei*, o pH ideal para crescimento está em torno de 4, enquanto para produção de celulases, o pH ótimo é de 3. Abaixo do pH 3, as celulases são inativadas e o crescimento cessa abaixo de pH 2. O controle para maximizar a secreção de celulases está



entre os pHs 3 e 4. Tagnu *et al.* (1981) verificaram que pH 5,0 é o mais apropriado para a produção de celulases para a linhagem RUT-C30 de *T. reesei*.

Trabalhos descritos na literatura para *T. reesei* RUT-C30 empregaram valores fixos de pH em torno de 5,0 para a produção de celulases. Hendy *et al.* (1984) adotaram este pH para a produção de celulases em regime descontínuo, descontínuo alimentado e regime contínuo. Velkovska *et al.* (1997) também empregaram um valor de pH próximo a 5,0 (4,8) para a elaboração de um modelo cinético para a produção de celulases. Da mesma forma, Ahamed & Vermette (2008a; 2008b; 2009) empregaram um valor de pH 4,8 em seus estudos de otimização de celulases obtidas com *T. reesei* RUT-C30.

Juhász *et al.* (2004), ao testarem diferentes estratégias de controle de pH em cultivos com *T. reesei* RUT-C30, verificaram que nas condições com pH controlado em 5,0, houve um crescimento mais rápido quando comparado à condição que permitiu a queda do pH a 3,5 e após retorno a pH 5,0. No entanto, a condição que permitiu a queda do pH, apresentou uma produção de FPA 40% superior. Os autores sugeriram que a fase ácida influenciou a produção das enzimas. Neste mesmo trabalho, as mesmas condições foram testadas com pH 6,0, e nenhuma atividade superior foi encontrada.

### **2.8.5 Temperatura**

A temperatura é outro fator importante para o cultivo fúngico quando se visa à produção de celulases, sendo que a maioria dos fungos cresce bem entre 25 e 40°C. A temperatura afeta os parâmetros de crescimento como o tempo de adaptação (fase *lag*), a taxa específica de crescimento e o rendimento total, diferentemente, influenciando tanto no metabolismo primário quanto secundário (Carlile & Watkinson, 1997).

Para *T. reesei* a faixa de temperatura ótima de crescimento está entre 32-35°C, enquanto a temperatura de produção de enzima está entre 25-28°C. O controle da temperatura

pode ser utilizado para otimizar tanto o crescimento celular como a produção de celulases, sendo que a fase de crescimento antecede à da secreção enzimática (Ryu & Mandels, 1980).

Ahmed *et al.* (2009) ao estudarem diferentes temperaturas, entre 22 e 34°C, na produção de celulases por *T. harzianum*, verificaram que uma temperatura de 28°C proporciona uma maior produção de endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases em 120 horas de incubação. Uma maior produção de celulases por *A. terreus* também foi obtida numa temperatura de 28°C (Sing *et al.*, 1996).

### **2.8.6 Agitação e aeração**

Os fungos filamentosos, na sua maioria, utilizam oxigênio como receptor final de elétrons para completar o processo respiratório. Há evidência, entretanto, de que sob baixa tensão de oxigênio alguns fungos podem fazer uso do íon nitrato com esta finalidade (neste caso há limitação devido à toxicidade do íon nitrito que se forma). Além de gerar energia, o oxigênio é empregado pelos fungos em etapas metabólicas de biossíntese de esteróis, de ácidos graxos insaturados, de algumas vitaminas e para degradação de compostos aromáticos (Carlile & Watkinson, 1997).

O ar contém cerca de 21% de oxigênio. Este gás se caracteriza por apresentar baixa solubilidade em água e, por isso, difunde-se lentamente em fluidos não agitados ou materiais embebidos em água. Com isto, a maioria dos fungos cresce bem na superfície dos meios de cultura. Os fungos heterótrofos obtêm energia pela decomposição de compostos orgânicos, com formação de dióxido de carbono e o acúmulo deste gás pode ser prejudicial para o fungo. Tudo isso, associado à formação de outros gases ou compostos voláteis num cultivo submerso, compõem uma complexa troca de gases que, por isso, exige um sistema eficiente de aeração que favoreça o microrganismo. Tal condição pode ser obtida por um sistema de trocas gasosas alcançadas pela agitação da massa líquida (Carlile & Watkinson, 1997).

Ahamed & Vermette (2008a) obtiveram atividades máximas de 5,02 FPU/mL para *T. reesei* RUT-C30, em cultivos com 5% (m/v) de celulose e mantidos acima de 20% de saturação em oxigênio. Os experimentos se iniciaram com 100% de saturação e apresentaram uma queda brusca até 20% nas primeiras 24 horas de fermentação. Segundo os autores, o emprego do regime descontínuo alimentado composto de 15% (m/v) de lactose e 0,1% (m/v) de ácido lactobiônico, após às 48 horas de cultivo, contribui para manter a concentração de oxigênio acima de 20% da saturação.

Estudos realizados em biorreator com diferentes frequências de agitadores (200, 300 e 400 rpm) mostraram que maiores atividades de FPA foram obtidas na menor frequência, enquanto que o maior crescimento foi obtido na maior frequência (Patel *et al.*, 2009). Neste mesmo trabalho, os autores justificam que a maior atividade obtida na menor frequência foi devido à melhor indução e secreção das celulasas, decorrente do crescimento mais lento, e à menor degradação de proteínas observada em agitações maiores.

### **2.8.7 Condições do processo de cultivo**

Existem dois tipos de processos de cultivos que são utilizados para a produção de enzimas: cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES). Os processos com cultivos submersos são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classificam em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (Schmidell & Facciotti, 2001). Os processos de CS dominam a produção da maioria das enzimas microbianas comerciais, principalmente porque o controle e a esterilização são facilitados neste sistema (Said & Pietro, 2002). O CS permite um maior controle dos parâmetros, tais como pH, temperatura e concentração nutrientes (Nigam & Singh, 1994).

O CS envolve crescimento de um microrganismo em suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes estão dissolvidos ou suspensos como partículas sólidas. Existem muitos tipos de reatores disponíveis para CS, mas produções de enzimas comerciais realizam-se, predominantemente, em sistemas de mistura por agitadores mecânicos internos, dentro de um recipiente cilíndrico fechado constituído de aço inoxidável e contendo um eixo interno com pás para agitação. O controle do CS é realizado através de dispositivos acoplados ao recipiente principal (Said & Pietro, 2002).

Como já descrito, os cultivos submersos podem ser conduzidos em regime contínuo, regime descontínuo e descontínuo alimentado. Estudos têm mostrado que o emprego de técnicas em regime descontínuo alimentado diminuem os problemas associados com aeração, agitação, formação de espuma e incrementam a atividade das enzimas (McLean *et al.*, 1986; Esterbauer *et al.*, 1991).

Sternberg & Dorval (1979) realizaram cultivos descontínuos com o fungo *T. reesei* QM 9414 empregando concentrações de 2 a 8% (m/v) de celulose e mantendo o pH acima de 3 com adições de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH). Estes autores verificaram atividades máximas em torno de 2,4 FPU/mL (4º dia); 3,2 FPU/mL (5º dia); 4,0 FPU/mL (6º dia) e 4,0 FPU/mL (6º dia), para os cultivos com 2, 4, 6 e 8% (m/v), respectivamente.

Hendy *et al.* (1984) conduziram experimentos utilizando processos descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo para a produção de celulases por *T. reesei*. Os maiores resultados para FPA (26 UI/mL) foram obtidos no processo descontínuo alimentado, empregando massas de celulose equivalente a 10% (m/v). Além de maiores atividades, este processo também proporcionou maiores produtividades volumétricas e maiores rendimentos de celulases por unidade de substrato.

Um dos primeiros trabalhos realizados em processo descontínuo alimentado para a produção de celulases foi desenvolvido por Ghose & Sahai (1979). Estes autores produziram

celulases de *T. reesei* QM 9414, sendo que a primeira fase foi realizada com glicose em 2 litros de volume operacional. Após o consumo da glicose, iniciou-se a segunda fase, em que um litro de meio de cultivo contendo 4,2% (m/v) de celulose foi adicionado continuamente em vazões de 25 e 40 mL/h ao meio inicial. Os valores das atividades foram, respectivamente, 3,34 e 3,20 FPU/mL. Estes resultados foram superiores aos obtidos no tratamento em que 1 litro de meio contendo 4,2% (m/v) de celulose foi adicionado de uma única vez.

O processo descontínuo alimentado também leva à produção de maiores títulos enzimáticos e maiores produtividades para *P. occitanis*. Adições de Avicel<sup>®</sup> a cada 20 ou 48 horas possibilitaram títulos enzimáticos maiores que 20 FPU/mL e produtividades de 128 FPU/L/h, enquanto o processo descontínuo apresentou títulos de apenas 9 FPU/mL e produtividade de 80 FPU/L/h (Ellouz-Chabouni *et al.*, 1995).

Watson *et al.* (1984) estudaram a produção de celulases de *T. reesei* RUT-C30 em regime descontínuo alimentado, sendo polpa sulfitada utilizada como fonte de celulose. Os melhores resultados de FPA (57 UI/mL) foram obtidos numa alimentação de 1g/L/h, totalizando uma concentração de celulose final de 25% (m/v).

## 2.9 Biorreatores

Atualmente, com o desenvolvimento da Biotecnologia, modernos biorreatores têm sido construídos para as mais diversas necessidades de produção, como enzimas, corantes, hormônios, antibióticos e anticorpos. Estes biorreatores apresentam sistemas de controle para todas as variáveis do processo e são projetados para operarem em condições assépticas (Figura 9). Mesmo com todos esses avanços, a utilização comercial do potencial da Biotecnologia moderna para muitas aplicações permanece limitada. O conhecimento insuficiente da engenharia de bioprocessos é um dos vários limitantes do sucesso de projetos e do aumento de escala das pesquisas em laboratório (Rossi, 2006).

Muitos tipos de biorreatores são empregados em processos biotecnológicos e o tipo mais tradicional empregado é o de tanque agitado. A primeira aplicação dos biorreatores, data dos anos 40, quando foram utilizados em cultivos aeróbios para a produção do antibiótico penicilina, durante a Segunda Guerra Mundial (Bailey, 1980). Cerca de 90% dos biorreatores aeróbios utilizados na indústria são de tanque agitado (Kossen, 1984; Pereira Jr *et al.*, 2008).

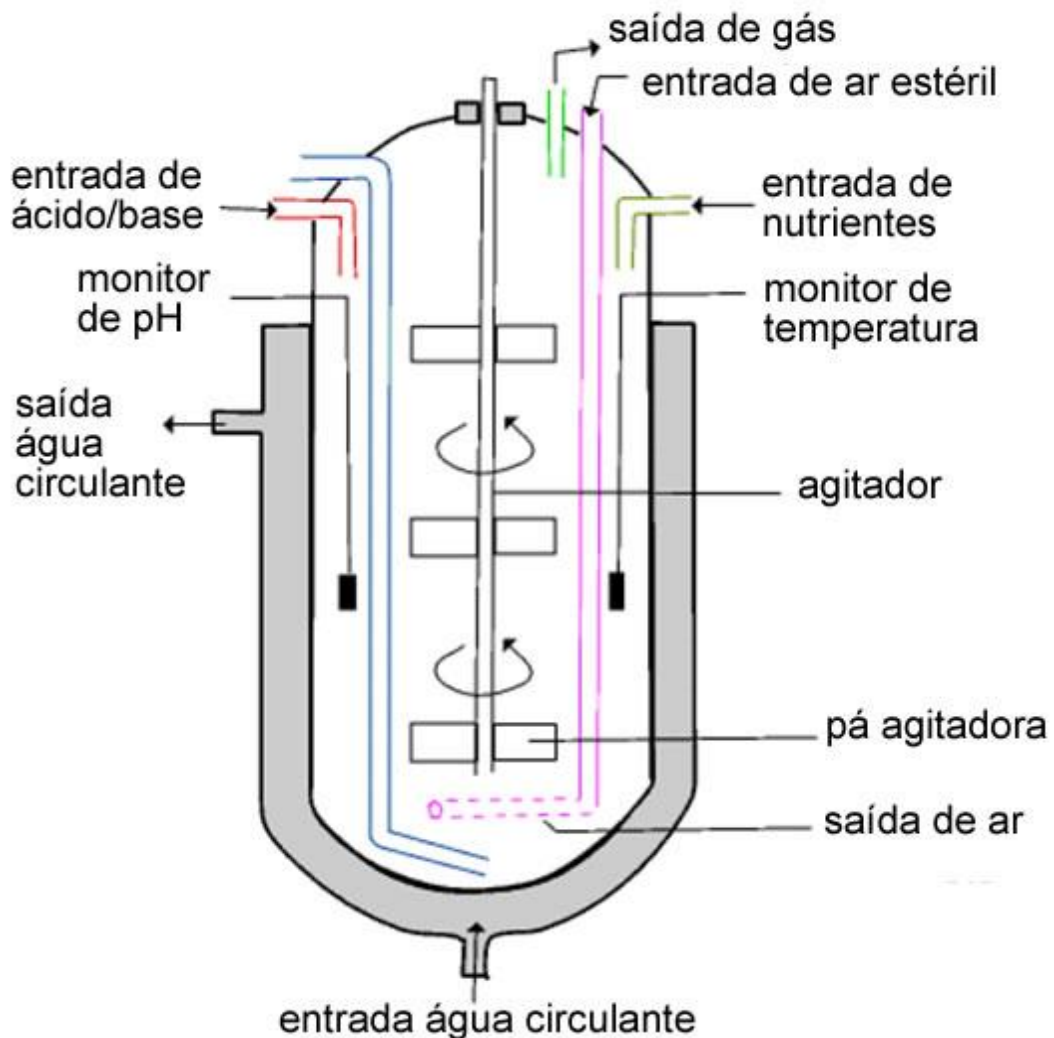


Figura 9. Esquema de biorreator de tanque agitado piloto equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo. (Fonte: <http://www.biotopics.co.uk/microbes/penici.html>).

O processo de alimentação no regime descontínuo alimentado envolve uma adição lenta de meios com nutrientes altamente concentrados no biorreator, sem remoção do meio inicial, até que o reator esteja cheio. Essa operação pode manter os níveis de nutrientes baixos para minimizar a repressão por metabólitos ou para estender a fase estacionária pela adição de nutrientes para obter o produto adicional. O regime descontínuo alimentado é usado extensamente nos biorreatores industriais (Hendy *et al.*, 1984). Segundo Pereira Jr *et al.* (2008) o regime descontínuo alimentado pode ser definido como um modo de operação na qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação.

Diante deste contexto, a realização desse trabalho se justifica pela contribuição ao conhecimento sobre a produção de celulasas e xilanases por *P. echinulatum* em biorreator com agitação mecânica, empregando o regime descontínuo e o regime descontínuo alimentado para incrementar os títulos enzimáticos. Além disso, a utilização destas enzimas na hidrólise de resíduos lignocelulósicos constitui em um importante acesso biotecnológico que contribui para tornar economicamente viável a produção de etanol de segunda geração.





### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagem

Para a produção de celulases e xilanases foi utilizada a linhagem mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum* obtida a partir da linhagem 9A02S1 (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). A linhagem S1M29 (Figura 10) foi obtida por meio de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem 9A02S1 caracteriza-se por ser um mutante parcialmente desreprimido à glicose (Dillon *et al.*, 2006) e resultou de várias etapas de mutagênese a partir da linhagem 2HH, isolada do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* (Carrau *et al.*, 1981).

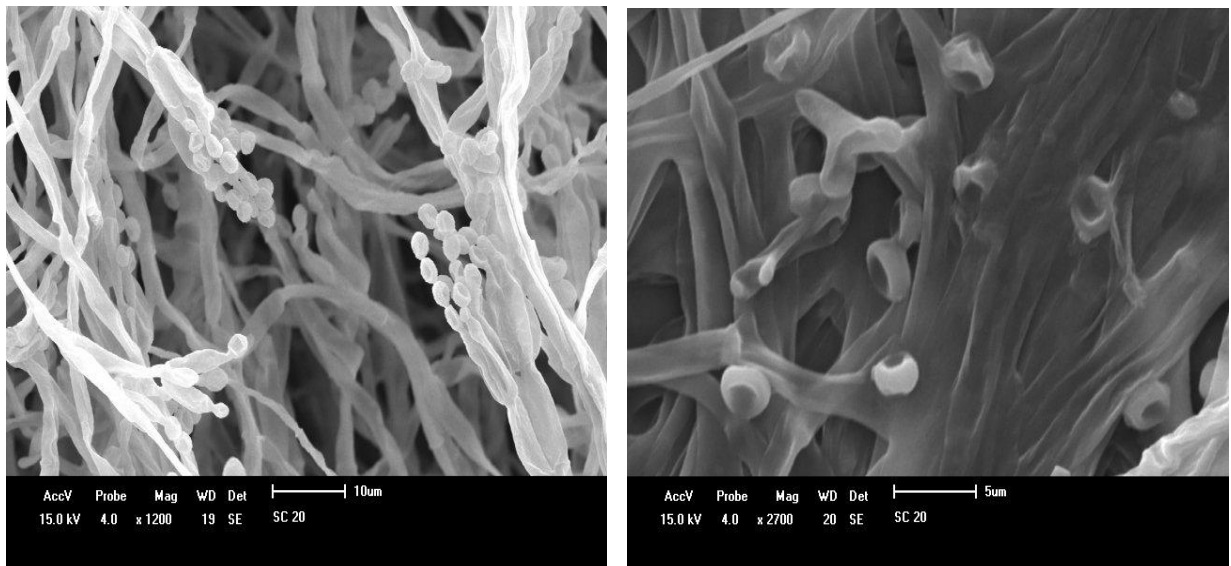


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de *Penicillium echinulatum* (Foto Marli Camassola).

### 3.2 Soluções e suspensões

As soluções, quando necessário, foram autoclavadas a 1 atm de pressão monométrica durante 20 minutos.

- **Solução de azida sódica 20% (m/v).** Foi formulada em água destilada e empregou-se 1µL da solução para cada mL de amostra, para manter uma concentração inibitória mínima de 0,02% (m/v).

- **Solução antibiótica de ciprofloxacino (*Proflox*<sup>®</sup>-EMS S/A).** Dissolveu-se um comprimido de cloridrato de ciprofloxacino, correspondendo a uma quantidade de 500 mg de ciprofloxacino, em 40 mL de água destilada estéril. Para cada 100 mL de meio de cultivo, acrescentou-se 0,16 mL da solução de antibiótico para atingir uma concentração mínima final de 0,02 mg/mL.

- **Soluções para determinação do conteúdo de celulose.**

- **Solução de ácido acético/ácido nítrico.** Foi preparada com 150 mL de ácido acético 80% (v/v), acrescido de 15 mL de ácido nítrico concentrado.

- **Soluções para determinação de FPA, endoglicanases, β-glicosidases e xilanases.**

- **Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS).** A solução para dosagens de açúcares redutores 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).

- **Solução de carboximetilcelulose 2% (m/v).** Foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 0,5% (m/v).

- **Solução de salicina 1% (m/v).** Foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 0,5% (m/v).

- **Solução de xilana 1% (m/v) (*oat spelt xylan*).** Foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 0,5% (m/v).

- **Solução de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L)** . Foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 0,5% (m/v).
- **Tampão citrato de sódio 0,05 mol/L (pH 4,8).**
- **Solução de glicose 2 mg/mL para curva padrão.**
- **Solução de  $\rho$ -nitrofenol 2 mmol/L /L para curva padrão.**
- **Solução de xilose 0,01 mol/L para curva padrão.**
- **Soluções para hidrólise ácida da sacarose.**
  - **Solução de ácido clorídrico 2 mol/L.**
  - **Solução de hidróxido de sódio 1 mol/L.**
  - **Solução de sacarose 20 g/L para curva padrão.**
- **Solução mineral 20x (SM).** Baseia-se na formulação de Mandels & Reese (1957) e foi composta por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10g);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (6g);  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (6g);  $\text{CaCl}_2$  (6g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1g);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,0312g);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,028g);  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,04g). Estes sais foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada, sendo a solução autoclavada e armazenada a 4°C.
- **Suspensão de celulose intumescida 2,5% (m/v).** Foi utilizada celulose *Celuflok E*<sup>®</sup> (Celuflok Celulose e Amidos Ltda, Cotia, SP). A suspensão foi autoclavada e, após, permaneceu sob agitação a 180 rpm por 7 dias. Esta suspensão foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

### 3.3 Meios de produção para celulases e xilanases

#### 3.3.1 Meio de produção para inóculo

O meio de cultivo para a produção do inóculo consistiu de 0,5% (m/v) de celulose *Celuflok E*<sup>®</sup>; 0,1% (m/v) de sacarose; 0,14% (m/v) de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ); 0,2% (m/v) de farelo de soja; 0,5% (m/v) de farelo de trigo; 0,05% (m/v) de *Prodex*<sup>®</sup>; 0,1% (v/v) de

*Tween 80*<sup>®</sup>; 0,002% (v/v) do antibiótico ciprofloxacino, 5% (v/v) da solução mineral e água destilada para completar o volume final de 100 mL.

### **3.3.2 Meio de produção para cultivos em biorreator**

O meio de cultivo para os biorreatores foi composto por 1%, 2%, 3%, 4% e ou 6% (m/v) de celulose *Celuflok E*<sup>®</sup>, conforme o experimento; 0,5% (m/v) de sacarose; 0,14% (m/v) de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>); 0,2% (m/v) de farelo de soja; 0,5% (m/v) de farelo de trigo; 0,05% (m/v) de *Prodex*<sup>®</sup>; 0,1% (v/v) de *Tween 80*<sup>®</sup>; 0,002% (v/v) do antibiótico ciprofloxacino, 10% (v/v) da solução mineral e água destilada para completar o volume de trabalho dos biorreatores.

## **3.4 Procedimentos**

### **3.4.1 Crescimento e manutenção de linhagens**

A linhagem foi crescida e mantida em 100 mL de ágar-celulose (C-ágar), consistindo de 40 mL de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral; 0,1g proteose peptona (Oxoid L85<sup>®</sup>); 2 g ágar e 50 mL de água destilada. A linhagem foi crescida em tubos inclinados com C-ágar por 7 dias a 28°C até a formação de conídios e então estocada a 4°C, conforme Dillon *et al.* (2006).

### **3.4.2 Cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca para inóculos**

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de produção, foram inoculados com uma suspensão com  $1 \times 10^7$  conídios e mantidos a 28°C, em agitação recíproca de 180 rpm, por 48 horas. Logo depois, 10% (v/v) da cultura foi inoculada no biorreator. Para os experimentos desenvolvidos no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), as mesmas condições para o inóculo foram mantidas, exceto a agitação, que foi orbital a 250 rpm, e a temperatura, que foi de 29°C.

### 3.4.3 Cultivos em biorreator

O biorreator empregado nos experimentos desenvolvidos no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul (Figura 11) foi construído em parceria, entre a Universidade de Caxias do Sul e o Senai/Mecatrônica. Ele apresenta um volume operacional de 5 L e a agitação do equipamento é feita com um inversor de frequência que comanda um motor que está conectado por um selo mecânico nas pás. A cuba foi confeccionada em vidro e apresenta forma cilíndrica, tendo 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro. A turbina de agitação, as entradas para os eletrodos e as demais entradas e saídas são feitas de aço inoxidável. A turbina tem a forma de “U”, apresenta aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura. O biorreator apresenta três chicanas distribuídas pelo sistema. Com esta configuração, com o meio de cultivo com 2% (m/v) de celulose e sem células, frequência de agitador de 300 rpm e fluxo de ar de 0,5 vvm, um valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ) de  $111 \text{ h}^{-1}$  foi medido.

Os ensaios neste biorreator foram conduzidos em regime descontínuo e em todos os ensaios a concentração de oxigênio foi mantida manualmente em no mínimo 30% da saturação. Inicialmente, foram feitos cultivos em processo descontínuo com 1% (m/v) de celulose para avaliar o efeito da temperatura e do pH na produção enzimática. Para avaliar o efeito da temperatura, manteve-se o pH do meio sem controle e a temperatura foi mantida automaticamente. Após selecionar-se a melhor temperatura para a produção enzimática, diferentes valores de pH foram testados. Nestes ensaios, o pH foi mantido com adição de 2 mol/L NaOH e 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Os dados foram obtidos a partir de um único experimento.



Figura 11. Biorreator com agitação mecânica, construído em parceria com a Universidade de Caxias do Sul e com o Senai/Mecatrônica.

Após definirem-se as melhores condições de temperatura e pH, foram feitos cultivos em regime descontínuo com 2, 3 e 4% (m/v) de celulose, sendo a temperatura e o pH mantidos automaticamente. Nestes ensaios, o pH passou a ser controlado com 2 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  ao invés de NaOH, por ser uma importante fonte de nitrogênio para a produção enzimática. Todos os experimentos no biorreator foram mantidos por no mínimo 120 horas. A frequência dos agitadores mecânicos do biorreator variou entre 120 e 300 rpm, conforme a demanda de oxigênio. A aeração variou de 0,25 a 1,5 vvm e a espuma do meio foi controlada pela adição do antiespumante *Fluent Cane 114 Polyglycol*<sup>®</sup> (Dow Química S.A.). Os dados foram obtidos a partir de um único experimento.

Para a amostragem, foram retiradas 3 alíquotas (15 mL) diariamente com um intervalo mínimo de 4 horas e 16 horas até o dia seguinte. Além de conservação sob refrigeração, acrescentou-se azida sódica 20% (m/v) às amostras a fim de manter uma concentração final de 0,02% (m/v). Para os procedimentos analíticos, centrifugou-se 10 mL da amostra por 20 minutos a 10.000 g. O restante da amostra foi guardado para eventuais análises. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e armazenado em placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL) e em microtubos de reação. O *pellet* foi utilizado para determinar o conteúdo de celulose residual.

Os experimentos em regime descontínuo alimentado foram desenvolvidos no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado em Campinas. Para tanto, empregaram-se biorreatores da New Brunswick, modelo BioFlo/CelliGen 115, com volume operacional de até 1,5 L (Figura 12). Os biorreatores são dotados de duas turbinas tipo Rushton com 6 pás planas com quatro chicanas. O  $K_{La}$ , para 300 rpm, fluxo de ar de 0,5 vvm e meio de cultivo com 2% (m/v) de celulose e sem células foi de  $28,8 \text{ h}^{-1}$ .

Para estes ensaios, a temperatura também foi mantida em  $28^{\circ}\text{C}$  e o pH em 6,0. O pH foi mantido com adição automática de 6,4 mol/L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e 0,4 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A concentração de oxigênio também foi mantida num mínimo de 30%, no entanto o controle foi automático. A aeração variou entre 0,25 a 2,5 vvm e a frequência dos agitadores variou entre 270 a 750 rpm. O volume de trabalho empregado foi de 1,2 L e os experimentos foram mantidos até as 168 horas de cultivo. As amostras (10 mL) foram retiradas de 12 em 12 horas a partir das 24 horas para acompanhar os níveis enzimáticos. Após acrescentar azida sódica, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi guardado em microtubos de reação e os *pellets* permaneceram nos tubos de centrífuga para posterior análise do conteúdo de celulose resultante. As amostras permaneceram sob refrigeração e todas as análises foram feitas ao fim

de todos os experimentos no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul.



Figura 12. Biorreator com agitação mecânica da New Brunswick, modelo BioFlo/CelliGen 115.

Em regime descontínuo alimentado, foram utilizadas massas de celulose equivalentes a 2, 4 e 6% (m/v) em relação ao volume útil do biorreator. Para tanto, os experimentos foram iniciados com 1% (m/v) de celulose e as alimentações foram feitas a partir de 48 horas de cultivo, com a adição de 0,5% (m/v) de celulose em pó, esterilizada em autoclave a 121°C, a cada 12 horas. Entretanto, para o experimento com 6% (m/v) de celulose, nos dois últimos períodos de alimentação, adicionou-se 1% (m/v) de celulose, a fim de não estender demasiadamente o experimento. Nestes experimentos, não houve variação de volume. Para fins de comparação, experimentos em regime descontínuo foram feitos no mesmo biorreator e



com as mesmas massas de celulose empregadas em regime descontínuo alimentado. Os dados foram obtidos a partir de um único experimento.

### 3.5 Determinação do coeficiente volumétrico da transferência de oxigênio

O coeficiente de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ) foi estimado pelo método descrito por Sobotka *et al.* (1982), em meio de cultivo sem células, através da utilização do eletrodo polarográfico para medida da concentração de oxigênio dissolvido. Após a calibração do eletrodo, injetou-se nitrogênio no meio até que a concentração de oxigênio dissolvido, representada pelo percentual de oxigênio em relação à saturação, fosse reduzida a 15%. Após, o meio foi novamente aerado, cronometrando-se a variação do percentual de oxigênio dissolvido entre 20 e 80% de saturação.

A equação abaixo define a transferência de oxigênio para o meio:

$$dC/dt = K_{La} (C_s - C)$$

Onde:

$dC/dt$  = variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

$C_s$  = concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio.

$C$  = concentração de oxigênio dissolvido.

Com a integração da Equação 1, com limites de  $C$  entre  $\alpha C_s$  e  $\beta C_s$  e de  $t$  entre 0 e  $t$ , tem-se:

$$\ln [(1-\beta) / (1-\alpha)] = - K_{La} \cdot t$$

Onde  $\alpha$  e  $\beta$  são valores percentuais da concentração de oxigênio na saturação, registradas no reator. O gráfico resultante da Equação 2 apresenta um perfil linear, cujo coeficiente angular representa “ $-K_{La}$ ”.

### 3.6 Determinação do conteúdo de celulose

O conteúdo de celulose residual nas amostras foi determinado pelo método de Updegraff (1969) modificado por Ahamed *et al.* (2008a). Este método emprega 10 mL do meio de cultura, que é centrifugado a 10.000 g por 20 minutos. Após, o sobrenadante é removido com um pipetador. Os *pellets* resultantes são suspensos em 3 mL de uma solução com ácido acético e ácido nítrico, permanecendo esta mistura em banho a 100°C por 30 minutos. Após o resfriamento e centrifugação a 3.000 g por 20 minutos, os *pellets*, constituídos apenas pela celulose, são lavados com água destilada (10 + 10 mL) em um papel filtro seco e pesado. A celulose residual é seca a 50°C por 48 horas.

### 3.7 Determinação da sacarose

A sacarose foi mensurada após hidrólise ácida de acordo com o método preconizado por Falcone & Marques (1965), com modificações. Para tanto, 0,5 mL da amostra foi hidrolisada com 0,5 mL de HCl 2 mol/L por 10 minutos a 65°C. Após resfriamento das amostras, acrescentou-se 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, foi fervida por 5 minutos para reação com os açúcares redutores. Em seguida, acrescentaram-se 4 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, utilizando o programa Origin 6.0.

### 3.8 Dosagens enzimáticas

#### 3.8.1 Determinação da atividade sobre papel filtro (FPA)

Para a dosagem de celulases totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), adaptada de Ghose (1987), sendo calculado as diluições necessárias para liberar 1 mg de açúcar redutor por mL.

O papel filtro é um substrato tradicionalmente utilizado em pesquisas de celulases. As fibras de celulose que constituem o papel têm uma estrutura complexa e para sua hidrólise substancial é necessário um sistema celulósico complexo (celobiohidrolases e endoglicanases). O papel filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC para se avaliar a atividade celulásica total de um sistema celulósico (Ghose, 1987; Medve *et al.*, 1997).

Utilizaram-se placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa, foi adicionado 10 µL de solução enzimática ou diluição apropriada e 140 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 a cada poço 5 mg de papel filtro (Whatman nº1) em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50°C. Logo após, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS (Miller, 1959) 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 adicionado 200 µL de água destilada sendo a absorbância medida em espectrofotômetro a 545 nm.

A determinação das atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose com

concentrações de 0, 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

### **3.8.2 Determinação de endoglicanases**

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987) com modificações, foi realizada empregando-se 1  $\mu$ L da solução enzimática ou diluição apropriada e 49  $\mu$ L de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50°C, por 10 minutos, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50  $\mu$ L de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), previamente aquecida a 50°C, mantendo as placas por 30 minutos em banho a 50°C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300  $\mu$ L da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos.

A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam-se tal como para FPA.

### **3.8.3 Determinação de $\beta$ -glicosidases**

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidases foram utilizados dois substratos: salicina e  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NPG). Para o primeiro, empregou-se a metodologia descrita por Chahal (1985) com adaptações. De acordo com essa técnica, foram adicionados em poços de placa de 96 poços, 10  $\mu$ L de solução enzimática, 40  $\mu$ L de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e 50  $\mu$ L da solução de salicina 1% (m/v). As placas contendo essas soluções foram colocadas em banho a 50°C, por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300  $\mu$ L da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente foi realizada

a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 545 nm. A determinação da atividade foi realizada tal como para FPA.

A determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidases também foi realizada empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional (100  $\mu$ L) contendo 5  $\mu$ L de água destilada, 5  $\mu$ L de solução enzimática e 90  $\mu$ L de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NPG 4 mmol/L) foi incubada a 50°C por 30 minutos, sendo interrompida com a adição de 200  $\mu$ L de uma solução 10% (m/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A leitura da absorbância de  $\rho$ NPG das amostras foi estimada espectrofotometricamente a 405 nm e a determinação da atividade foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de  $\rho$ -nitrofenol ( $\rho$ NP) com concentrações de 0, 0,04; 0,2; 0,4; 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 e 2,0 mmol/L/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Origin 6.0.

### **3.8.4 Determinação de xilanases**

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10  $\mu$ L de caldo enzimático e 90  $\mu$ L de uma solução de xilana 1% (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  $\mu$ L de DNS e a placa foi mantida em banho a 100°C por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados 100  $\mu$ L de amostra em placa de 96 poços e adicionado 200  $\mu$ L de água destilada e 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 com concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mmol/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

### 3.8.5 Unidades de enzimas

As unidades de FPA, de endoglicanases, de xilanases e de  $\beta$ -glicosidases (salicina) foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar  $1\mu\text{mol/L}$  de açúcar redutor por minuto. Uma unidade de  $\beta$ -glicosidases ( $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar  $1\mu\text{mol/L}$  de  $\rho$ -nitrofenol por minuto.

### 3.8.6 Determinação de endoglicanases por viscosidade

A atividade de endoglicanases também foi estimada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de carboximetilcelulose 1% (m/v), em tampão citrato (0,05 mol/L pH 4,8). Para a realização deste método, foram seguidos os procedimentos descritos por Byrne *et al.* (1975). A técnica utilizada é detalhada a seguir.

- a solução de carboximetilcelulose e a solução da amostra, diluída apropriadamente, foram colocadas em banho termostático ajustado a  $50^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos;
- a um tubo de ensaio, foram adicionados 17,5 mL da solução de carboximetilcelulose a 0,5 mL da solução enzimática diluída, homogeneizando-se com agitação;
- a mistura foi incubada em banho termostático, a  $50^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos;
- transcorrido o tempo de reação, a viscosidade da mistura reacional foi medida no viscosímetro BROOKFIELD modelo DV-II+.

Para cada amostra, foi preparado um branco da reação com solução enzimática inativada, submetida ao mesmo procedimento descrito para amostra. Para a obtenção da solução enzimática inativada, o extrato foi colocado em autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$ ) por 15 min. Com os valores de viscosidade das preparações contendo a amostra ativa e inativada, foi calculada a redução de viscosidade (A) através da Equação 1:

$$A = \frac{\text{viscosidade da amostra inativada} - \text{viscosidade da amostra}}{\text{viscosidade da amostra inativada}} \cdot 100 \quad (1)$$

Para a conversão de 'A' em atividade, são construídas curvas padrão da seguinte forma:

- o sobrenadante obtido é submetido a uma série de diluições, sendo as amostras analisadas de acordo com a metodologia descrita e calculando-se o valor de A de cada diluição;
- a partir dos valores de 'A' são construídas curvas relacionando estes valores com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas.
- 1 U foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas, e expressa em unidades/mL (UI/mL). Proporcionalmente, foi calculado o número de unidades para cada concentração.

A atividade de endo foi calculada pela Equação 2:

$$P = 10^{(A-a/b)} \cdot 1/v \cdot \text{dil} \quad (2)$$

Onde:

P - atividade enzimática de endoglicanases (UI/mL)

A - redução de viscosidade (%)

a e b - coeficientes da curva de calibração

v - volume de preparação enzimática utilizada na análise (0,5 mL)

dil - diluição da preparação enzimática

### 3.9 Análise dos resultados

Os gráficos das atividades enzimáticas foram elaborados no software PrismGraphPad versão 3.0 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados de cultivos submersos com *P. echinulatum* S1M29, em biorretor com agitação mecânica. Os itens 4.1 e 4.2 se referem aos cultivos conduzidos com diferentes temperaturas e pHs, respectivamente. Os resultados para regime descontínuo estão descritos no item 4.3 e os de regime descontínuo alimentado no item 4.4. O crescimento da massa micelial não pôde ser determinado por gravimetria, devido à presença de materiais insolúveis e nem por dosagem de DNA, devido a presença de material genético nos farelos de trigo e soja. A determinação do crescimento micelial por N-acetil glicosamina também não pode ser empregada, pois os resultados não foram coerentes.

### 4.1 Efeito da temperatura na produção de celulasas e xilanases de *Penicillium echinulatum*

Para avaliar o efeito da temperatura na produção de celulasas e xilanases, foram realizados ensaios com três diferentes temperaturas: 26, 28 e 30°C. Os experimentos foram conduzidos em regime descontínuo com 1% (m/v) de celulose e as temperaturas foram mantidas automaticamente durante todo experimento.

Em cultivos com fungos filamentosos sem controle de pH, ocorre um decréscimo no valor de pH durante o crescimento em substratos contendo carboidratos e, após o esgotamento da fonte de carbono, um aumento nos valores de pH é observado (Bailey & Tahtiharju, 2003). Sternberg & Dorval (1979) e Duff *et al.* (1987) sugerem que o decréscimo do pH ocorre devido ao consumo da amônia presente no meio de produção sob a forma de sulfato de amônio.

Ao comparar-se os valores de pH durante os cultivos, verificou-se que a temperatura de 28°C proporcionou uma queda no valor de pH em menor tempo de processo (Figura 13), sugerindo que houve uma melhor adaptação e crescimento do fungo nesta temperatura. Além

disso, o rápido metabolismo na temperatura de 28°C, também pode ter ocorrido paralelamente ao aumento mais rápido do pH. Estes dados estão de acordo com os estudos de Sternberg & Dorval (1979), pois os mesmos também verificaram que o pH pode ser um parâmetro indicativo da intensidade do metabolismo.

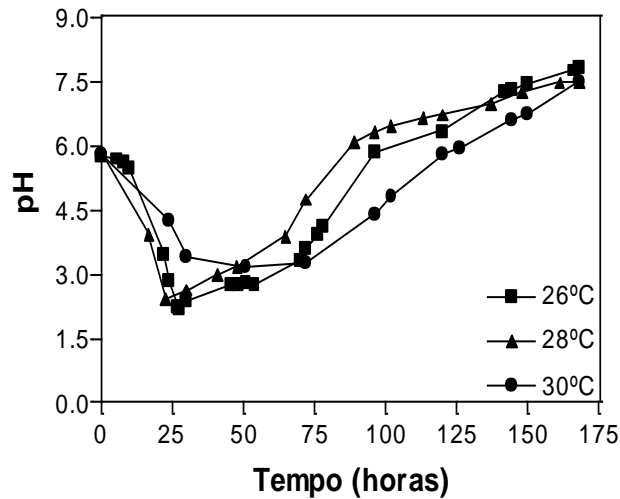


Figura 13. Valores de pH durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes temperaturas.

Com relação à produção enzimática (Figura 14A-C), observou-se que a temperatura de 28°C proporcionou os maiores títulos enzimáticos para endoglicanases (9,47 UI/mL), FPA (1,45 UI/mL) e  $\beta$ -glicosidases (1,0 UI/mL). No entanto, o perfil da produção das endoglicanases foi semelhante para a temperatura de 26°C e o título enzimático máximo da atividade de  $\beta$ -glicosidases ocorreu em menor tempo na menor temperatura.

Vários autores descrevem a temperatura de 28°C como a melhor para a produção de celulases. Ahmed *et al.* (2009) avaliaram diferentes temperaturas (entre 22 e 34°C) na produção de celulases por *T. harzianum* e verificaram que a 28°C ocorreu a maior produção de endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases em 120 horas de cultivo. Sing *et al.* (1996) também obtiveram máxima produção de celulases por *Aspergillus terreus* numa temperatura

de 28°C, assim como Zhou *et al.* (2008) para *T. viride*. Duff & Murray (1996) sugerem que a temperatura ótima para a produção de celulasas por *T. reesei* está entre 25-28°C.

Em contrapartida, Sohail *et al.* (2009), ao estudarem a produção de celulasas por *A. niger* MS82, obtiveram os maiores níveis de  $\beta$ -glicosidases numa temperatura de 25°C. No entanto, os maiores títulos enzimáticos de endoglicanases foram obtidos quando o fungo foi crescido a 30-35°C. Os dados obtidos para  $\beta$ -glicosidases por estes autores podem justificar títulos enzimáticos máximos obtidos em menor tempo de cultivo para a temperatura de 26°C, sugerindo que para esta enzima menores temperaturas favorecem sua produção.

As atividades de xilanases foram semelhantes, até 72 horas de cultivo, para todas as temperaturas estudadas (Figura 14D). Após este período, foram observados decréscimos nas atividades a 26°C e aumentos nas atividades a 28 e 30°C. Apesar de mais tardio, a atividade máxima de xilanases (23,2 UI/mL) ocorreu a 30°C, em 120 horas de cultivo. Gupta *et al.* (2009), também verificaram que a temperatura ótima para a produção de xilanases por *Fusarium solani* é de 30°C, obtendo-se atividades máximas de 69,88 U/mL. Da mesma forma, Smith & Wood (1991) observaram, para *Aspergillus awamori*, que a produção ótima para xilanases era de 30°C. No entanto, Terrasan *et al.* (2010) obtiveram maior produção de enzimas xilanolíticas (xilanases,  $\beta$ -xilosidases) numa temperatura de 25°C para *Penicillium janczewskii*.

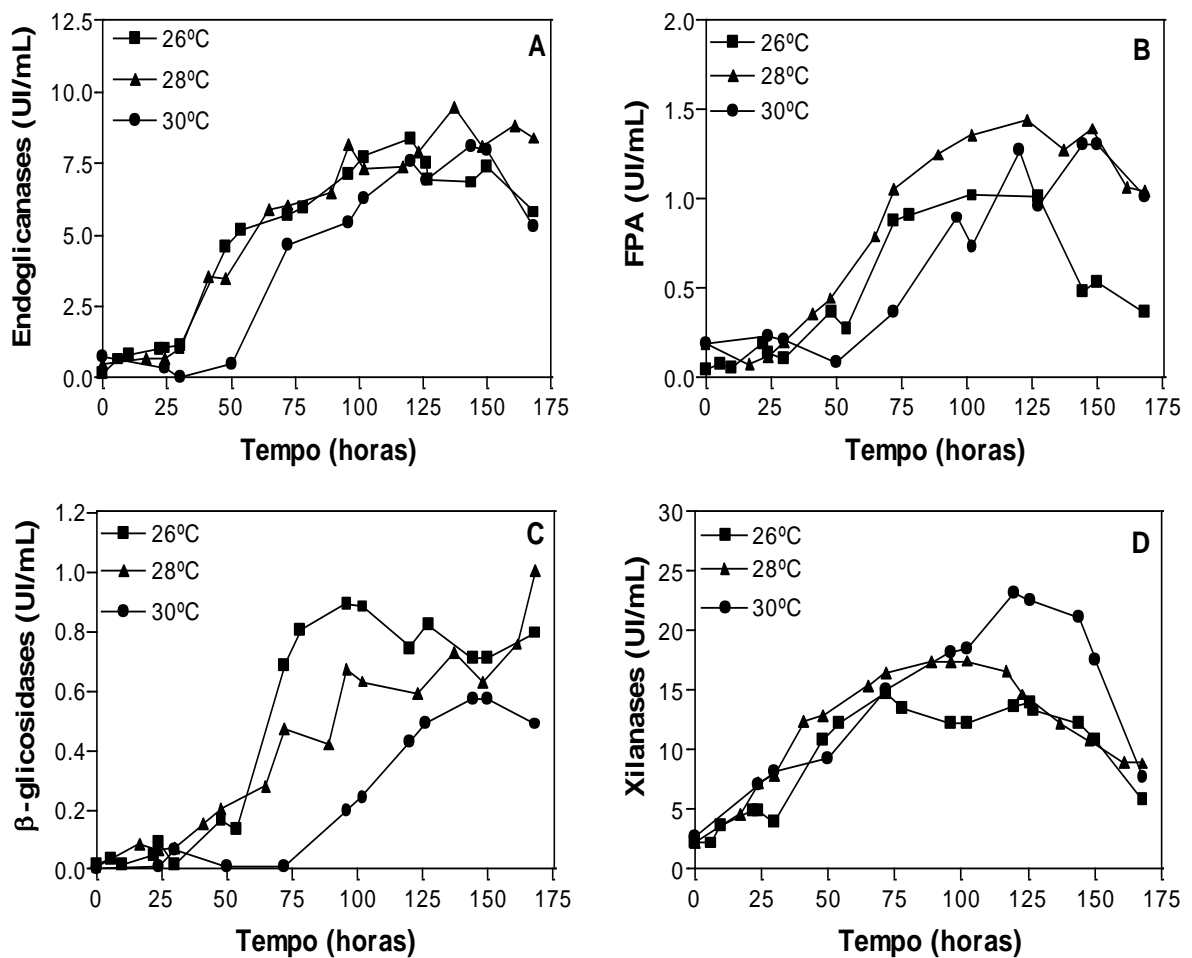


Figura 14. Atividades de endoglucanases (A), FPA (B),  $\beta$ -glicosidases conforme método de Chahal (1985) (C) e xilanases (D) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, sob diferentes temperaturas.

Definiu-se a temperatura de 28°C, entre as estudadas, como a mais adequada para a produção enzimática, sendo esta empregada em todos os experimentos realizados, apesar desta decisão não estar sustentada pela estatística em vista de dificuldades operacionais.

#### 4.2 Efeito do pH na produção de celulases e xilanases de *Penicillium echinulatum*

Visto que o pH é um dos fatores que mais influência na fisiologia dos microrganismos e, conseqüentemente, no crescimento e na produção de enzimas, este parâmetro foi estudado na produção de celulases e xilanases, a partir de experimentos que empregaram seis diferentes valores de pH: 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Estes valores foram mantidos automaticamente

durante todos os experimentos com adição de soluções de 2 mol/L NaOH e de 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Na Figura 15, pode-se observar as diferentes frequências de agitador empregadas nos cultivos para manter a concentração de oxigênio dissolvida acima de 30% da saturação. A vazão de ar variou de 0,25 vvm a 1,1 vvm, dependendo do experimento e maiores vazões foram requeridas até 24 horas de cultivo (Figura 16). Verifica-se que em cultivos com valores de pH 4,0 e 5,0 a vazão de ar requerida e agitação foram maiores nas primeiras 24 horas de cultivo, como consequência do maior consumo de oxigênio. Sugere-se que nessas condições de pH, houve um maior crescimento do microrganismo. Estes dados corroboram os obtidos por Ryu & Mandels (1980) e por Doppelbauer *et al.* (1987), pois estes autores sugeriram um pH ideal de crescimento em torno de 4,0, para *T. reesei*.

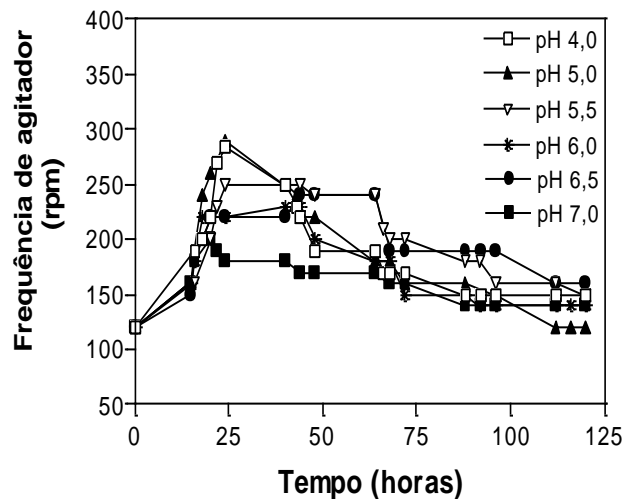


Figura 15. Frequências de agitador empregadas durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

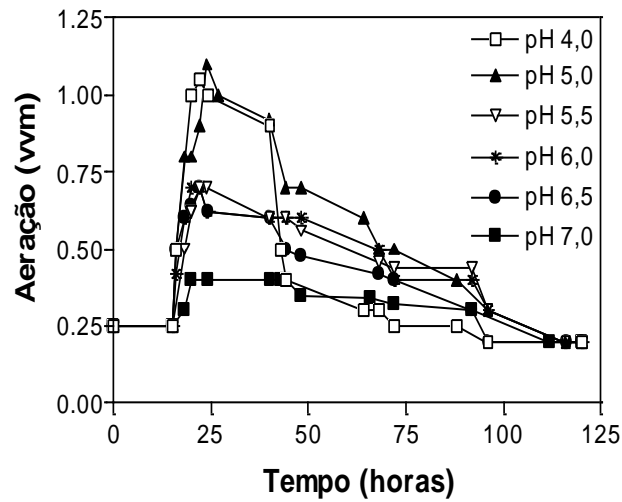


Figura 16. Vazão de ar requerida durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

O consumo da sacarose durante os experimentos ocorreu até 24 horas de cultivo para a maior parte dos experimentos e para o pH 4,0 o consumo foi mais lento, até 40 horas de cultivo (Figura 17A). As oscilações na concentração da sacarose observadas durante os experimentos se justificam pela liberação de açúcares redutores no meio de cultivo, que são detectados pelo método do DNS (Figura 17B).

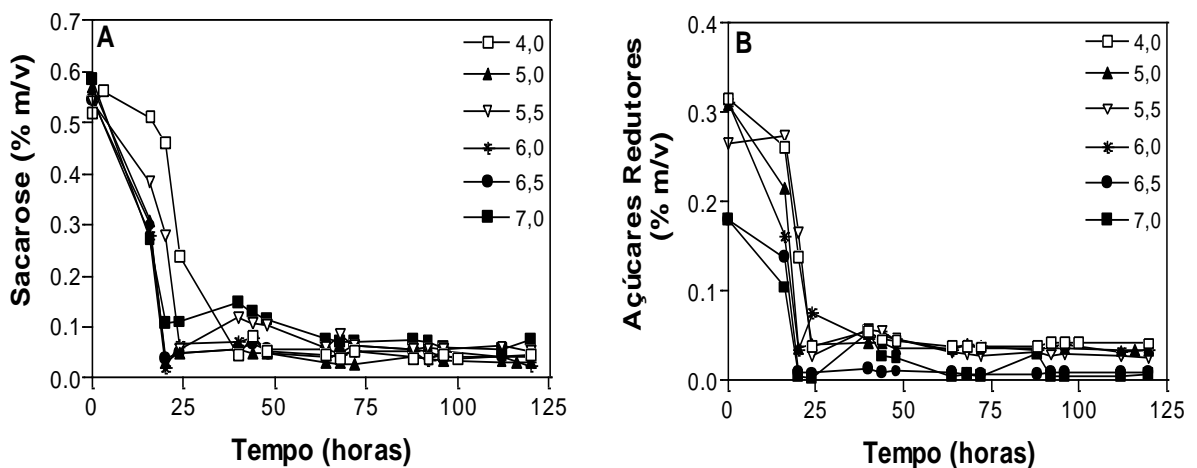


Figura 17. Concentração de sacarose (A) e de açúcares redutores (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

O consumo da celulose foi medido pela avaliação da celulose por gravimetria (Figura 18), admitindo-se, então, que ela foi hidrolisada e consumida. O cultivo conduzido em pH 6,0 apresentou o maior consumo e o perfil do consumo da celulose foi semelhante nas demais condições de pH, até as 40 horas de cultivo.

O perfil de consumo da celulose em pH 6,0 pode indicar a importância do pH na fisiologia e no metabolismo do fungo, uma vez que neste valor, 87% (m/v) da celulose foi consumida em até 120 horas de cultivo. Em contraste, Ahamed & Vermette (2008b), ao crescer *T. reesei* RUT-C30 em pH 4,8 com 1% (m/v) de celulose, verificaram que 99% (m/v) da celulose foi consumida em 144 horas de cultivo. No entanto, ao crescer *A. niger* nas mesmas condições, os autores verificaram que apenas 79,3% (m/v) da celulose foi consumida.

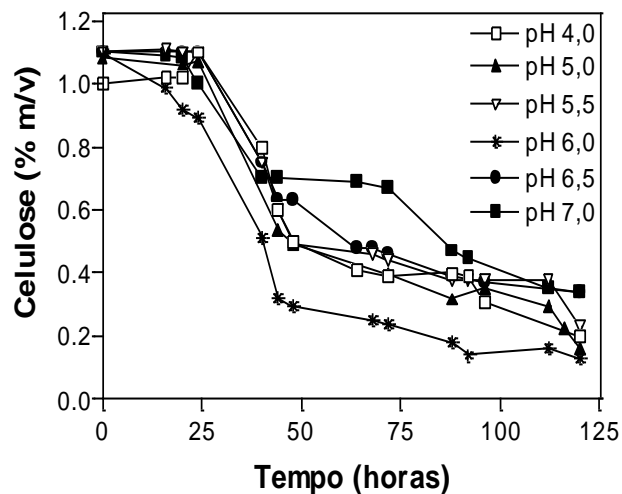


Figura 18. Concentração de celulose durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

Com relação à atividade enzimática, verificou-se que os maiores títulos de xilanases e FPA foram obtidas em pH 6,0 com atividades máximas de 33,5 UI/mL e 1,8 UI/mL, respectivamente (Figura 19A-B). Valores de pH de 5,5 e 6,5 também contribuíram para a produção destas enzimas; no entanto, os outros valores de pH avaliados não foram tão favoráveis para a produção enzimática.

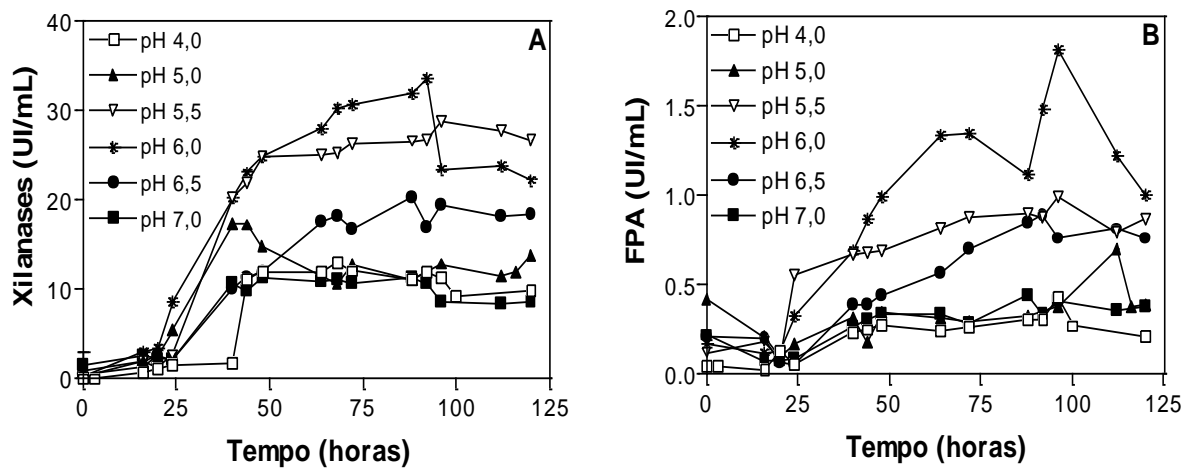


Figura 19. Atividades de xilanasas (A) e FPA (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

Para endoglicanases, as maiores atividades foram proporcionadas pelos valores de pH 5,5 e 6,0 (Figura 20A), sendo que os títulos máximos, obtidos em 96 horas, foram semelhantes, em torno de 10 UI/mL. A atividade de endoglicanases também foi estimada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de carboximetilcelulose 1% (m/v), em tampão citrato (0,05 M pH 4,8). Para esta análise, as enzimas obtidas do cultivo em pH 6,0 apresentaram maior eficiência na redução da viscosidade, atingindo uma atividade máxima de 540 UI/mL em 96 horas de cultivo (Figura 20B).

Enquanto que para a produção de xilanasas, FPA e endoglicanases o intervalo de pH ótimo encontrado foi entre 5,5 e 6,5, para  $\beta$ -glicosidases se verificou um intervalo de pH mais ácido, entre 5,0 e 6,0 (Figura 21). As maiores atividades foram obtidas nos cultivos conduzidos em pH 5,5 e 6,0 em 96 horas de cultivo para ambos os cultivos.



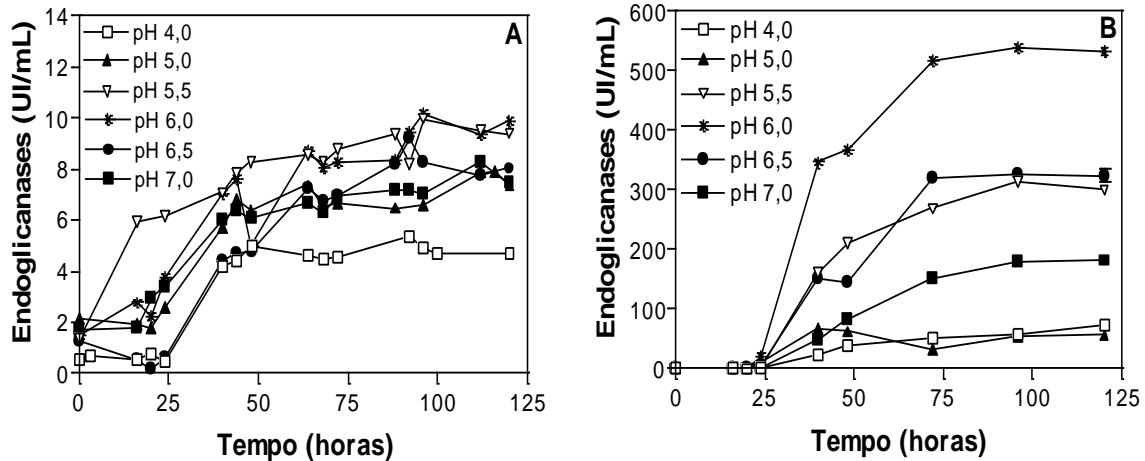


Figura 20. Atividades de endoglicanases de acordo com o método de Ghose (1987) (A) e de acordo com o método da redução da viscosidade de Byrne *et al.* (1975) (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

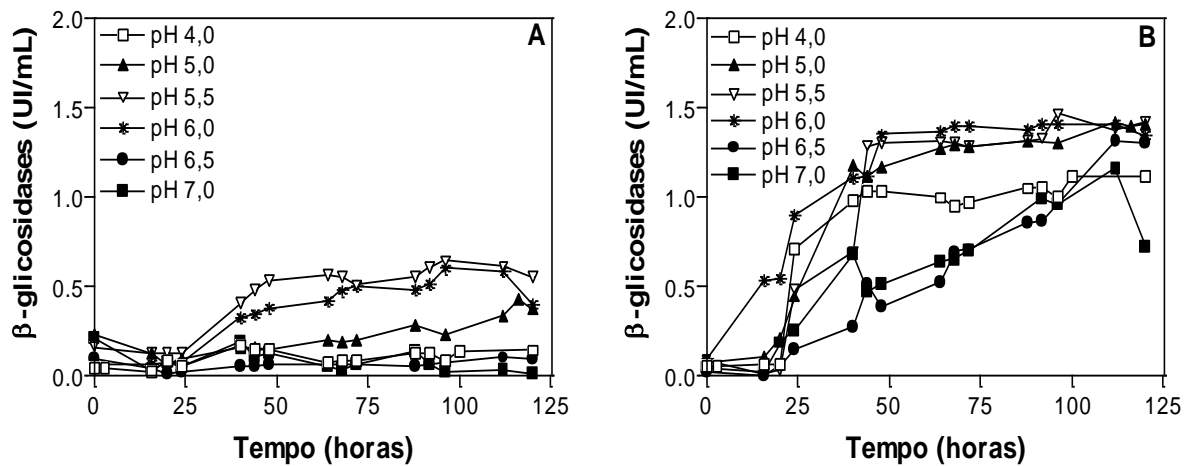


Figura 21. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, conduzidos sob diferentes valores de pH.

Tangu *et al.* (1981) estudaram a influência do pH na produção de celulases por *T. reesei* RUT-C30 em reator com pH controlado. Foram testados valores de pH entre 4,0 e 6,0 e nenhum efeito significativo sobre a produção de celulases e produtividade final foi observada. No entanto, a produção de  $\beta$ -glicosidases foi afetada pelos diferentes pHs empregados. Em pH 4,0 e 5,0, a atividade de  $\beta$ -glicosidase aumentou gradualmente até atingir títulos máximos

em 8 dias de cultivo. Já para pH 6,0, a produção de  $\beta$ -glicosidase foi 30% superior e as atividades máximas foram alcançadas em 4 dias de cultivo, em comparação com menores valores de pH. No entanto, durante a fase final da fermentação, a atividade de  $\beta$ -glicosidase diminuiu para títulos próximos aos medidos em menores níveis de pH.

Analisando-se conjuntamente os dados de agitação, oxigenação, consumo da celulose, concentração de sacarose, açúcares redutores e atividade das celulasas e xilanases do caldo, pode-se sugerir que o pH 6,0, comparativamente aos valores de pH 4,0 e 5,0, correspondeu a uma condição não favorável ao metabolismo nas primeiras 24 horas, verificado pela menor necessidade de agitação e oxigenação, com possível diminuição da repressão catabólica em relação às condições de pH 4,0 e 5,0, com conseqüente maior atividade de FPA, endoglicanases,  $\beta$ -glicosidases, xilanases e maior consumo da celulose.

Esta análise baseia-se indiretamente em Sternberg (1976) que sugere que os fungos devam ser cultivados em valores de pHs menos favoráveis para a hidrólise enzimática da celulose e, assim, reduzir a concentração de açúcares liberados da celulose e, portanto, atenuar o impacto da repressão catabólica.

Na Tabela 2, pode-se observar valores de pH descritos como os mais apropriados para a produção de celulasas e xilanases. Os valores variam de 4,0 a 7,5, de acordo com o microrganismo e a enzima.

Tabela 2. Valores ótimos de pH para a produção de celulasas e xilanases.

Microrganismo	Xilanases	FPA	Endoglicanases	$\beta$ -glicosidasas	Referência Bibliográfica
<i>Aspergillus awamori</i>	4,0				Smith & Wood (1991)
<i>Aspergillus niger</i>			5,5		Ikram-ul-Haq <i>et al.</i> (2001)
<i>Aspergillus oryzae</i>	7,5		5,5		Chipeta <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus terreus</i>				4,0-5,5	Pushalkar <i>et al.</i> (1995)
<i>Fusarium solani</i> F7	5,5				Gupta <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium janczewskii</i>	6,0				Terrasan <i>et al.</i> (2010)
<i>Penicillium janthinellum</i>	5,5				Milagres <i>et al.</i> (1993)
<i>Trichoderma harzianum</i>			5,5	5,5	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	5,0				Silveira <i>et al.</i> (1999)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30	XYNIII: 6,0-6,5 XYNII: 4,0-6,0 XYNI: 4,0-4,5	4,0-4,5			Xiong <i>et al.</i> (2004)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30	7,0				Bailey <i>et al.</i> (1993)

A partir da análise da tabela, conclui-se que os resultados do presente trabalho corroboram dados da literatura, pois alguns autores descrevem um valor de pH de 5,5 como mais adequado para a produção de endoglicanases e  $\beta$ -glicosidasas. Para xilanases, os valores de pH variam muito, no entanto, os resultados para *P. echinulatum* corroboram dados descritos para *T. reesei* e para *P. janczewskii*.

Para FPA, há poucas informações disponíveis sobre pH ótimo para a produção das enzimas. Diferentemente de *T. reesei*, o pH ótimo encontrado para a produção de FPA por *P. echinulatum* foi de 6,0. Como os pHs 5,5 e 6,0 proporcionaram atividades semelhantes para endoglicanases e  $\beta$ -glicosidasas, sugere-se que o pH 6,0 foi mais favorável para a produção de celobiohidrolases, já que a atividade de FPA engloba a reação conjunta das três enzimas (Teeri, 1997).

Na Tabela 3, são apresentados os principais resultados obtidos nos experimentos conduzidos sob diferentes valores de pH.

Tabela 3. Resumo dos principais resultados obtidos em diferentes valores de pH.

	pH 4,0	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0
FPA <sub>max</sub> (UI/mL)	0,43	0,7	0,99	<b>1,81</b>	0,88	0,44
t FPA <sub>max</sub> (h)	96	112	96	96	92	88
Endoglicanases <sub>max</sub> (UI/mL)	5,37	7,89	<b>9,98</b>	<b>10,2</b>	9,23	8,29
t Endoglicanases <sub>max</sub> (h)	92	116	96	96	96	112
Xilanases <sub>max</sub> (UI/mL)	13,08	17,45	28,8	<b>33,5</b>	20,3	11,4
t Xilanases <sub>max</sub> (h)	68	40	96	92	88	88
$\beta$ -glicosidases <sub>max</sub> (UI/mL)	0,17	0,43	<b>0,64</b>	<b>0,6</b>	0,1	0,19
t $\beta$ -glicosidases <sub>max</sub> (h)	40	116	96	96	112	40
Frequência máxima (rpm)	<b>285</b>	<b>290</b>	250	230	230	200
Celulose consumida (%)	80	84	77	<b>87</b>	66	66

FPA<sub>max</sub>: atividade máxima sobre papel filtro;

t FPA<sub>max</sub>: tempo da atividade máxima sobre papel filtro;

Endoglicanases<sub>max</sub>: atividade máxima de endoglicanases de acordo com o método de Ghose (1987);

t Endoglicanases<sub>max</sub>: tempo da atividade máxima de endoglicanases;

Xilanases<sub>max</sub>: atividade máxima de xilanases;

t Xilanases<sub>max</sub>: tempo da atividade máxima de xilanases;

$\beta$ -glicosidases<sub>max</sub>: atividade máxima de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985);

t  $\beta$ -glicosidases<sub>max</sub>: tempo da atividade máxima de  $\beta$ -glicosidases

A partir dos resultados obtidos, embora baseados em um único experimento devido a problemas operacionais, optou-se por empregar o pH 6,0 para a produção das enzimas para a continuidade do trabalho. Neste pH verificou-se maiores atividades de FPA, que reflete o conjunto do complexo celulolítico, e xilanases, desde que ambas tratam-se de atividades

enzimáticas desejáveis para garantir maiores rendimentos da hidrólise do material lignocelulósico.

#### **4.3 Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em regime descontínuo com diferentes concentrações de celulose**

A maioria dos processos de produção de celulases descritos são conduzidos em regime descontínuo (Singhania *et al.*, 2010) e estudos com diferentes concentrações de celulose são importantes para avaliar os incrementos nos títulos enzimáticos. Como existe uma relação positiva entre a concentração de celulose e a produção de celulases, avaliou-se a produção de celulases e xilanases em regime descontínuo com 2, 3 e 4% (m/v) de celulose.

O perfil do consumo de celulose foi semelhante nas três diferentes concentrações de celulose empregadas. Observa-se, na Figura 22A, um drástico decréscimo no conteúdo de celulose a partir das 24 horas de cultivo, para todas as condições. Nestes ensaios, a celulose residual foi de 0,29% (m/v) para o ensaio com 2% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) para ambos os experimentos com 3 e 4% (m/v) de celulose.

O maior consumo da sacarose foi em até 24 horas de cultivo (Figura 22B). As variações na concentração da sacarose, principalmente nas condições com 3 e 4% (m/v) de celulose, se deveram à presença de açúcares redutores liberados durante o cultivo. A análise dos dados permite afirmar que o consumo da celulose inicia logo após o esgotamento da sacarose.

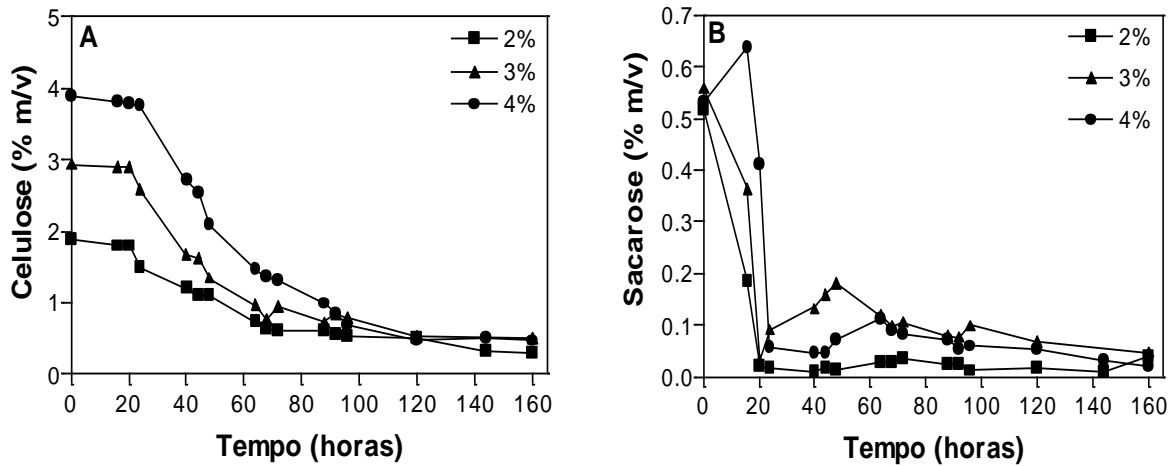


Figura 22. Concentração de celulose (A) e de sacarose (B) durante cultivos em regime descontínuo com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose.

O aumento da concentração de celulose incrementou as atividades de endoglicanases e títulos máximos de 37,5 UI/mL foram obtidos em 120 horas para o cultivo com 4% (m/v) de celulose (Figura 23A).

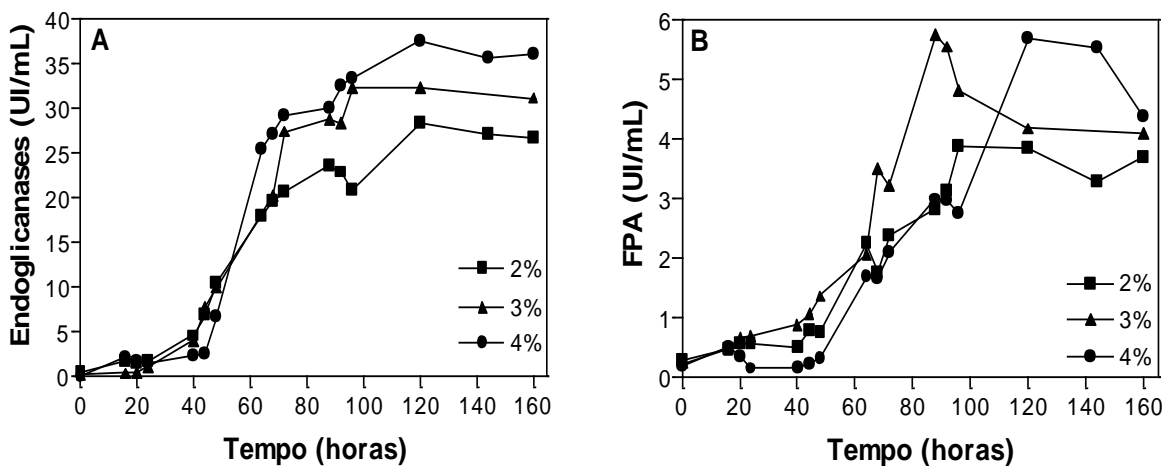


Figura 23. Atividade de endoglicanases (A) e FPA (B) durante cultivos em regime descontínuo com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose.

Para FPA, verificou-se, com o aumento da concentração da celulose, um aumento proporcional nas atividades em até 3%, sendo a atividade máxima obtida em 88 horas de cultivo com valor de 5,78 UI/mL (Figura 23B). Para a condição com 4% (m/v) de celulose, as atividades foram semelhantes (5,7 UI/mL); no entanto, a máxima produção foi em 120 horas

de cultivo. Visto que os aumentos proporcionais de FPA foram obtidos com até 3% de celulose, concentrações de celulose superiores a 4% não foram testadas.

Em contraste, Sternberg & Dorval (1979) obtiveram aumentos nas atividades de FPA (4,5 UI/mL) com até 6% (m/v) de celulose, para a linhagem QM 9414 de *T. reesei*. Entretanto, para a linhagem RUT-C30, Hendy *et al.* (1984) verificaram incrementos na atividade enzimática em até 5% (m/v) de celulose (8,0 UI/mL). Acima desta concentração, os autores não obtiveram aumentos nas atividades. Além disso, a produtividade foi decaindo, devido ao lento crescimento inicial e ao conseqüente aumento do tempo de cultivo.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos obtidos com outras espécies do gênero *Penicillium*. O trabalho com as espécies *P. pinophilum*, *P. persicinum* e *P. brasilianum* resultou em atividades de 0,28; 0,80 e 0,75 UI/mL, respectivamente, para 4% (m/v) de celulose (*Solka Floc*<sup>®</sup>) (Jorgensen *et al.*, 2005).

As maiores atividades de xilanases foram obtidas em 120 horas de cultivo para todas as condições; porém, a menor concentração de celulose proporcionou os maiores títulos enzimáticos, 188 UI/mL (Figura 24). Para 3 e 4% obtiveram-se atividades máximas de 182 e 172 UI/mL, respectivamente, indicando que o aumento da concentração de celulose não incrementou as atividades de xilanases, o que já era esperado. Xiong *at al.* (2004) também obtiveram atividades máximas de xilanases (94,7 UI/mL) em 120 horas de cultivo para *T. reesei* RUT-C30, entretanto, a fonte de carbono foi lactose (3%).

Os resultados obtidos para xilanases foram superiores aos obtidos para *P. janthinellum* (Oliveira *et al.*, 2006). Neste trabalho, os autores empregaram sabugo de milho e casca de aveia para a produção de xilanases e obtiveram atividades de 55,3 UI/mL e 58,8 UI/mL, respectivamente.

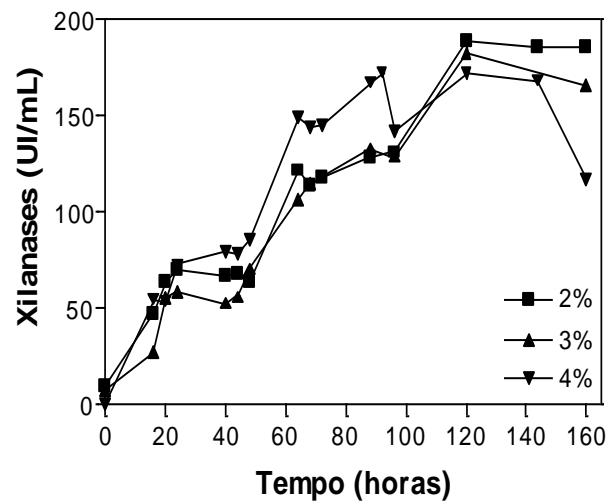


Figura 24. Atividade de xilanases durante cultivos em regime descontínuo com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose.

As atividades de  $\beta$ -glicosidases foram favorecidas apenas na condição com 3% (m/v) de celulose, alcançando atividades máximas de 0,98 UI/mL para o método que emprega salicina como substrato (Figura 25A). Atividades semelhantes (0,92 UI/mL) foram obtidas para *T. harzianum*, empregando 1% (m/v) de carboximetilcelulose como fonte de carbono (Ahmed *et al.*, 2009).

Para a metodologia que emprega  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo como substrato, foram obtidas atividades máximas de 5,88 UI/mL para a condição com 3% (m/v) de celulose (Figura 25B). Avaliando-se as duas metodologias de determinação de  $\beta$ -glicosidases, verifica-se que as maiores atividades foram obtidas na análise enzimática que emprega o  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e sugere-se que a enzima apresenta maior afinidade por este substrato.



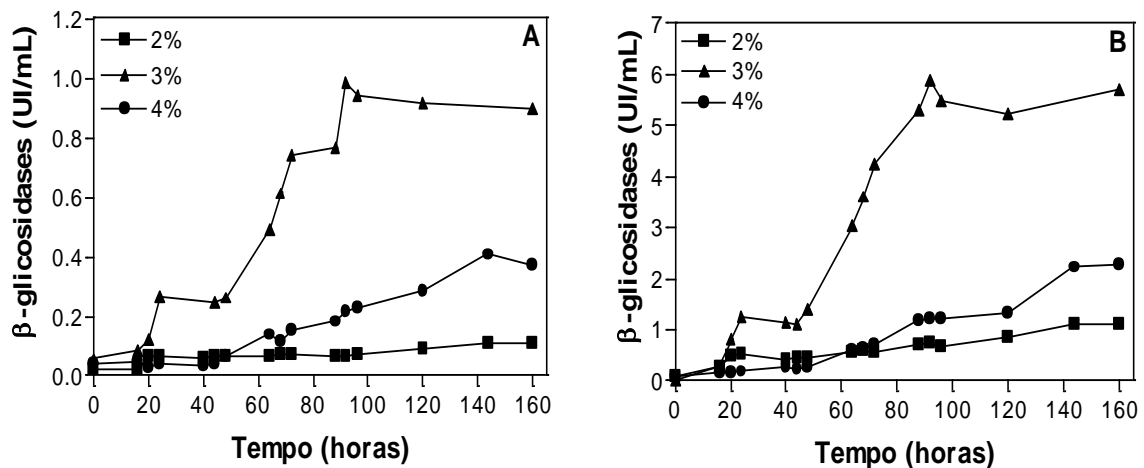


Figura 25. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes concentrações iniciais de celulose.

A celulose é reconhecida como um dos melhores indutores do complexo celulásico (Mandels, 1975) e neste trabalho o aumento da concentração de celulose incrementou a atividade de FPA, endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases. Estudos do efeito da concentração da fonte de carbono são extremamente importantes, pois em baixas concentrações de celulose a produção de glicose pode ser insuficiente para suprir as necessidades metabólicas do microrganismo, tanto para crescimento como para a fisiologia celular. Por outro lado, com maiores concentrações de celulose, a geração de glicose pode ser mais rápida do que seu consumo, interrompendo a síntese de celulases por repressão catabólica por glicose (Sukumaran *et al.*, 2005). A liberação de glicose de forma mais rápida pode ser devido à presença de maior quantidade de celulose amorfa, que é facilmente mais hidrolisada.

#### 4.4 Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em regime descontínuo alimentado

A literatura descreve que o regime descontínuo alimento (RDA) traz diversos benefícios para os processos fermentativos, como proporcionar maiores atividades

enzimáticas que o regime descontínuo (RD), quando massas equivalentes de celulose são empregadas (Ghose & Sahai, 1979; Hendy *et al.*, 1984; Watson *et al.*, 1984; Ellouz-Chabouni *et al.*, 1995; Belghith *et al.*, 2001). O regime descontínuo alimentado foi avaliado em ensaios em que três diferentes massas de celulose foram adicionadas parceladamente ao meio, sendo também realizados experimentos em regime descontínuo com as mesmas massas de celulose.

Na Figura 26A, verifica-se que o consumo da sacarose ocorreu até 24 horas de cultivo e foi semelhante para todas as condições (RD2%, RD4%, RD6%, RDA2% RDA4% e RDA6%), comprovando que a sacarose é uma fonte de fácil assimilação e contribui para o crescimento de *P. echinulatum*, com menor repressão catabólica comparado à glicose (Dillon *et al.*, 2011).

O consumo da celulose se iniciou logo nas primeiras 24 horas de cultivo e após 48 horas de cultivo de 70 a 80% (m/v) da celulose já haviam sido consumidos em todas as condições testadas (Figura 26B). As alimentações se iniciaram em 48 horas de cultivo e 0,5% (m/v) de celulose foi adicionado a cada 12 horas de cultivo. Como a amostragem era de 12 em 12 horas, aumentos significativos no conteúdo de celulose não puderam ser observados no gráfico, pois a alimentação era feita após a retirada da amostra e a celulose foi sendo consumida entre os intervalos de amostragem. Um aumento maior na concentração de celulose pôde ser observado em RDA com 6% (m/v) de celulose, devido ao aumento da concentração da alimentação de 0,5 a 1% (m/v), em 120 e 132 horas de cultivo.

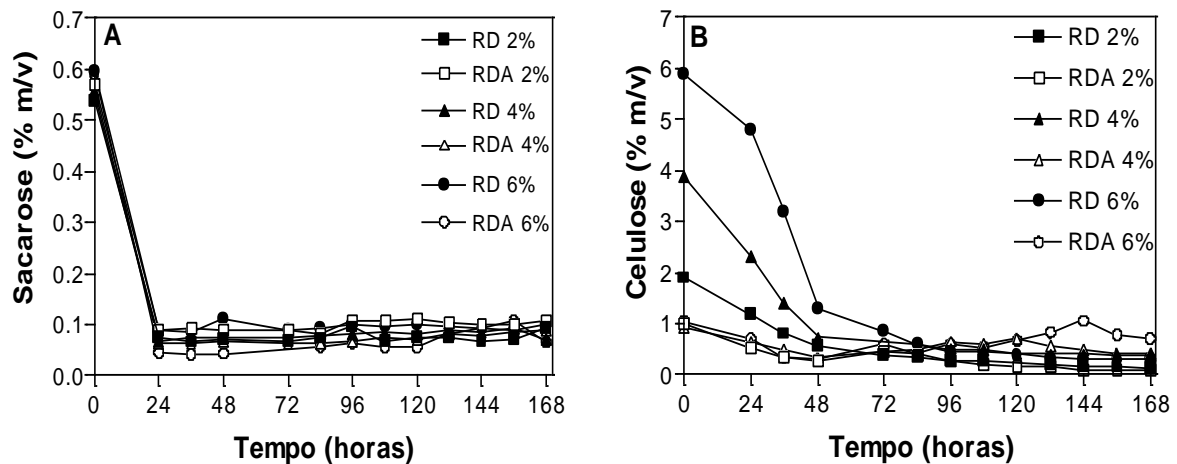


Figura 26. Consumo de sacarose (A) e celulose (B) durante cultivos em regime descontinuo (RD) e regime descontinuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes massas de celulose.

Na Figura 27, observa-se o consumo do oxigênio durante os cultivos e a variação da frequência de agitadores para manter o oxigênio dissolvido em no mínimo 30% da saturação. Os experimentos iniciaram com valores de oxigênio dissolvido em torno de 90% da saturação e, em até 12 horas de cultivo, este valor atingiu os 30% da saturação em todos os cultivos. Os equipamentos foram programados para variar a frequência de agitadores de 270 a 550 rpm e quando a frequência de agitadores atingia o valor máximo, a aeração aumentava automaticamente de 0,25 vvm a, até no máximo, 2,5 vvm. Entretanto, nos experimentos em RD com 4 e 6% (m/v) e RDA com 6% (m/v) de celulose, esses valores não foram suficientes e a frequência dos agitadores precisou ser aumentada para até 750 rpm.

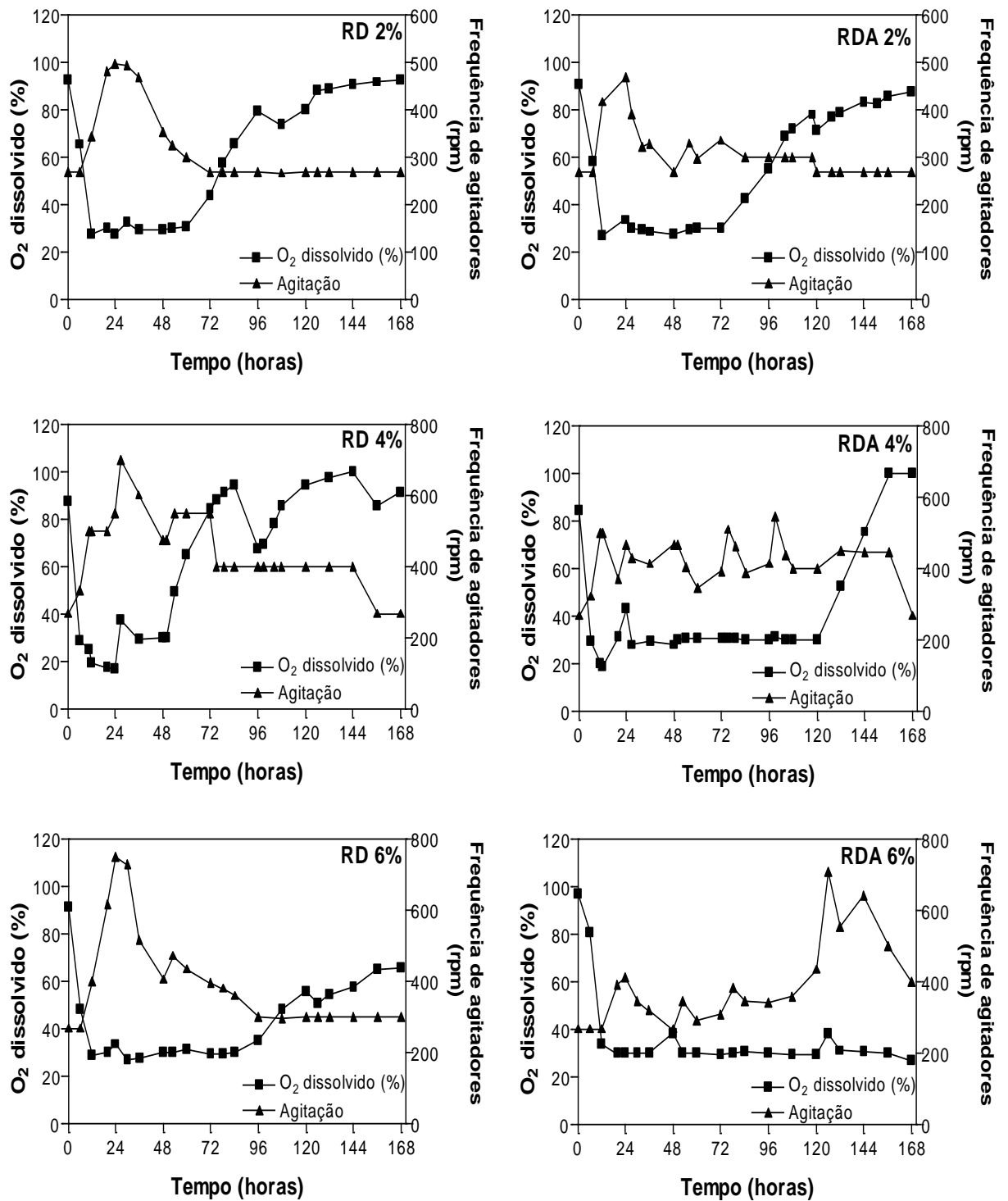


Figura 27. Consumo de oxigênio e frequência dos agitadores durante cultivos em regime descontínuo (RD) e regime descontínuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes massas de celulose.

Após as alimentações, o oxigênio dissolvido diminuiu em virtude do aumento da concentração de celulose no meio, fato descrito também por Watson *et al.* (1984) e Szabó *et al.* (1996). No experimento em RDA com 4% (m/v) de celulose, pôde-se observar claramente a importância deste processo, pois a agitação empregada, principalmente nas primeiras horas de cultivo, foi inferior ao RD com o mesmo conteúdo de celulose. Como já descrito na literatura, este fato comprova a importância do RDA na agitação, diminuindo assim, os riscos de cisalhamento do micélio (Ganesh *et al.*, 2000).

Patel *et al.* (2009) estudaram o crescimento de *T. reesei* RUT-C30 em diferentes biorreatores e verificaram que maiores agitações aumentam a biomassa, devido ao melhor suprimento de oxigênio. No entanto, o emprego de menores agitações resultou em maiores atividades de FPA. Estes resultados também foram obtidos por Lejeune & Baron (1995).

Para as atividades de  $\beta$ -glicosidases (Figura 28), verifica-se que o emprego de maiores massas de celulose resultou em aumentos nas atividades enzimáticas, porém o RDA não proporcionou incrementos nas atividades. Para a análise empregando a metodologia de Chahal (1985), as atividades máximas foram de 0,8 UI/mL para o RD 6% (m/v). Entretanto, as atividades finais foram semelhantes em todos os experimentos, exceto para o RD com 2% (m/v) de celulose. Para o RD e o RDA com 6% (m/v) de celulose, verifica-se que em 168 horas de cultivo as curvas de atividade enzimática estavam ainda em elevação. Para o método de Daroit *et al.* (2008), atingiram-se atividades máximas de 5,8 UI/mL para o RD e o RDA com 6% (m/v) de celulose.

Kim *et al.* (1997) também não obtiveram maiores atividades de  $\beta$ -glicosidases em RDA, para *A. niger* KKS, empregando palha de arroz como substrato.

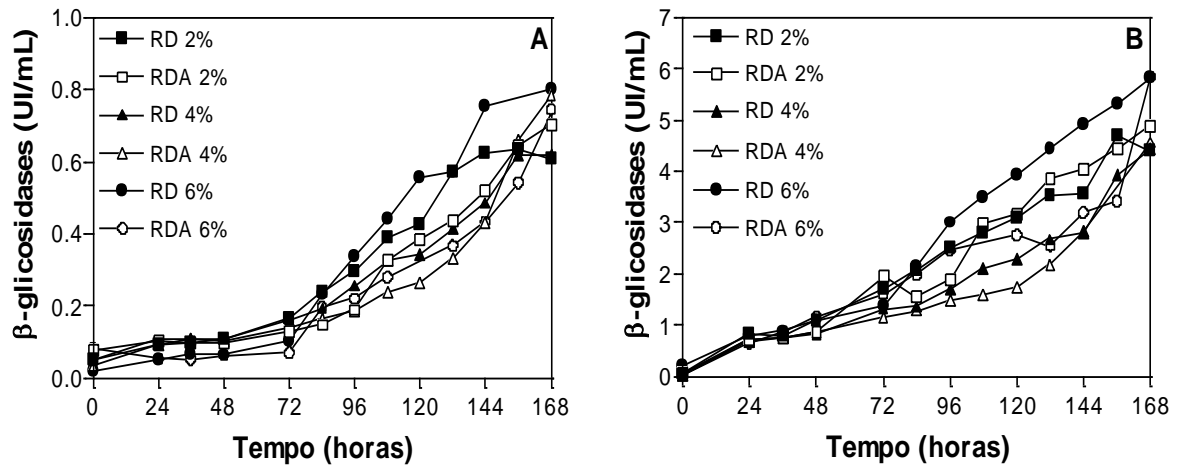


Figura 28. Atividades de  $\beta$ -glicosidases de acordo com o método de Chahal (1985) (A) e de acordo com o método de Daroit *et al.* (2008) (B) durante cultivos em regime descontinuo (RD) e regime descontinuo alimentado (RDA) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes massas de celulose.

Os incrementos nas atividades de FPA podem ser verificados claramente no RDA quando comparado ao RD (Figura 29). Os títulos enzimáticos para o RDA foram 25, 40 e 110% superiores quando comparados às atividades do RD com 2, 4 e 6% (m/v) de celulose, respectivamente. Atividades máximas de 8,3 UI/mL foram obtidas em 144 horas de cultivo para o RDA com 4% (m/v) de celulose. Ahamed & Vermette (2008a) também realizaram estudos em RDA para incrementar a produção de celulases. Os autores iniciaram os experimentos com 5% (m/v) de celulose e após 48 horas de cultivo iniciaram as adições de lactose (15% (m/v)) e ácido lactobiônico (0,1% (m/v)) por três dias. Atividades máximas (FPA) de 5,0 UI/mL foram obtidas em 120 horas de cultivo.

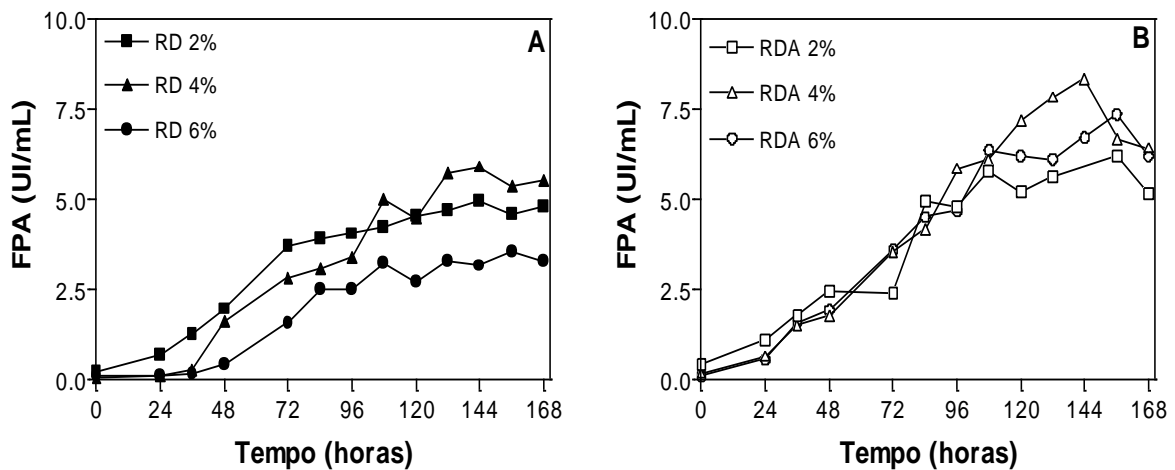


Figura 29. Atividade de FPA durante cultivos em regime descontinuo (RD) (A) e regime descontinuo alimentado (RDA) (B) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando-se diferentes massas de celulose.

Maiores atividades de endoglicanases e xilanases também foram obtidas nos cultivos alimentados quando comparados aos não alimentados. No entanto, para o RDA com 2% (m/v) de celulose, as atividades de endoglicanases foram semelhantes ao RD com a mesma massa equivalente de celulose (Figura 30). As atividades máximas para esta enzima foram de 37,3 UI/mL em RDA com 4% (m/v) de celulose. Estes resultados foram superiores aos obtidos para *P. occitanis* (21 UI/mL), cultivado, também, em regime descontinuo alimentado (Belghith *et al.*, 2001).

Para xilanases, as atividades máximas foram obtidas em RDA com 4% (m/v) de celulose (177,2 UI/mL), em 120 horas de cultivo (Figura 31). Atividades xilanásicas semelhantes foram obtidas por Ximenes *et al.* (2007) para *T. reesei* RUT-C30 em RDA. Neste trabalho, o resíduo da fermentação do milho foi empregado como substrato para a produção de xilanases, e atividades máximas de 148 UI/mL foram obtidas em 168 horas de cultivo.

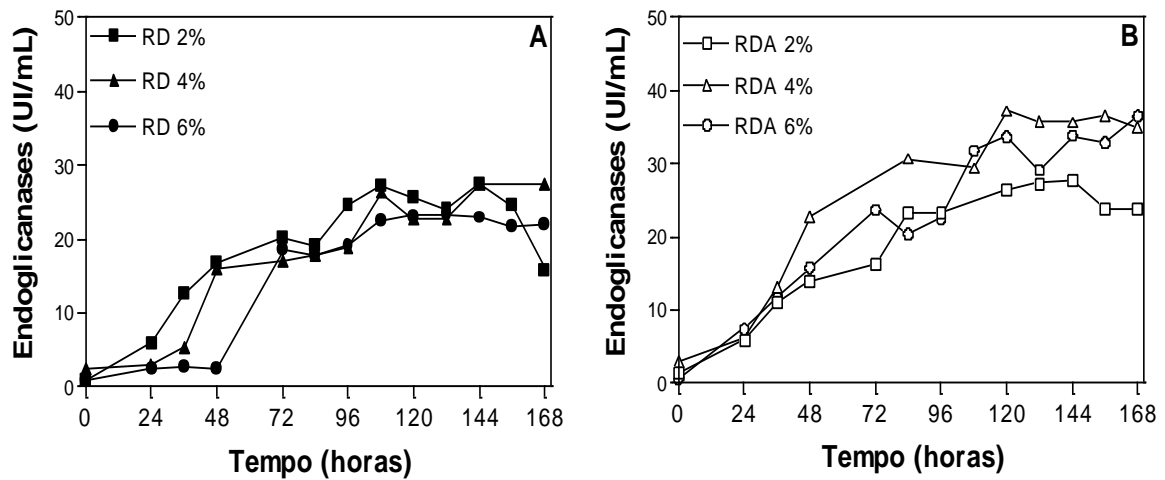


Figura 30. Atividade de endoglucanases durante cultivos em regime descontinuo (RD) (A) e regime descontinuo alimentado (RDA) (B) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando diferentes massas de celulose.

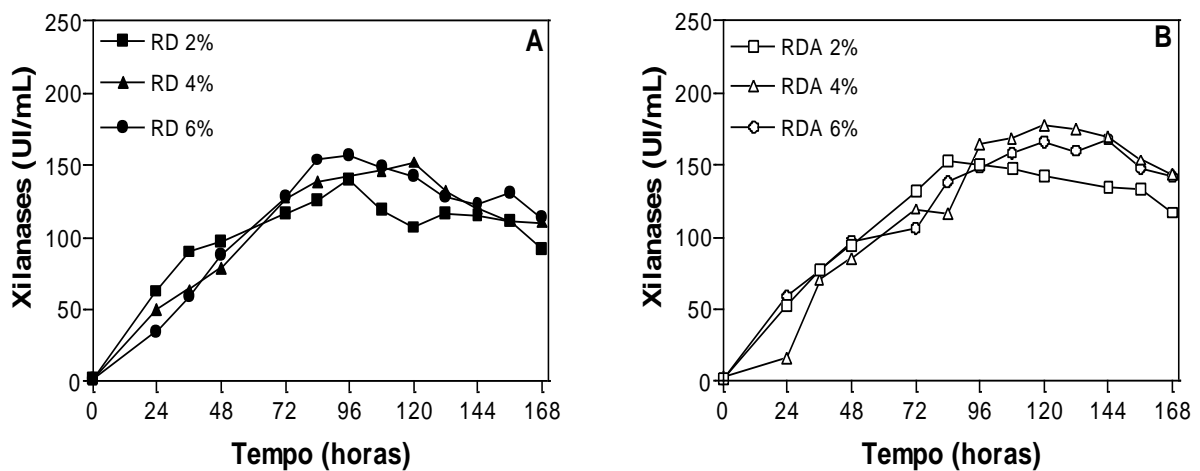


Figura 31. Atividade de xilanases durante cultivos em regime descontinuo (RD) (A) e regime descontinuo alimentado (RDA) (B) com *Penicillium echinulatum* S1M29, empregando diferentes massas de celulose.

O RDA tem a vantagem de manter baixos os níveis de glicose e manter quantidades adequadas de celulose ao microrganismo (Szabó *et al.*, 1996). Até mesmo a celobiose, um indutor natural, pode reprimir a produção de celulases, quando a fonte de carbono está acima da taxa limite, o que pode ocorrer no RD (Eriksson & Hamp, 1978). Este fato e as maiores agitações podem ter influenciado nas menores atividades obtidas para o RD.



As maiores atividades deste trabalho foram obtidas em o RDA com massas equivalentes a 4% (m/v) de celulose. De acordo com Hendy *et al.* (1984), a expectativa era de que o RDA com massa equivalente a 6% (m/v) de celulose proporcionasse as maiores atividades. Os autores obtiveram incrementos proporcionais nas atividades de FPA com o aumento da adição de celulose (*Solka Floc*<sup>®</sup>). As atividades obtidas por eles foram de 10, 20 e 30 UI/mL para cultivos com 5, 10 e 15% (m/v) de celulose, respectivamente.

Sugere-se que as menores atividades para o RDA 6% foram devidas ao aumento da alimentação de 0,5 para 1% (m/v) em 120 e 132 horas de cultivo. Este fato foi estudado por Hendy *et al.* (1984) e os autores comprovaram que menores quantidades de celulose e menores períodos de alimentação resultam em maiores atividades de FPA finais.

A adsorção das celulasas na celulose residual descrita por Mandels & Andreotti (1978) também pode explicar a menor atividade do RDA 6%, pois nas últimas 48 horas de cultivo o conteúdo de celulose aumentou, e o cultivo foi encerrado com 0,7% (m/v) de celulose residual.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram dados da literatura, pois maiores atividades de FPA, endoglicanases e xilanases foram obtidas em RDA. Os resultados comprovam mais uma vez a importância deste processo.



## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos e a partir da análise dos dados, pode-se concluir que:

- a temperatura mais apropriada para a produção de celulases e xilanases para a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* é de 28°C;
- o pH mais adequado para a produção de celulases e xilanases para a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* é de 6,0;
- o aumento na concentração de celulose em regime descontínuo aumentou proporcionalmente as atividades de FPA com até 3% de celulose, chegando a 5,7 UI/mL;
- o aumento na concentração de celulose não induziu maiores atividades de xilanases;
- o regime descontínuo alimentado incrementou as atividades de FPA até 8,3 UI/mL, endoglicanases até 37,3 UI/mL e xilanases até 177,2 UI/mL, porém não aumentou as atividades de  $\beta$ -glicosidases.

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas sobre a produção de enzimas em biorreator com agitação mecânica, sugerem-se as seguintes:

- avaliar qual componente do complexo das celulases e/ou das xilanases apresenta maior expressão, de acordo com os parâmetros físicos e químicos avaliados;
- desenvolver um sistema automático para as alimentações no regime descontínuo alimentado para diminuir os intervalos e as concentrações das alimentações;
- avaliar a produção de enzimas em regime descontínuo alimentado para a celulose, com variação do volume operacional;
- avaliar a produção de celulases e xilanases empregando diferentes materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante em regime descontínuo alimentado.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão-Neto, J.; Rossini, C. H.; El-Gogari, S.; Henrique-Silva, F.; Crivelaro, O.; El-Dorry, H. (1995). Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochem.** 34: 10456-10462.
- Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Singh, R.; Shaikh, H. Bastawdea, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carb. Polym.** 57: 67-72.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008a). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochem. Eng. J.** 40: 399-407.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008b). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 42: 41-46.
- Ahmed, S.; Bashir, A.; Saleem, H.; Saadia, M.; Jamil, A. (2009). Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pak. J. Bot.** 41(3): 1411-1419.
- Allen, A. L.; Andreotti, R. E. (1982). Cellulase production in continuous and feed-bath culture by *Trichoderma reesei* MCG 80. **Biotechnol. Bioeng.** 12: 451-456.
- Archana, A.; Satyanarana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 21: 12-17.

- Bailey, J. E. (1980). Biochemical reaction engineering and biochemical reactors. **Chem. Eng. Soc.** 35: 1854-1886.
- Bailey, M. J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Bailey, M. J.; Buchert, J.; Viikari, L. (1993). Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan and cellulose-based media. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40: 224-229.
- Bailey, M. J.; Tahtiharju, J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62: 156-162.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. **Energy Conv. Manag.** 52: 858-875.
- Ball, A. S.; McCarthy, A. J. (1989). Production and properties of xylanases from actinomycetes. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 439-444.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Belghith, H.; Ellouz-Chaabouni, S.; Gargouri, A. (2001). Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. **J. Biotechnol.** 89: 257-262.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.

Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. **Trends. Biotechnol.** 3: 286-290.

BIO & Farma. Celulase: calcanhar-de-aquiles. **Disponível (online)**

[http://www.quimica.com.br/revista/qd467/biofarma/bio\\_farma02.html](http://www.quimica.com.br/revista/qd467/biofarma/bio_farma02.html) (06 de abril, 2009).

Bisaria, V. S.; Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-104.

Botella, C.; Diaz, A. B.; Wang, R.; Koutinas, R. A.; Webb, C. (2009) Particulate bioprocessing: a novel strategy for biorefineries. **Process Biochem.** 44: 546–555.

Broda, P. (1992). Biotechnology in the degradation and utilisation of lignocellulose. In: **Biodegradation.** 3: 219-238.

Brow, D. E; Halsted, D. J. (1975). The effect of acid pH on the growth kinetics of *Trichoderma viride*. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 1079-1084.

Brown, J. A.; Falconer, D. J.; Wood, T. M. (1987). Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and  $\beta$ -glucosidase production. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 47-52.

Buchanan, B. B.; Gruissem W.; Jones, R. L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of plants. **Am. Soc. Plant Physiol.** 1387 p.

Byrne, H., Christou, N. V., Verma, D. P. S., Maclachlan, G. A. (1975). Purification and characterization of two cellulases from auxin-treated pea epicotyls. **J. Biol. Chem.** 250: 1012-1018.

- Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andreus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.
- Camassola, M. (2007). Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos e em estado sólido para a hidrólise de lignocelulósicos. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2010). Cellulases and Xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.
- Carlile, M. J.; Watkinson, S. C. (1997). **The fungi**. London: Academic Press, 460 p.
- Carrau, J. L ; Dillon, A. J. P.; Ribeiro, R. T. S.; Leygue-Alba, N. M. R.; Azevedo, J. L. (1981). Produção de enzimas celulolíticas por microrganismos. In: Simpósio Internacioanl de Engenharia Genética. **Anais.** 39:205-210.
- Carvalho, E. (2005). Potencial de mercados para o etanol. **Disponível (online)** [http://www.aea.org.br/docs/seminários\\_2005/combustíveis/01\\_Eduardo\\_de\\_Carvalo.pdf](http://www.aea.org.br/docs/seminários_2005/combustíveis/01_Eduardo_de_Carvalo.pdf) (29 de janeiro, 2009).
- Chahal, D. S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environm. Microbiol.** 49: 205-210.



- Chipeta, Z. A.; Preez, J.; Christopher, L. (2008). Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 587-594.
- Collins, T.; Hoyoux, A.; Dutron, A.; Georis, J.; Genot, B.; Dauvrin, T.; Arnaut, F.; Gerday, C.; Feller G. (2006). Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **J. Cereal Sci.** 43: 79-84.
- Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. (1993).  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.
- Damaso, M. C. T.; Andrade, C. M. M. C.; Pereira Jr, N. (2002). Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Braz. J. Microbiol.** 33: 333-338.
- Daroit, D. J.; Simonetti, A.; Hertz, P. F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 933-941.
- Deere, J. (2011). Cana/Açúcar/Álcool: preços do açúcar em alta e etanol em escalada. **Disponível (online)** [http://www.deere.com.br/pt\\_BR/ag/veja\\_mais/info\\_mercado/sugar\\_cane.html](http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/sugar_cane.html) (17 de outubro, 2011).
- Dekker, R. F. H.; Richards, G. N. (1976). Hemicellulases: Their occurrence purification properties and mode of action. **Adv. Carb. Chem. Biochem.** 32: 277-352.

- Deswal, D.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp.RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresour. Technol.** 102: 6065–6072.
- Dillon, A. J. P.; Malvessi, E.; Turelly, N.; Silveira, M. M. (1999). Produção de celulases por *Penicillium echinulatum*. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Resumos.** p.III-3-III5. Rio de Janeiro, 1999.
- Dillon, A. J. P. (2004). **Celulases.** In.: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Editores). **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. p. 243-269.
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53.
- Divne, C.; Stahlberg, J.; Reinikainen, T.; Ruohonen, L.; Pettersson, G.; Knowles, J. K. C.; Teeri, T. T.; Jones, A. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science.** 265: 524-528.

- Domingues, F. C.; Queiroz, J. A.; Carbal, J. M. S.; Fonseca, L. P. (2001). Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnol. Lett.** 23: 771-775.
- Doppelbauer, R.; Esterbauer, H.; Steiner, W.; Lafferty, R. M.; Steinmüller, H. (1987). The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 26: 485-494.
- Duff, S. J. B.; Cooper, D. G.; Fuller, O. M. (1987). Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase by a mixed fungal fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 47-51.
- Duff, S. J. B.; Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 55: 1-33.
- Dutta, T.; Sahoo, R.; Sengupta, R.; Ray, S. S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S. (2008). Novel cellulases from an extremophilic fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 275- 282.
- Eherhart, B. M.; Beck; R. S.; Goolsby, K. M. (1977). Cellulase of *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.** 130: 181-186.
- El-Hawary, F. I.; Mostafa, Y. S. (2001). Cellulase production and conversion of rice straw to lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. **Acta. Alimentaria.** 30: 281-295.

- Ellouz-Chaabouni, S.; Belghith, H.; Hassairi, I.; Mrad, K.; Ellouz, R. (1995). Optimization of cellulases production by *Penicillium occitanis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 267-269.
- Eriksson, K. E.; Hamp, S. G. (1978). Regulation of endo-1,4- $\beta$ -glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. **Eur. J. Biochem.** 90: 183-190.
- Eriksson, K. E.; Grünewald, A.; Nilsson, T.; Vallander, L. (1980). A scanning electron microscopy study of the growth and attack on wood by three white-rot fungi and their cellulase-less mutants. **Holzforschung.** 34: 207-213.
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A.; Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresour. Technol.** 36: 51-65.
- Falcone, M.; Marques, A. B. (1965). Estudo sobre condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Technol. Ali. Beb.** 4: 24-30.
- Fan, L. T.; Lee, Y-H.; Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 177-199.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989). **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter. 613p.
- Garg, S. K.; Neelakantan, S. (1981). Effect of cultural factors on cellulase activity and protein production by *Aspergillus terreus*. **Biotechnol. Bioeng.** 23: 1653-1659.

- Ganesh, K.; Joshi, J. B.; Sawant, S. B. (2000). Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Ghose, T. K.; Sahai, V. (1979). Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 283-296.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. (2004). Influência de *Tween* na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Biological Sciences.** 26: 463-470.
- Gong, C. S.; Tsao, G. T. (1979) Cellulase and biosynthesis regulation. **Annu. Rep. Ferment. Processes.** 3:111-140.
- Gupta, V. K.; Gaur, R.; Yadava, S. K.; Darmwall, N. S. (2009). Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. **Am. J. Food Technol.** 4: 20-29.
- Haki, G. D.; Rakshit, S. T. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.** 89: 17–34.
- Han, W., He, M. (2010). The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw composition. **Bioresour. Technol.** 101: 3724–3731.

- Harikrishna, S.; Rao, K. C. S.; Babu, J. S.; Reddy, D. S. (2000) Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioprocess Eng.** 22: 467-470.
- Heightman, T. D.; Vasella, A. T. (1999). Recent insights into inhibition, structure and mechanism of configuration-retaining glycosidases. **Angew. Chem.** 38: 750-770.
- Hendy, N. A.; Wilke, C. R.; Blanch, H. W. (1984). Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 73-77.
- Hideno, A.; Inoue, H.; Tsukahara, K.; Yano, S.; Fang, X.; Endo, T.; Sawayama, S. (2011). Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme Microb. Technol.** 48: 162-168.
- Huang, A. A. (1975). Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system. **Biotechnol. Bioeng.** 17: 1421-1433.
- Icidca-Geplacea-Pnud. **Manual de los derivados de la cana de azucar.** Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, p.62, 1990.
- Ikram-ul-Haq; Khurshid, S.; Ali, S.; Ashraf, H.; Qadeer, M. A.; Rajoka, M. I. (2001). Mutation of *Aspergillus niger* for hiper production of citric from black strap molasses. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17: 35-37.
- Joglekar, A. V.; Karanth, N. G. (1984). Studies on cellulases production by mutant *Penicillium funiculosum*. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 1079-1084.

- Jorgensen, H.; Morkeberg, A.; Krogh, K. B. R.; Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 42-48.
- Juhász T.; Szengyel Z.; Szijártó N.; Réczey, K. (2004). Effect of pH on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT-C30. **App. Biochem. Biotechnol.** 113-116: 201-211.
- Kim, S. W.; Kang, S. W.; Lee, J. S. (1997). Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresour. Technol.** 59: 63-67.
- Klass, D. L. (1998). Biomass for Renewable Energy, Fuels and Chemicals. **Academic Press.**
- Knauf, M.; Moniruzzaman, M. (2004). Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective. **Int. Sugar J.** 106(1263): 147-150.
- Kossen, N. W. F. (1984). Bioreactors consolidation and innovation. In: **3rd EFB Conference**, Munich, p. 10-10, September.
- Kubicek, C. P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R. L.; Kubicek-Pranz, E. M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 90-99.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.
- Kurasawa, T.; Yachi, M.; Suto, M.; Kamagata, Y.; Takao, S.; Tomita, F. (1992). Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. **Appl. Environ. Microb.** 58: 106-110.

- Ladisch, M. R.; Hong, J.; Voloch, M.; Tsao, G. T. (1981). **Cellulase kinetics**. In: Hollaender, A.; Rabson, R.; Rodgers, P.; San Pietro, A.; Valentine, R.; Wolfe, R. (Eds). **Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals**. Plenum Publishing, New York, pp. 55-83.
- Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J. Biotechnol.** 56: 1-24.
- Lejeune, R.; Baron, G. V. (1995). Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. **Appl. Microb. Biotechnol.** 43: 249-258.
- Liming, X.; Xueliang, S. (2004). High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresour. Technol.** 91: 259–262.
- Liu, W.; Lu, Y.; Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo- $\beta$ -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochem.** 34: 67-72.
- Lo, C-M.; Zhang, Q.; Callow, N. V.; Ju, L-K. (2009). Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* RUT-C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. **Bioresour. Technol.** 101: 717-723.
- Madlala, A. M.; Bissoon, S; Singh, S.; Christov, L. (2001). Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnol. Lett.** 23: 345-351.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.



- Mandels, M.; Parrish, F. W.; Reese, E. T. (1962). Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **J. Bacteriol.** 83: 400-408.
- Mandels, M.; Weber, J. (1969). The production of cellulases. **Adv. Chem. Ser.** 95: 391-414.
- Mandels, M.; Weber, J.; Parizek, R. (1971). Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. **Appl. Microbiol.** 21: 152-154.
- Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulases. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5: 81-105.
- Mandels, M.; Andreotti, R. E. (1978). Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. **Process Biochem.** 13: 6-13.
- Martín, C.; Galve, M.; Fredrik Wahlbom, C.; Hagerdal, B. H.; Jonsson, L. J. (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xilose – utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 274-282.
- Martín, C.; Klinke, H. B.; Thomsen, A. B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martins, L. F. (2005). Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum*. 2005. 121 f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- McCleary, B. V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 349-354.
- McLean, D. D.; Abear, K.; Podruzny M. F. (1986). Fed-batch production of cellulases using *Trichoderma reesei* Rutgers C30. **Can. Chem. Eng.** 64: 588–597.

- Medve, J. (1997). Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II. **Tese de Doutorado**. Department of Biochemistry, Lund University, Sweden.
- Medve J.; Ståhlberg J.; Tjerneld, F. (1997). Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 66: 39-56.
- Michalski, Z. E.; Menegol, D.; Reis, L.; Bettio, M.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2008). Efeito da Suplementação de *Prodex*<sup>®</sup> na produção celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* em cultivos em estado sólido. In: XVI Encontro de Jovens Pesquisadores. **Resumo**. Caxias do Sul, 2008.
- Milagres, A. M. F.; Lacis, L. S.; Prade, R. A. (1993). Characterization of xylanase production by local isolate of *Penicillium janthinellum*. **J. Enzyme Microb. Technol.** 15: 248-252.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemis.** 31: 426-428.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresou. Technol.** 96: 673-686.

- Muthuvelayudham, R.; Viruthagiri, T.; Selvapandian, T. (2005) Biosynthesis of cellulase protein on substrates like cellulose, xylose and lactose using *Trichoderma reesei*. **J. Eng. Technol.** 118-121.
- Nigam, P.; Singh, D. (1994). Solid-state substrate fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic Microbiol.** 34: 405-423.
- Niranjane, A. P.; Madhou, P.; Stevenson, T. W. (2007). The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1464-1468.
- Niwa, T.; Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Koaze, Y.; Niida, T. (1970). "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. **Agric. Biol. Chem.** 34: 966-968.
- Öhgren K.; Bura R.; Lesnicki G.; Saddler J.; Zacchi G. A. (2007). Comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochem.** 42: 834–839.
- Oliveira, L. A.; Porto, A. L. F.; Tambourgi, E. B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87 M-115 from different agricultural waste. **Bioresour. Technol.** 97: 862-867.
- Patel, N.; Choy, V.; Malouf, P.; Thibault, J. (2009). Growth of *Trichoderma reesei* RUT-C30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. **Process Biochem.** 44: 1164-1171.
- Peng, F.; Ren, J. L.; Xu, F.; Bian, J.; Peng, P.; Sun, R. C. (2009). Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **J. Agric. Food Chem.** 57: 6305-6317.

- Pereira Jr, N.; Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A. (2008) **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ. p.63.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5: 53-63.
- Pushalkar, S.; Rao, K. K.; Menon, K. (1995). Production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus terreus*. **Current Microbiol.** 30: 255-258.
- Rabinovich, M. L.; Melnik, M. S.; Bolobova, A. V. (2002). Microbial cellulases (review). **Appl. Biochem. Microbiol.** 38(4): 305–321.
- Raízen, 2011. Tecnologia na produção de etanol. **Disponível (online)** <http://www.raizen.com/pt/segmento-de-negocios/etanol.aspx> (17 de outubro, 2011).
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quim. Nova.** 26: 863-871.
- Reczey, K.; Szengyel, Zs.; Eklund, R.; Zacchi, G. (1996). Cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Bioresour. Technol.** 57: 25-30.
- Reese, E. T.; Maguire, A. (1969). Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Appl. Microbiol.** 17: 242-245.
- Reese, E. T. (1972). Enzyme production from insoluble substrate. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 3: 43-62.

- Rho, D.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Driguez, H. Defaye, J. (1982). Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new in inducer. **J. Bacteriol.** 149: 47-53.
- Rivers, D. B.; Emmert, G. H. (1987). Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. **Biotechnol. Lett.** 9: 365-368.
- Romanelli, R. A.; Houston, C. W.; Barnett, S. M. (1975). Studies on the thermophilic cellulolytic fungi. **Appl. Microbiol.** 30: 276-281.
- Romero, M. D.; Aguado, J.; Gonzalez, L.; Ladero M. (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 244-50.
- Romio, T.; Dillon, A. J. P. (2006). Avaliação da produção de celulases em *Penicillium echinulatum* sob efeito de polipropilenoglicol e Tween 80. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores. **Resumo.** Caxias do Sul, 2006.
- Rosa, S. E. S.; Garcia, J. L. F. (2009). O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES.** 32: 117-156.
- Rossi, M. J. (2006). Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift. **Tese de doutorado.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.
- Ryu, D. Y.; Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.** 2: 91-102.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 30: 279-291.

- Saha, B. C.; Iten, L. B.; Cotta, M. A.; Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochem.** 40: 3693–3700.
- Said, S.; Pietro, R. (2002). Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. **Ed. Eventos.** p.35-36.
- Sawada, T.; Nakamura, Y.; Kobayashi, F.; Kuwahara, M.; Watanabe, T. (1995). Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. **Biotechnol. Bioeng.** 48: 719-724.
- Schmidel, W.; Facciotti, M. C. R. (2001). **Biorreatores e Processos Fermentativos.** In: Schmidel, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Editores). **Biotecnologia Industrial.** Edgard Blücher Ltda. V.2, p.179-190.
- Sehnm, N. T.; Bittencourt, L. R.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microb. Biotechnol.** 72(1): 163-167.
- Silva, R., Gomes, E. (2004). **Ligninases.** In.: Said, S.; Pietro, R. C. L. R. (Editores). **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. pp. 349-379.
- Silveira, D. P. F. Q.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A.; Milagres, A. M. F.; Medeiros, C. L.; Filho, E.X. (1999). A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 23: 682-685.

- Singh, A.; Singh, N.; Bishnoi, N. R. (2009). Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. **Int. J. Civil Environ. Eng.** 1:1.
- Sing, S.; Brar, J. K.; Sandhu, D. K.; Kaur, A. (1996). Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. **J. Basic Microbiol.** 36: 289-296.
- Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549.
- Sinnot, M. L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. **Chem. Rev.** 90: 1171-1202.
- Smith, D. C.; Wood, T. M. (1991). Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and beta-xylosidase while maintaining low protease production. **J. Biotechnol. Bioeng.** 38: 883-890.
- Sobotka, M.; Prokop, A.; Dunn, I. I.; Einsele, A. (1982). Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. In: Tsao, G. T. (Ed.). **Annual reports on fermentation process**. London: Academic Press, p. 127-210.
- Sohail, M.; Siddiqi, R.; Ahmad, A.; Khan, S. A. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnol.** 25: 437-441.

- Sternberg, D. (1976).  $\beta$ -glucosidases of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. **Appl. Environ. Microb.** 31: 648-654.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Patel, A. K. (2005). Microbial cellulases – Production, applications and challenges. **J. Sci. Ind. Res.** 64: 832-844.
- Sunna, A.; Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.
- Sun, J. X.; Sun, X. F.; Sun, R. C.; Su, Y. Q. (2004). Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carb. Polyme.** 56: 195-204.
- Sun, W-C.; Cheng, C-H.; Lee, W-C. (2008). Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* RUT-C30 on rice straw. **Process Biochem.** 43: 1083-1087.
- Suto, M; Tomita, F. (2001). Review: Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 305-311.
- Szabó, I. J.; Johansson, G.; Pettersson, G. (1996). Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **J. Biotechnol.** 48: 221-230.



- Szijarto, N.; Faigl, Z.; Réczey, K.; Mézesc, M.; Bersényi, A. (2004). Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of homeproduced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. **Crops Prod.** 20: 49-57.
- Takahashi, C. M.; Lima, K. G. C.; Takahashi, D. F.; Alterthum, F. (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **J. Microb. Biotechnol.** 16: 829-834.
- Tangu, S. K.; Blanch, H. W.; Charles R.; Wilke, C. R. (1981). Enhanced production of cellulases, hemicellulase, and  $\beta$ -glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT-C30). **Biotechnol. Bioeng.** 23: 1837-1849.
- Teeri, T.T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends Biotechnol.** 15: 160-167.
- Terrasán, C. R. F.; Temer, B.; Duarte, M. C. T.; Carmona, E. C. (2010). Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresour. Technol.** 101: 4139-4143.
- Updegraff, D. M. (1969). Semi micro determination of cellulose in biological materials. **Anal. Biochem.** 32: 1577-1583.
- Vaheri, M. P.; Leisola, M.; Kaupinnen, V. (1979). Transglycosilation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Lett.** 1: 41-46.
- Velkovska, S.; Marten, M. R.; Ollis, D. F. (1997). Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30. **J. Biotechnol.** 54: 83-94.

- Ximenes, E. A.; Dien, B. S.; Ladisch, M. R.; Mosier, N.; Cotta, M. A.; Li, X. L. (2007). Enzyme production by industrially relevant fungi cultured on coproduct from corn dry grind ethanol plants. **App. Biochem. Biotechnol.** 136-140: 171-184.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Leisola, M.; Turunen, O. (2004). Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Process Biochem.** 39: 729-773.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.
- Zaldivar, M.; Velasquez, J. C.; Contreras, I.; Perez, L. M. (2001). *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Electronic. J. Biotechnol.** 1-7.
- Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277: 581-588.
- Zhou, J.; Wang, Y. H.; Chu, J.; Zhuang, Y. P.; Zhang, S. L.; Yin, P. (2008). Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. **Bioresour. Technol.** 99: 6826-6833.
- Watson, T. G.; Nelligan, I.; Lessing, L. (1984). Cellulase production by *Tichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture. **Biotechnol. Lett.** 6: 667-672.

Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. (2005). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresour. Technol.** 96: 491-499.